

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL



DOCTORADO EN INGENIERÍA

Identificación y Tratamiento de Aberraciones en Imágenes de Microscopia de Fluorescencia Multidimensional

Javier Eduardo Diaz Zamboni

FICH

FACULTAD DE INGENIERÍA
Y CIENCIAS HÍDRICAS

INTEC

INSTITUTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO
PARA LA INDUSTRIA QUÍMICA

CIMEC

CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE
MÉTODOS COMPUTACIONALES

sinc(i)

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN SEÑALES
SISTEMAS E INTELIGENCIA COMPUTACIONAL

Doctorado en Ingeniería
Mención Inteligencia Computacional, Señales y Sistemas

Título de la obra:

Identificación y Tratamiento de Aberraciones en Imágenes de Microscopia de Fluorescencia Multidimensional

Autor: Javier Eduardo Diaz Zamboni

Lugar: Santa Fe, Argentina

Palabras Claves:

microscopia de fluorescencia, imágenes multidimensionales, restauración de imágenes, función de esparcimiento puntual, estimación de parámetros, problemas inversos, desconvolución.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas
Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química
Centro de Investigación en Métodos Computacionales
Instituto de Investigación en Señales, Sistemas e Inteligencia Computacional

IDENTIFICACIÓN Y TRATAMIENTO DE ABERRACIONES EN IMÁGENES DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MULTIDIMENSIONAL

Javier Eduardo Diaz Zamboni

Tesis remitida al Comité Académico del Doctorado
como parte de los requisitos para la obtención
del grado de
DOCTOR EN INGENIERÍA
Mención Inteligencia Computacional, Señales y Sistemas
de la
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas
Instituto de Investigación en Señales, Sistemas e Inteligencia Computacional

Identificación y Tratamiento de Aberraciones en Imágenes de Microscopia de Fluorescencia Multidimensional

Javier Eduardo Diaz Zamboni

Lugar de Trabajo:

LAMAE

Laboratorio de Microscopia aplicada a estudios Celulares y Moleculares

Facultad de Ingeniería

Universidad Nacional de Entre Ríos

Director:

Dr. Víctor Hugo Casco

LAMAE-FI-UNER

Co-director:

Dr. Néstor Calvo

FICH-UNL

Jurado Evaluador:

Dra. Virginia Ballarín

UNMDP

Dr. César Martínez

sinc(*i*)-CONICET-UNL

Dr. Fernando Stefani

FCEN-UBA CIBION-CONICET

Dr. Juan Pastore

ICYTE-CONICET



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas

Santa Fe, 3 de Octubre de 2018.

Como miembros del Jurado Evaluador de la Tesis de Doctorado en Ingeniería titulada *"Identificación y tratamiento de aberraciones en imágenes de microscopia de fluorescencia multidimensional"*, desarrollada por el Bioing. Javier Eduardo DÍAZ ZAMBONI, en el marco de la Mención "Inteligencia Computacional, Señales y Sistemas", certificamos que hemos evaluado la Tesis y recomendamos que sea aceptada como parte de los requisitos para la obtención del título de Doctor en Ingeniería.

La aprobación final de esta disertación estará condicionada a la presentación de dos copias encuadernadas de la versión final de la Tesis ante el Comité Académico del Doctorado en Ingeniería.

.....
Dra. Virginia Ballarín (v)

.....
Dr. Fernando Stefani

.....
Dr. Juan Ignacio Pastore (v)

.....
Dr. César Martínez

Santa Fe, 3 de Octubre de 2018

Certifico haber leído la Tesis, preparada bajo mi dirección en el marco de la Mención "Inteligencia Computacional, Señales y Sistemas" y recomiendo que sea aceptada como parte de los requisitos para la obtención del título de Doctor en Ingeniería.

.....
Dr. Néstor Calvo
Codirector de Tesis

.....
Dr. Víctor Hugo Casco
Director de Tesis

(*) La Dra. Virginia Ballarín y el Dr. Juan I. Pastore participaron por video conferencia.

Dr. JOSÉ LUIS MACOR
SECRETARIO DE POSGRADO
Facultad de Ingeniería y Cs. Hídricas

Universidad Nacional del
Litoral
Facultad de Ingeniería y
Ciencias Hídricas

Secretaría de Posgrado

Ciudad Universitaria
C.C. 217
Ruta Nacional Nº 168 - Km. 472,4
(3000) Santa Fe
Tel: (54) (0342) 4575 229
Fax: (54) (0342) 4575 224
E-mail: posgrado@fich.unl.edu.ar

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera expresar mi agradecimiento a quien lea este documento. Si bien estoy muy satisfecho de haber completado esta etapa de formación académica, es mi deseo que esta pequeña contribución sirva al trabajo de alguien más. Así que desde ya agradezco a quien le de una oportunidad de lectura al mismo.

Un especial agradecimiento quiero dar a mi director, Dr. Víctor Hugo Casco, por la confianza y dedicación que me ha brindado para realizar este trabajo, por la honestidad intelectual y la rigurosidad para analizar y debatir mis ideas y sugerencias. Gracias por el apoyo que me has dado desde que ingresé al [Laboratorio de Microscopía aplicada a Estudios Celulares y Moleculares \(LAMAÉ\)](#) de la [Facultad de Ingeniería \(FIUNER\)](#).

Quiero agradecer a mi Codirector, Dr. Nestor Calvo por su apoyo y dedicación. Gracias las sugerencias técnicas y la revisión cuidadosa del texto. Gracias por la sinceridad y el acompañamiento.

A los jurados evaluadores de esta tesis también quiero agradecerles, Dra. Virginia Ballarín, Dr. César Martínez, Dr. Fernando Stefani y Dr. Juan Pastore, por la revisión minuciosa del manuscrito, por las preguntas, sugerencias y devoluciones que ayudaron a mejorar este documento. Gracias por el tiempo dedicado.

Agradezco a colegas, amigos y familiares por su todo su apoyo. Finalizar una tesis investigación es también resultado del reconocimiento y apoyo de las personas que nos estiman. Agradezco de corazón a todos aquellos que de alguna manera, ya sea preguntando o con palabras de aliento, me dieron la energía para completar esta etapa.

Finalmente, quisiera agradecer a las instituciones públicas y gratuitas donde me formé, desde el jardín de infantes, pasando por la primaria, secundaria y las universidades. Toda mi formación académica la he realizado en instituciones públicas y gratuitas. No sé si de otra forma hubiera sido posible completar esta etapa de formación académica, pero de lo que estoy convencido es que este es el comienzo del camino para que todas las personas tengamos las mismas oportunidades. Les agradezco en particular a la [Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas \(FICH\)](#) de la [Universidad Nacional del Litoral \(UNL\)](#) y a todo el cuerpo de docentes de posgrado por la oportunidad que me han dado de aprender y formarme.

A todos, muchas gracias.

Declaración legal del autor

Esta Tesis ha sido remitida como parte de los requisitos para la obtención del grado académico de Doctor en Ingeniería ante la Universidad Nacional del Litoral y ha sido depositada en la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas para que esté a disposición de sus lectores bajo las condiciones estipuladas por el reglamento de la mencionada Biblioteca.

Citaciones breves de esta Tesis son permitidas sin la necesidad de un permiso especial, en la suposición de que la fuente sea correctamente citada. Solicitudes de permiso para la citación extendida o para la reproducción parcial o total de ese manuscrito serán concebidos por el portador legal del derecho de propiedad intelectual de la obra, por medio escrito.

Filosofía de trabajo

El autor de esta tesis adhiere a la filosofía de investigación reproducible. Para más información de este tema se sugiere referirse a Stodden et al. [109, 110].

Se utilizó el componente Org-mode del editor emacs, como entorno de programación, documentación y generación de archivo \LaTeX . Para el cómputo numérico se utilizó GNU Octave 3.8. Todas las aplicaciones corriendo en un sistema operativo GNU/Linux Debian 8.

Dado que el presente documento corresponde a una tesis de investigación en el área de la ingeniería, ineludiblemente involucra algún nivel de desarrollo. En particular, como se verá en la [Introducción](#) y, eventualmente, a lo largo del documento, estos desarrollos tienen que ver con la implementación en software de diversos algoritmos. El software desarrollado no tiene un destino a usuarios finales de microscopios, eso corresponde al desarrollo de aplicaciones. El principal destino de estos desarrollos es contribuir a una biblioteca de software de cálculo para adquisición, procesamiento análisis y gestión de imágenes para microscopia. Estas herramientas pueden ser útiles a futuros ingenieros, investigadores o desarrolladores de software.

Este software desarrollado para esta tesis y otro, desarrollado lo largo de los años de trabajo en el [LAMAE](#) de la [FIUNER](#) de la [Universidad Nacional de Entre Ríos \(UNER\)](#) por este autor, está disponible en el sistema de gestión de proyectos del departamento de informática de la [FIUNER](#). Se puede acceder a esta biblioteca por el siguiente hipervínculo http://deptoinformatica.fiuner.edu.ar/svn/lamae_lib.

Índice general

Agradecimientos	I
Declaración legal del autor	III
Filosofía de trabajo	V
Resumen	XV
Abstract	XVII
1. Introducción	I
1.1. Fluorescencia	3
1.2. Microscopia de fluorescencia	7
1.2.1. Componentes fundamentales de un MFCA	9
1.2.2. Seccionamiento óptico	15
1.2.3. Técnicas asociadas a la MFCA	16
1.3. Herramientas de análisis y calibración	18
1.4. Restauración de imágenes de microscopia óptica	21
1.4.1. Convolución y desconvolución	25
1.4.2. Técnicas de restauración aplicadas a MFCA	28
2. Formación de la imagen	33
2.1. Modelo de Gibson y Lanni	34
2.2. Resultados	37
2.2.1. Perfiles de intensidad	37
2.2.2. Análisis de la PSF en el seccionamiento óptico	38
2.3. Discusión y conclusiones	41
3. Determinación de la PSF	47

3.1. Métodos de estimación	48
3.2. Cota inferior de error de estimación	50
3.3. Resultados	50
3.3.1. Análisis de la CRB	50
3.3.2. Pruebas de convergencia	51
3.3.3. Pruebas preliminares exploratorias	52
3.3.4. Evaluación exhaustiva de los métodos	53
3.3.5. Estimación de la posición axial utilizando datos reales de una PSF experi- mental	63
3.4. Discusión y conclusiones	64
4. Restauración de imágenes	69
4.1. Técnicas de restauración aplicadas a MFCA	71
4.2. Error en métodos iterativos	72
4.3. Resultados	73
4.3.1. Análisis de aplicación de filtros	74
4.3.2. Análisis de métodos de desconvolución en secciones ópticas	76
4.3.3. Análisis de planos axiales	80
4.4. Discusión y conclusiones	88
5. Conclusión	91
A. Detalles técnicos del modelo de Gibson y Lanni	95
A.1. Implementación de la función OPD	95
A.2. Integración numérica del modelo	95
A.3. Función que genera la PSF 3D	96
B. Valores por defecto utilizados en modelos de formación de imagen	97
C. Datos del instrumento de referencia e insumos	99
C.1. Microscopio	99
C.1.1. Espectros de los cubos de filtros	99
C.2. Dispositivo de captura	100
C.3. Datos técnicos de insumos	100
C.3.1. Cubreobjetos	100
C.3.2. Espectros de fluoróforos	100

D. Estrategia numérica para optimización en estimación de parámetros	101
E. Filtrado en métodos de desconvolución	103
E.1. Gold: MSEs versus exponente e iteraciones	103
E.2. JVC: MSEs versus iteraciones	104
E.3. ML: MSEs versus exponente e iteraciones	105
E.4. RL: MSEs versus exponente e iteraciones	106
Presentaciones en congresos y artículos	109
Glosario	111
Acrónimos	113

Índice de figuras

1.1. Diagrama de Perrin-Jablonsky	5
1.2. Espectro de fluorescencia.	6
1.3. Esquema de un microscopio de fluorescencia.	9
2.1. Esquema de rayos en el modelo de Gibson y Lanni	35
2.2. Perfiles de intensidad axial del modelo de Gibson y Lanni.	38
2.3. Perfiles de intensidad lateral del modelo de Gibson y Lanni.	38
2.4. Medidas realizadas en el modelo de Gibson y Lanni en función de la profundidad t_s , para tres valores de longitud de onda, λ	39
2.5. Medidas en la PSF variante para n_{oil}	39
2.6. Medidas realizadas en el modelo de Gibson y Lanni en función de la profundidad t_s , para tres valores del índice de refracción del cubreobjetos, n_g	39
2.7. Medidas realizadas en el modelo de Gibson y Lanni en función de la profundidad t_s , para tres valores del espesor del cubreobjetos, t_g	40
2.8. Medidas realizadas en el modelo de Gibson y Lanni en función de la profundidad t_s , para tres valores del índice de refracción del espécimen, n_s	40
2.9. Medidas realizadas en el modelo de Gibson y Lanni en función de la profundidad t_s , para tres situaciones de composición espectral de longitudes de onda	41
3.1. Análisis de la cota de Cramér-Rao	51
3.2. Métodos de estimación: resultados de prueba exploratoria.	52
3.3. Métodos de estimación: ejemplos de imágenes de prueba.	54
3.4. Métodos de estimación: resultados de porcentajes de éxito.	55
3.5. Métodos de estimación: resultados de las iteraciones	56
3.6. Métodos de estimación: resultados de tiempo de cómputo.	57
3.7. Métodos de estimación: resultados de la exactitud.	59
3.8. Métodos de estimación: resultados de precisión.	60

3.9. Métodos de estimación: resultados con datos del eje óptico	62
3.10. Métodos de estimación: resultados obtenidos con datos reales	64
4.1. Análisis del filtrado Gaussiano	75
4.2. Análisis del filtrado de Wiener	76
4.3. MSEs en algoritmos de desconvolución aplicados a secciones ópticas	78
4.4. Resultados de la desconvolución aplicadas a secciones ópticas	79
4.5. Resultados de la desconvolución aplicadas a un corte axial	81
4.6. Evolución de los MSEs en función de las iteraciones para desconvolucion en corte axial	82
4.7. Desconvolución por estratos en cortes axiales	83
4.8. MSEs para la desconvolucion invariante por estratos en cortes axiales	84
4.9. Restauración en corte axial	85
4.10. MSEs en restauración de corte axial	86
4.11. Comparación D, DE y R usando algoritmo JVC	87
4.12. Comparación D, DE y R usando algoritmo de Gold	88
C.1. Espectros de cubos de filtros.	99
C.2. Espectros de fluorescencia de fluorocromos	100
E.1. MSEs para el método de Gold sin filtrado	103
E.2. MSEs para el método de Gold con filtrado Gaussiano	103
E.3. MSEs para el método de Gold filtrado de Wiener	104
E.4. MSEs para el método JVC sin filtrado	104
E.5. MSEs para el método JVC con filtrado Gaussiano	104
E.6. MSEs para el método JVC con filtrado de Wiener	105
E.7. MSEs para el método ML sin filtrado	105
E.8. MSEs para el método ML con filtrado Gaussiano	105
E.9. MSEs para el método ML con filtrado de Wiener	106
E.10. MSEs para el método RL sin filtrado	106
E.11. MSEs para el método RL con filtrado Gaussiano	106
E.12. MSEs para el método RL con filtrado de Wiener	107

Índice de tablas

2.1. Parámetros del modelo de Gibson y Lanni.	35
3.1. Resultados prueba de convergencia	52
3.2. Mediciones del FWHM en una PSF experimental y en el modelo de Gibson and Lanni luego de la estimación de t_s	63
4.1. Funciones de relajación utilizadas en el método Jansson-Van Cittert.	70
4.2. Valores de exponentes y filtros para la aplicación de los algoritmos de restauración.	77
B.1. Valores por defecto del modelo de Gibson y Lanni utilizados en las distintas pruebas.	97
B.2. Valores por defecto del modelo directo obtenido en el Capítulo 2	97
C.1. Datos del dispositivo de captura.	100
C.2. Datos de cubreobjetos.	100

Resumen

La microscopía óptica es fundamentalmente una técnica de análisis tridimensional. Históricamente, una parte importante de los desarrollos tecnológicos en microscopía ha estado orientada a mejorar las prestaciones de estos instrumentos. De estas mejoras tecnológicas surgen varios tipos de microscopía, entre las que se destaca la [microscopía de fluorescencia de campo amplio \(MFCA\)](#), actualmente una microscopía óptica multidimensional, en la que la formación y el tratamiento de las imágenes han constituido el principal objeto de investigación de esta tesis.

De acuerdo a la temática planteada, se puede decir que este trabajo aplica en el campo de la obtención, o formación, computacional de imágenes (del inglés, *computational imaging*). En este sentido, la principal contribución que hace este tesista, en el marco de la investigación, es el desarrollo y pruebas de algoritmos basado en modelos, para la estimación de parámetros de la [función de esparcimiento puntual \(PSF, Point Spread Function\)](#) y la restauración de imágenes en [MFCA](#). En forma más general, con este trabajo de investigación se pretende aportar a la metodología para análisis y tratamiento de imágenes obtenidas con [MFCA](#), con el propósito de que las mismas estén adecuadamente preparadas para análisis morfométrico y fotométrico cuantitativo.

El presente documento se organiza en cinco capítulos. En la primer parte del [Capítulo 1](#) se incluye una descripción del problema, las condiciones desde las cuales se aborda la investigación y una breve reseña de los contenidos del resto de los capítulos. El resto del [Capítulo 1](#) se destina a tratar el estado del arte del grupo de temas centrales de esta tesis. En el [Capítulo 2](#) se presenta el análisis y formulación de un modelo de formación de la imagen en [MFCA](#) multidimensional. El [Capítulo 3](#) se destina al estudio y desarrollo de métodos de estimación de parámetros de la [PSF](#), bajo el modelo de formación de la imagen tratado en el capítulo previo. El [Capítulo 4](#) está dirigido al estudio y desarrollo de técnicas de restauración de imágenes para [MFCA](#), basada en el modelo de formación de la imagen obtenido en el [Chapter 2](#). El capítulo final, [Capítulo 5](#), se destina a un breve resumen de lo desarrollado a lo largo de tesis, comentándose algunas dificultades encontradas, el planteo de nuevos interrogantes y problemas para abordar en un futuro próximo.

Abstract

Optical microscopy is fundamentally a three-dimensional analysis technique. Historically, an important part of the technological developments in microscopy has been aimed to improve the performance of these instruments. From these technological improvements emerge several types of microscopy, among which stands out the widefield fluorescence microscopy, currently a multidimensional optical microscopy, in which the image formation and treatment have been the main research issues of this thesis.

According to the topic considered, it can be said that this work applies to the field of computational imaging. In this sense, the main contribution of the thesis, in the research framework, is the development and testing of based-model algorithms, for **PSF** parameter estimation and image restoration in widefield fluorescence microscopy. From a more general point of view, with this research is intended to contribute to the methodology for image analysis and treatment in widefield fluorescence microscopy, with the purpose that the processed images are properly prepared for morphometric and photometric quantitative analysis.

This document is organized into five chapters. In the first part of the **Chapter 1** a problem description is included, the conditions in which the research is addressed and a brief review of the contents of the following chapters. The rest of the **Chapter 1** is meant to deal with the state of the art of the central group issues of this thesis. In the **Chapter 2** the multidimensional image formation model analysis and formulation in widefield fluorescence microscopy is presented. The **Chapter 3** is intended to the study and development of methods for **PSF** parameter estimation, under the image-formation model addressed in the previous chapter. The **Chapter 4** is aimed to the study and development of image restoration techniques for widefield fluorescence microscopy, based on the image-formation model obtained in **Chapter 2**. The final chapter, **Chapter 5**, it is intended to a brief summary about what was worked throughout this thesis, discussing on about some difficulties found, the raising of new questions and problems to address in the near future.

Capítulo 1

Introducción

El problema central que se aborda en esta tesis, puede resumirse en la formación de la imagen computacional de microscopía de fluorescencia multidimensional, a partir de imágenes registradas con la técnica de seccionamiento óptico en un sistema de microscopía de fluorescencia de campo amplio. Para construir la imagen computacional, se debe realizar un tratamiento a las imágenes obtenidas con seccionamiento óptico, con el fin de encontrar la distribución real de fluorescencia que corresponde a cada sección óptica. Para lograr esto se requiere un modelo del instrumento que se utiliza para el registro, que contemple las principales aberraciones en las imágenes, como así también las fuentes de ruido. Dado que existe una gran variedad de configuraciones en los instrumentos, tipos de lentes objetivas, dispositivos de captura, etc., este estudio se acotó a una configuración instrumental específica.

En efecto, se consideraron las características de fabricación del instrumento de referencia real, disponible en el lugar de trabajo en el que se desarrolló esta tesis. Este es un equipo para MFCA comercial de la década de los 90's, modificado para desarrollar la técnica de seccionamiento óptico (SO). Sus especificaciones se detallan en el Apéndice C. En particular, para la formación de la imagen por SO se consideró la lente objetiva para fluorescencia (magnificación 100x, apertura numérica 1.35 e inmersión en aceite), componente óptico original de este equipo. A lo largo de este trabajo, y debido a la gran cantidad de aplicaciones con estudios *in vivo*, se asumió que el medio en el cual se encuentra el espécimen es agua.

Si bien, al comienzo del desarrollo de esta tesis, se consideraron diversas fuentes de aberración, como resultado de la búsqueda y revisión bibliográfica se llegó al modelo de difracción escalar de Gibson y Lanni [54]. Este modelo predice la aberración esférica que se introduce en las imágenes cuando se utiliza la lente objetiva del microscopio por fuera de las condiciones de uso para las cuales fue diseñada. De hecho, este modelo se adecuaba de manera muy precisa a la lente objetiva del instrumento de referencia mencionada previamente.

En virtud de alto grado de adecuación del modelo de Gibson y Lanni al instrumento de referencia, y a otras posibles configuraciones que pudieran surgir en el futuro, se decidió estudiar este modelo y analizar su comportamiento en el SO, para lo cual se destina el Capítulo 2. En particular, a partir del análisis de los perfiles de intensidad del modelo, se seleccionó un conjunto de medidas cuyo propósito fue caracterizar la varianza espacial. Estas medidas fueron aplicadas a cálculos del

modelo considerando que se realiza un muestreo por [SO](#). Es decir, se analizó cómo cambian estas medidas, en los patrones de difracción tridimensional a distintas posiciones a lo largo del eje óptico. Se consideraron diversas condiciones prácticas, como diferentes longitudes de onda de emisión, cambios en los índices de refracción del aceite de inmersión y del medio del espécimen, entre otras condiciones.

Los resultados del análisis realizado sobre el modelo de Gibson y Lanni, permitieron concluir que el proceso de formación de la imagen por [SO](#) para las condiciones planteadas, es variante en el espacio. En este sentido, y como resultado de esta primera etapa, se propone un modelo de formación de la imagen por [SO](#) en [MFCA](#) que contempla esta varianza espacial y que, además, considera fuentes de ruido de diversos orígenes. Formulando este modelo de formación de la imagen, y a los efectos de la formación de la imagen computacional, se destacan otros problemas. Por un lado, se desconoce la posición de las secciones ópticas a lo largo del eje óptico, y estas no pueden ser determinadas a partir de la distancia relativa que hay entre el cubreobjetos y la lente objetiva. Este problema produce un alto grado de incertidumbre en los resultados en el conjunto de técnicas de restauración, porque impide la determinación precisa del patrón de difracción tridimensional que forma cada sección óptica. Además, las técnicas que comúnmente se utilizan para formar la imagen computacional, no contemplan la varianza espacial planteada en este modelo de formación de la imagen.

Planteados este modelo de formación de la imagen, variante en el espacio, y los principales problemas que hacen a la formación de la imagen computacional, la investigación se orienta a resolver dos aspectos de importancia, y para ello se destinan dos capítulos por separado. En el [Capítulo 3](#) se analizan las formas de determinación de la [PSF](#) bajo el modelo de formación de la imagen propuesto en el [Capítulo 2](#). Particularmente, en este capítulo se presenta un nuevo método de estimación de parámetros para el modelo de Gibson y Lanni, desarrollado en la presente tesis. El método se aplica a la estimación de la posición de una fuente puntual a lo largo del eje óptico. El propósito es contar con un método que permita mapear las secciones ópticas a sus posiciones correspondientes en el eje óptico.

Adicionalmente, este método es comparado con otras técnicas de estimación comúnmente utilizadas, considerando diferentes condiciones de ruido en las imágenes de la fuente puntual. El principal aspecto metodológico para la comparación de los métodos de estimación, es su formulación bajo un mismo criterio de aproximación. Además, como son métodos estadísticos de estimación de parámetros, se considera la [cota inferior de Cramér-Rao \(CRLB, Cramer-Rao Lower Bound\)](#) como límite teórico de la varianza de las estimaciones. También se plantea un conjunto de medidas prácticas de comparación. De estas se destaca, principalmente, el porcentaje de éxito. Esta es una medida estadística no paramétrica muy simple, que permite determinar mediante simulaciones la probabilidad que tiene un método de estimación de converger a la solución.

El otro aspecto de importancia estudiado en esta tesis, que ataca el problema de la formación de la imagen computacional, es la restauración de imágenes, para el cual se destina el [Capítulo 4](#). En este se analizan las técnicas de restauración de imágenes actualmente utilizados en [MFCA](#) y se las estudia bajo las condiciones de captura mencionadas precedentemente y frente a diferentes situaciones de ruido. Para ello, se utiliza una imagen patrón generada artificialmente, la cual es

degradada de acuerdo al modelo de formación de la imagen digital previamente planteado. Este patrón posee todos los detalles discernibles a simple vista, y se utiliza una tabla de colores para identificar niveles de intensidad. Sin embargo, al ser procesado de acuerdo al modelo mencionado, todos sus detalles se ven degradados sustancialmente.

En este capítulo destinado la restauración de imágenes, y en particular, como desarrollos propios de este autor, se presentan una estrategia de desconvolución por estratos, que utiliza un método de ventaneo para separar capas que se asumen invariantes en el espacio, y dos algoritmos de restauración para **MFCA** propiamente dicho. Todos los algoritmos estudiados en este apartado se basan en técnicas iterativas clásicas. Como parte de la investigación, todas estas técnicas se analizan comparativamente. En primer lugar, y dado que los algoritmos poseen ciertos parámetros de ajuste, se buscan las mejores condiciones de desempeño de los mismos. Una vez ajustados estos parámetros, se analiza la calidad de la corrección de los algoritmos estudiados separándolos en tres grupos de resultados. El primer grupo corresponde a los resultados obtenidos en la aplicación de algoritmos de desconvolución, en los que se asume una única **PSF** invariante en el espacio. El segundo grupo corresponde a los resultados obtenidos en la desconvolución por estratos, donde se asume que la **PSF** es invariante en capas a lo largo del eje óptico. Finalmente, el grupo de resultados de restauración donde se considera una **PSF** tridimensional para cada sección óptica. Para la comparación se utiliza como métrica el error cuadrático medio y un análisis visual de las imágenes resultantes.

Más allá de la conexión de los tres capítulos mencionados precedentemente, **2**, **3** y **4**, cada uno de ellos comprende un bloque de estudio e investigación en particular. Por esta razón, cada uno de estos capítulos posee subsecciones de resultados y, discusión y conclusiones.

El capítulo final, **Capítulo 5**, a modo de epílogo de este informe, está destinado a un breve resumen que repasa los principales aportes de esta tesis, aprovechando el espacio para comentarios sobre algunas dificultades encontradas, nuevos interrogantes y problemas para abordar en un futuro próximo.

En lo que sigue a continuación en el presente capítulo, se presentan los conceptos básicos que sustentan el objeto de estudio de esta tesis desde una perspectiva histórica, que incluye los aportes que en este campo se han logrado a nivel regional. Se realiza un recorte de los hechos y conceptos considerados más representativos, que se proyectan de alguna manera en el actual estado del arte del tema de tesis. Entre estos temas se destacan principalmente: la fluorescencia como fenómeno físico que transporta la señal de interés, el microscopio de fluorescencia de campo amplio y sus componentes fundamentales, las herramientas de análisis y calibración de este tipo de instrumento, dándole importancia a la determinación de la **PSF** y, finalmente, la restauración de imágenes como metodología para la obtención de la imagen computacional.

1.1. Fluorescencia

El primer registro documental del fenómeno de fluorescencia se atribuye al médico Sevillano Nicolás Monardes, quien en 1580 reportó el comportamiento de una infusión para el tratamiento de ciertas patologías renales que, cuando se la exponía a la luz del día, adquiría una tonalidad azulada.

Sin embargo, Monardes no avanzó en la dilucidación del fenómeno físico en sí. Posteriormente, muchas sustancias mostraron el mismo comportamiento, y varios investigadores intentaron explicar el fenómeno.

Recién en 1852, el físico y matemático Irlandés Sir George Gregory Stokes, en su famoso trabajo sobre el cambio de la longitud de onda de la luz [111], sentó las bases para comenzar a explicar el fenómeno de la fluorescencia. Stokes, descubrió que algunos materiales tienen el poder de convertir la radiación ultravioleta invisible, en radiación de longitudes de onda más largas, visibles. Él realizó una serie de experimentos generando un espectro solar con un prisma y exponiendo ante este, tubos con soluciones de compuestos orgánicos (p. ej. quinina) e inorgánicas (p. ej. fluorita) que son transparentes a simple vista. Stokes observó que cuando los tubos se ubicaban en la región visible del espectro, las soluciones se mantenían sin cambios, pero al trasladarlas a la región del ultravioleta las soluciones se tornaban azul-verdosas.

Originalmente, Stokes denominó este fenómeno como reflexión dispersiva, pero al año siguiente lo renombró como fluorescencia, por el mineral fluorita utilizado en sus experimentos. Stokes consideró que la fluorescencia era un fenómeno instantáneo, que cesaba conforme se interrumpía la luz de excitación. Sin embargo, Edmond Becquerel que por esa época estudiaba el fenómeno de la fosforescencia, postuló que ambos se rigen por el mismo principio y que la diferencia reside en que la fluorescencia se extingue más rápidamente. Sin embargo, la mera duración temporal del fenómeno no constituía una explicación suficientemente sólida para explicar el fenómeno, y fue Francis Perrin quien a finales de la segunda década del siglo XX realizó una distinción entre los dos fenómenos, postulando que si la molécula pasaba a través de estados estables y metaestables intermedios había fosforescencia.

A pesar de que la medición de los tiempos no era suficiente, sí era importante. En 1858, Edmond Becquerel construyó el primer fosforoscopio y realizó las primeras mediciones de tiempos de vida media de sustancias fosforescentes. Sin embargo, la resolución temporal del instrumento no era suficiente para los tiempos de vida media de la fluorescencia.

En 1905, Edward Leamington Nichols y Ernest Merrit obtuvieron los primeros espectros de excitación de un colorante y, en 1907, descubren la simetría de espejo entre los espectros de absorción y emisión. Estos investigadores también observaron que el espectro de fluorescencia se extendía más allá del espectro de las ondas de excitación, solapándose con este, algo que no se ajustaba a la ley de Stokes.

Un progreso tecnológico importante fue el desarrollo del argentino E. Gaviola, quien diseñó y construyó en Alemania en 1920 el primer fluorímetro de fase, con resolución temporal de nanosegundos. Gaviola midió los tiempos de vida media de sustancias fluorescentes como la fluoresceína y la rodamina B, de amplia aplicación en microscopia de fluorescencia. En la misma década, Francis Perrin utilizando un método indirecto, midió tiempos de vida media de sustancias fluorescentes con una resolución por debajo de los nanosegundos.

En la actualidad, se sabe que el fenómeno de fluorescencia puede considerarse una forma de luminiscencia. Esto es, una emisión espontánea de luz a partir de especies excitadas electrónicamente, o bien vibracionalmente, sin aumento de temperatura. En particular, en la fluorescencia, a la excitación de la sustancia la produce una radiación. El término fluorescencia, en general, se

aplica a moléculas orgánicas, pero también se aplica a ciertas sustancias inorgánicas, por ejemplo, los nanocristales semiconductores o *quantum dots*, cuyo mecanismo de emisión difiere del de las moléculas orgánicas [116].

La fluorescencia y otros fenómenos asociados a la interacción de la luz con la materia, pueden ser representados y comprendidos a partir del diagrama de Perrin-Jablonsky (ver Figura 1.1). Este es un diagrama de energía, en el cual se representan los estados electrónicos de la molécula y las posibles transiciones entre ellos. En el caso de la fluorescencia molecular, la incidencia de la luz de excitación sobre el compuesto fluorescente provoca el pasaje de un estado energético basal S_0 a uno de mayor energía S_2 en un tiempo que está en el orden de los femtosegundos. A continuación, en el orden de los picosegundos, el electrón retorna a un nivel de energía intermedio S_1 , por medio de fenómenos de conversión interna y relajación vibracional. Finalmente, en un tiempo del orden de los nanosegundos, el compuesto vuelve al estado basal S_0 emitiendo un fotón con la energía correspondiente a la transición entre estos dos niveles. La emisión fluorescente no es el único proceso posible, sino que la desexcitación podría tomar otras vías de retorno al estado fundamental de la sustancia. Se diferencian dos procesos generales, aquellos en los que hay emisión de fotones o radiativos, y aquellos en los que el retorno al estado fundamental no involucran emisión de fotones, o procesos no radiativos.

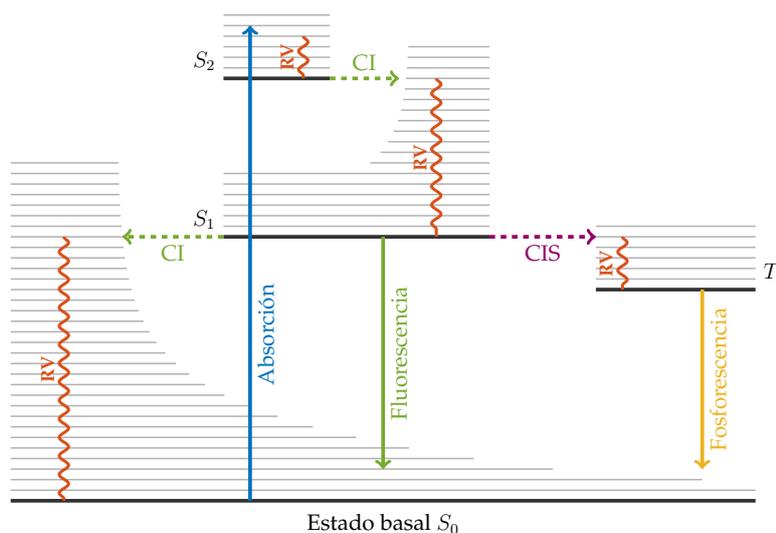


Figura 1.1: El diagrama de Perrin-Jablonsky es una ilustración de los niveles de energía de un átomo o molécula. En las ordenadas se representan los niveles de energía. Las abscisas se utilizan para separar las categorías de estados energéticos: *Singlet* (S_n) o *Triplet* (T_n). Se representan además, diferentes fenómenos que ocurren cuando un átomo o molécula es excitado: Absorción, Fluorescencia, Fosforescencia, conversión interna (CI), cruzamiento intersistemas (CIS) o relajación vibracional (RV).

En fluorescencia, se denominan espectros de excitación y emisión a los conjuntos de longitudes de onda de absorción y emisión de un compuesto, respectivamente. La diferencia entre los picos de los espectros de absorción y de emisión se denomina corrimiento de Stokes [104, Capítulo 5]. A modo de ejemplo, en la Figura 1.2 se representa el espectro de fluorescencia del 2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamide (DAPI), compuesto utilizado ampliamente en la marcación de núcleos celulares.

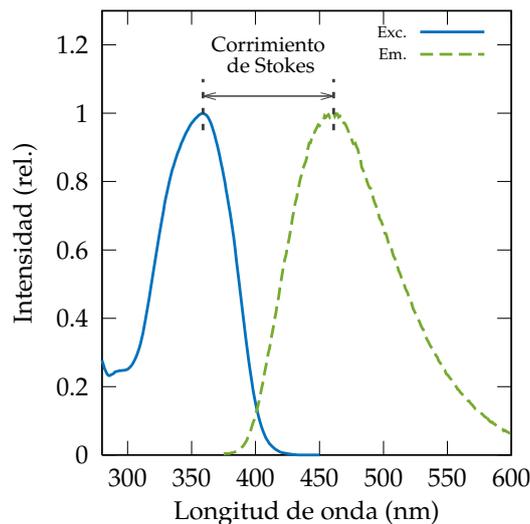


Figura 1.2: Los espectros de excitación y emisión de fluorescencia molecular son distribuciones continuas que indican la probabilidad de que un fotón sea absorbido o emitido por una molécula. La diferencia entre los máximos de cada espectro se denomina corrimiento de Stokes.

El tiempo que cada molécula se mantiene en estado excitado es aleatorio y sigue una distribución exponencial, cuya tasa de decaimiento, k , es la inversa del tiempo de vida media. Este decaimiento de velocidad k está compuesto tanto por procesos radiativos de velocidad k_r , como no radiativos de velocidad k_{nr} . Esto es, $k = k_r + k_{nr}$. En virtud de esta competencia de procesos radiativos y no radiativos, puede definirse el **rendimiento cuántico (QY, Quantum Yield)** como:

$$QY = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}. \quad (1.1)$$

En la práctica el **QY** es un parámetro valioso. Así, si el medio en el que se encuentra inmersa la molécula fluorescente provoca modificaciones de la velocidad de los procesos no radiativos, el **QY** se modifica y, por lo tanto, también el nivel de intensidad de la fluorescencia. Por ejemplo, si aumenta la velocidad de los procesos no radiativos, entonces el nivel de intensidad de la fluorescencia disminuye. Esto le da una gran eficacia a la fluorescencia como herramienta para el estudio de los sistemas biológicos, la cual combinada a alta sensibilidad de las técnicas fluorométricas, puede proveer información de pH, concentración de iones, enlaces puente hidrógeno, presión, viscosidad, polaridad, temperatura, potenciales eléctricos, etc.

En realidad, todas las características de la fluorescencia (intensidad, espectro, rendimiento cuántico, tiempo de vida media, etc.), son afectadas por cualquier proceso que implique interacciones de la molécula en estado excitado con su entorno cercano. Dado que la observación, o medición, de los cambios en las características de la fluorescencia puede proveer información de la dinámica del microentorno de la molécula fluorescente, su uso se ha diversificado como marcador que permite obtener información de parámetros locales, ya sean físicos, químicos o estructurales.

En microscopia de fluorescencia se suele utilizar de forma generalizada los términos sonda o marcador fluorescente, aunque en ciertos casos se suelen denominar indicadores (p. ej. indicador fluorescente de pH). Las sustancias que producen fluorescencia de forma natural, comúnmente se

denominan fluoróforos mientras que, fluorocromos o *tags*, se refiere a aquellas que se emplean para las tinciones o marcaciones en microscopia de fluorescencia.

1.2. Microscopia de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es un modo de microscopia óptica [94] que evolucionó desde finales del siglo XIX hasta la actualidad en un esfuerzo conjunto de científicos e ingenieros para incrementar la resolución y el contraste de las imágenes del microscopio óptico convencional. En general, los desarrollos más importantes se debieron a los logros de las compañías fabricantes de microscopios o de instituciones relacionadas con las mismas. Estos avances se dieron paralelamente a los producidos en ciencia y tecnología entre los que se destacan los de la física moderna, la biología molecular, la electrónica y la informática [81].

Entre los primeros desarrollos asociados a la técnica de microscopia de fluorescencia se puede mencionar el iluminador para microscopios ópticos de Agust Köhler de 1893 en la compañía Carl Zeiss. El propósito del iluminador de Köhler fue lograr la uniformidad del campo de iluminación para el registro fotográfico de las imágenes. Unos años después, en 1904, Köhler desarrolló un microscopio de absorción ultravioleta, predecesor del microscopio de fluorescencia. Este modo de iluminación, tenía como propósito, usar menores longitudes de onda incidentes para mejorar la resolución. En los ensayos de este modo de iluminación, Köhler observó que algunos materiales expuestos a la luz ultravioleta producían fluorescencia.

En 1913, la firma Zeiss introdujo comercialmente un microscopio de campo claro luminiscente. Al año siguiente, la firma de Carl Reichert con una notable mejora del contraste, desarrolló un microscopio de fluorescencia de campo oscuro. Ambos microscopios utilizaban condensadoras de cuarzo y lentes de cristal, en modo transmisión o diascópico. En estos sistemas, la luz ultravioleta incidía sobre el espécimen, sin atravesar la lente objetiva [81].

Otro desarrollo importante para la evolución de la MFCA, consistió en la técnica de iluminación episcópica, debida a Evgenii Brumberg en 1948. En esta técnica se emplea un espejo de interferencia con el doble propósito de direccionar la iluminación hacia la lente objetiva y de separar los rayos de excitación y de emisión. Su invento fue mejorado por Johan Sebastiaan Ploem en 1967, quien desarrolló el espejo dicróico o dicromático [81]. Por la misma época, otro hito fue el desarrollo del microscopio de barrido confocal de Marvin Minsky, precediendo el desarrollo del láser [82, 83]. Este microscopio confocal utilizaba fuente de arco y el barrido se lograba mediante el desplazamiento de la muestra.

La invención del láser en 1960, y sus desarrollos subsecuentes de las últimas cinco décadas, proveyó numerosas fuentes de iluminación para la microscopia de fluorescencia. Aunque los primeros láseres de rubí y gas presentaban limitaciones en el rango de longitudes de onda, los láseres modernos de medio activo líquido y los de estado sólido, proporcionaron una gran variedad de longitudes de onda, anchos de pulso y picos de potencia. En 1982, Zeiss introdujo su primer microscopio de barrido láser. Otros avances tecnológicos de comienzos del siglo XXI en las fuentes láser sintonizables han proporcionado mejores características para la excitación de la fluorescencia.

Los avances en las ciencias biológicas, con el consecuente desarrollo de técnicas de marcación molecular, consolidaron la MFCA como una herramienta fundamental de análisis en laboratorios de biología molecular. En sus comienzos, la MFCA se empleaba en especímenes fijados, pero posteriormente con el descubrimiento de las proteínas fluorescentes, como la proteína fluorescente verde (GFP, *Green Fluorescent Protein*), y la posibilidad de obtener células transformadas por ingeniería genética que las expresen, la MFCA se comenzó a utilizar en experimentos de localización y cuantificación en células vivas, con captura de imágenes tridimensionales e incluyendo la variable del tiempo [104, Capítulo 6 y 7].

En relación con investigaciones y desarrollos en el ámbito nacional, no se ha encontrado producción documentada de mejoras o modificaciones realizadas en microscopía óptica, que impliquen mejoras en la resolución de estos instrumentos. En Argentina, en general, la microscopía óptica se desarrolló fundamentalmente con operadores de las áreas de las ciencias biológicas, la geología y metalografía. En el LAMAE, desde el año 1997, se realiza investigación y desarrollo con el propósito de aportar mejoras a la MFCA. Entre los aportes se pueden mencionar el desarrollo de la técnica de registro de SO [6, 26, 33], desarrollo de algoritmos de desconvolución [35, 36, 37, 117, 46, 119, 118], herramientas de análisis y tratamiento del fotodecaimiento [120, 43] y metodologías de análisis y calibración [3, 41, 19, 40, 44, 113, 45].

Recientemente, un grupo de investigadores argentinos conjuntamente con investigadores del Instituto Max Plank de Alemania reportaron herramientas de mejoras en los microscopios de superresolución [15]. En particular, han aportado al desarrollo de las técnicas de nanoscopías de fluorescencia. La nanoscopías de fluorescencia han quebrado el límite de resolución (clásico) de la microscopía óptica, permitiendo alcanzar resoluciones en el orden de los nanómetros. Las nanoscopías de fluorescencia mantienen las ventajas de la microscopía de fluorescencia tradicional, como la baja invasividad y la alta sensibilidad y especificidad [16]. Estos desarrollos a nivel regional tienen gran relevancia, ya que estas tecnologías se están implementando en el Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION) del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) lo que permite llevar adelante investigaciones, desarrollos y aplicaciones de microscopía de superresolución [17].

Los equipos para MFCA modernos comerciales presentan funcionalidades muy interesantes. En general, los más completos permiten el registro, en forma casi automática, de información cuantitativa multidimensional. Esto es, información espacial, temporal y en distintas longitudes de onda. Actualmente, están más difundidos los microscopios de fluorescencia con estativos invertidos e iluminación episcópica, lo que permite un mejor mantenimiento y manipulación de especímenes vivos.

El diseño y construcción de estos microscopios se realiza intentando minimizar las aberraciones ópticas. Sin embargo, estas no pueden ser anuladas por completo y, en general, los sistemas ópticos siempre presentan algún grado de aberración. En particular, las fuentes de aberración en microscopía de fluorescencia se pueden ubicar en dos grandes categorías. Las que se deben al instrumento y las debidas a la muestra. Adicionalmente, la preparación de la muestra y la operación del microscopio también constituyen importantes y frecuentes fuentes de inhomogeneidad en la imágenes observadas por MFCA [124]. De las aberraciones debidas a la muestra se pueden

mencionar el fotoblanqueo, la autofluorescencia, la absorción y la dispersión.

Las aberraciones debidas al instrumento dependen de las características de los elementos que lo constituyen. Su elección y configuración tienen un profundo efecto en la calidad de las imágenes. La fuente de excitación, las lentes objetivas, los filtros de excitación y emisión y el detector deben ser analizados y elegidos cuidadosamente para lograr imágenes bien contrastadas con alta **relación señal ruido (SNR, *Signal-Noise Ratio*)**.

1.2.1. Componentes fundamentales de un MFCA

Los elementos ópticos de los microscopios de fluorescencia actuales se configuran de forma similar a las de un microscopio óptico estándar. Sin embargo, las lentes objetivas tienen determinados tratamientos y, además, se incorporan elementos ópticos adicionales, para adecuar el sistema a las aplicaciones de fluorescencia. En la Figura 1.3 se representan los componentes que se consideran fundamentales en un equipo de **MFCA**.

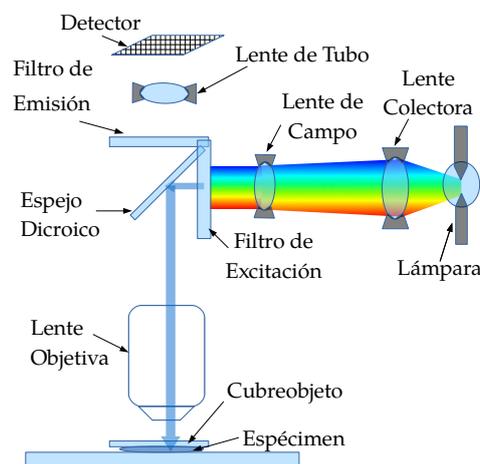


Figura 1.3: Diagrama esquemático de los elementos ópticos fundamentales en un microscopio de epifluorescencia estándar

1.2.1.1. Fuente de luz

Las fuentes de luz más utilizadas en **MFCA** son las lámparas de arco de xenón o mercurio. Estas lámparas producen luz muy intensa en un espectro continuo en el rango del ultravioleta al infrarrojo y, combinadas con un filtro de interferencia apropiado, pueden proveer luz aproximadamente monocromática. Lograr este nivel de brillo tiene como desventajas un tiempo de vida más corto y un alto costo de la lámpara, a lo que se agrega la dificultad de alinear mecánicamente la lámpara, debido a que el arco es muy pequeño (≈ 1 mm). Adicionalmente, del espectro que producen, sólo una quinta parte pertenece al visible, el resto es ultravioleta e infrarrojo, por lo que suelen agregarse filtros de absorción de calor en el camino óptico a continuación de la cubierta de la lámpara [86, Capítulo 3].

Un problema adicional que presentan las lámparas de arco de mercurio, a lo largo de toda su vida útil, son las variaciones en el flujo de iluminación, o parpadeo. Estas se deben a inestabilidades en

la formación y mantenimiento del plasma de iones, que se ve fácilmente afectado por la presencia de campos magnéticos externos y la continua erosión de los electrodos. Hay una inestabilidad de corto plazo que representa de 2 % al 10 % del flujo total de intensidad y está en el rango de los milisegundos a los segundos.

Conforme transcurre la vida útil de la lámpara, el efecto de parpadeo se incrementa tanto en amplitud como en frecuencia. Se suma a esto, un debilitamiento en la intensidad en general, dado que los vapores metálicos que se desprenden de los electrodos se van depositando en la envoltura de vidrio de la lámpara [90, Capítulo 13] [86, Capítulo 3]. En el [LAMAE] se realizaron mediciones de estos fenómenos en el instrumento de referencia y se contribuyó con un desarrollo para atenuar el impacto de estos en el registro secuencial de imágenes (es decir, seccionamiento óptico y secuencias temporales) [41].

Independientemente del tipo de lámpara que se utilice, para obtener un nivel de intensidad de excitación uniforme en todo el campo visual, la lámpara se alinea de forma tal que esté en foco y centrada en el plano focal posterior de la lente objetiva. Cuando se cumple esta condición, la lente objetiva proyecta una imagen fuera de foco de la fuente de luz en el espécimen, proveyendo una intensidad de excitación homogénea sobre este.

1.2.1.2. Filtros para fluorescencia

Los filtros para microscopia de fluorescencia de campo amplio se ensamblan en un conjunto, generalmente denominado cubo de filtros. La luz que proviene de la lámpara para la estimular la fluorescencia encuentra primero el filtro de excitación (ver Figura 1.3), el cual está diseñado para permitir el paso de las longitudes de onda que excitan el fluoróforo. Luego, la luz de excitación es reflejada 90 grados por el espejo dicroico hacia la muestra.

La luz de excitación es uniformemente proyectada en el espécimen por la lente objetiva. Los fluoróforos la absorben y la fluorescencia emitida, recogida por la lente objetiva, debe pasar a través del espejo dicroico para incidir en el detector. Por lo tanto, estos espejos son diseñados para que reflejen las longitudes de onda de la luz de excitación y transmitan las de emisión. Sin embargo, la reflexión de las longitudes de onda de excitación, no es total y una pequeña cantidad de luz atraviesa el espejo dicroico. Adicionalmente, la intensidad de la luz de emisión está muy por debajo de la de excitación. Por lo tanto, la luz de excitación que atraviesa el espejo dicroico debe ser bloqueada antes de llegar al detector, o de lo contrario, contribuirá a la formación de un intenso fondo en la imagen. Este bloqueo se logra con un tercer elemento, el filtro de emisión, denominado también filtro de barrera. El filtro de emisión es seleccionado para transmitir sólo las longitudes de onda de emisión fluorescente [104, Capítulo 7].

Cada filtro del cubo es un filtro de interferencia. Es decir, es un filtro óptico construido de tal manera que la interferencia, tanto constructiva como destructiva, entre las distintas componentes del espectro permiten bloquear o transmitir determinadas longitudes de onda. Estos están contruidos con láminas delgadas de cristal revestidas de sustancias dieléctricas (es decir, materiales eléctricamente aislantes) y de determinado índice de refracción, típicamente sales metálicas transparentes. En algunos diseños también se agregan capas de metales semitransparentes. La interfaz entre dos de

estas capas de distinto índice de refracción refleja la luz hacia atrás y adelante a través del filtro, y es fundamental para producir interferencia constructiva y reforzamiento. La longitud de onda que es reforzada y transmitida depende del espesor y del índice de refracción de las capas dieléctricas.

El proceso de fabricación de los filtros consiste en la deposición de sales por evaporación de materiales en alto vacío. Este proceso es finamente controlado con detectores ópticos de interferencia [86]. Es una elaboración costosa, debido a que depende de la tecnología que genera las capas ultrafinas, de por sí muy dispendiosa, y del control de la manufactura que es muy laborioso y especializado.

Desde el punto de vista del usuario, se debe seleccionar cuidadosamente el fluoróforo y el cubo de filtros apropiado para ese fluoróforo. Generalmente, los espectros de emisión y de excitación de los fluoróforos están disponibles en los sitios web de las compañías que los producen o pueden obtenerse con un espectrofluorómetro. Por su parte, los espectros de reflexión y transmisión de los cubos de filtros también están disponibles en los sitios web de sus fabricantes o bien en las hojas de datos de los microscopios. Con esta información, el microscopista compara los espectros, de forma tal que el fluoróforo sea excitado con la longitud de onda que mayormente absorbe, y que la mayoría de la luz de emisión que proviene del fluoróforo pase a través del espejo dicróico y el filtro de emisión [104, Capítulo 7].

1.2.1.3. Lente objetiva

La lente objetiva es el primer elemento con el que se encuentra la luz que proviene del espécimen. Suele ser el elemento más complejo del microscopio, debido al diseño y proceso de construcción basado en múltiples elementos ópticos. La lente objetiva tiene la función de magnificar y resolver detalles que a simple vista no pueden ser discernidos. Por lo tanto, la calidad de la imagen obtenida con un microscopio depende en gran parte de ella, y está directamente relacionada con su diseño y detalles de fabricación. La mejor resolución que puede proveer una lente objetiva está limitada por la difracción, pero adicionalmente, y como sucede en la práctica, también depende de las aberraciones que introduce el instrumento y la muestra.

Los objetivos se clasifican en dos categorías principales: refractivos y reflexivos. Estas categorías se dividen en dos subtipos según posean distancias finitas o infinitas al plano conjugado. Las lentes más comunes son las refractivas y se encuentran en la mayoría de los microscopios comerciales. En este diseño, la luz que atraviesa el sistema se refracta en los elementos ópticos. Cada elemento óptico posee un tratamiento para evitar, o reducir, los fenómenos de reflexión, mejorando el paso de la luz a través de todo el sistema.

Los objetivos refractivos se utilizan en aplicaciones de visión maquina, que requieren la resolución de detalles muy finos. Los diseños pueden ir desde dos elementos, como los objetivos acromáticos básicos, a quince elementos en objetivos plano-apo-cromáticos. Estos últimos son los más complejos y están diseñados para corregir aberraciones cromáticas y de campo plano [115].

Los objetivos reflexivos, por su parte, se basan en un espejo primario y uno secundario, los cuales magnifican y retransmiten la imagen, respectivamente. Estas lentes no exhiben las mismas aberraciones que las lentes refractivas, debido a que las imágenes son reflejadas por superficies

metálicas. Las lentes reflexivas poseen mayor eficiencia lumínica y también mayor poder de resolución para registrar detalles finos, debido a que el sistema es principalmente dependiente del revestimiento del espejo, en lugar de la calidad del cristal utilizado en las refractivas. Otro beneficio que tienen estas lentes basadas en espejos, frente a ópticas refractivas, es que trabajan en un rango más amplio del espectro óptico [115].

A pesar de estas ventajas, los objetivos basados en espejos presentan coma como defecto de diseño o fabricación. Este tipo de aberración es particularmente importante cuando los rayos provenientes del objeto que se desea observar, inciden sobre la superficie del espejo a diversos ángulos. Este caso es el que se da en lentes objetivas de microscopios, debido a que están cercan de la muestra. Dado que los objetivos reflexivos se construyen en base a dos espejos, es más difícil contrarrestar los efectos de esta aberración con espejos adicionales. En términos generales, corregir coma en lentes reflexivas de microscopios es más complejo que corregir esta y otras aberraciones en lentes refractivas. En este último caso, añadir una o más lentes en el camino óptico permite manipular, con un mayor grado de libertad la propagación de los rayos a través de las mismas, lo que posibilita seleccionar el mejor esquema de propagación que minimice las aberraciones.

La mayoría de las especificaciones de las lentes objetivas de los microscopios están consignadas en la cobertura del barril de la lente. En esta se detallan, entre otros parámetros, magnificación, apertura numérica o NA (del inglés, *numerical aperture*) y espesor del cubreobjetos. Dado que las especificaciones están en la cobertura del barril de la lente, resulta sencillo para el microscopista determinar el resto de los parámetros prácticos de la lente (p. ej. distancia de trabajo). Cualquier especificación faltante, como la longitud focal del campo visual, o la longitud de onda de diseño, puede calcularse a partir de las especificaciones provistas por el fabricante [115].

Dentro de los diversos tipos de microscopios ópticos, los sistemas de microscopia de fluorescencia destinados a la investigación en biología molecular y celular, en general, son instrumentos de excelente calidad y elevados costos. Los fabricantes poseen sus propias herramientas de diseño, producción y evaluación de las ópticas, pero no existen métodos comparativos para definir la calidad de las lentes objetivas. Por lo tanto, y tal como lo plantea Ernst Keller en [91, Capítulo 7], no existen procedimientos independientes y completamente objetivos, accesibles a los usuarios y que permitan evaluar cuantitativamente las prestaciones de las lentes objetivas.

1.2.1.4. Otros elementos ópticos

Los microscopios modernos de grado científico poseen una gran variedad de elementos ópticos adicionales. Sin ser una lista exhaustiva, entre ellos se pueden mencionar al sistema de lentes colector, ubicado cerca de la lámpara de excitación. Su función es recoger la mayor cantidad de luz y orientarla hacia la lente objetiva. En el camino de luz de excitación también se pueden encontrar diversos tipos de filtros, lentes y diafragmas. En este camino óptico, otra lente de relevancia en MFCA es la lente de campo, cuya función es generar un campo amplio y uniforme de iluminación sobre el espécimen.

Por su parte, en el camino óptico de emisión, entre el plano focal trasero de la lente objetiva y el dispositivo de captura, se encuentra la lente de tubo. El principal propósito de esta lente, en

microscopios modernos con sistema de lentes objetivas de distancia infinita al plano conjugado, es formar la imagen en el plano imagen intermedio donde el ocular, o bien la lente de acople del dispositivo de captura, enfoca la imagen. Adicionalmente, los fabricantes compensan ciertas aberraciones en esta lente de tubo.

1.2.1.5. Detector

Actualmente, las imágenes de microscopía óptica se registran mediante una variedad de detectores de fotones. Entre los más utilizados se pueden mencionar los tubos fotomultiplicadores, los **dispositivos de acople de carga (CCDs, Charge-Coupled Devices)** y los dispositivos de **semiconductor de óxido metálico complementario (CMOSs, Complementary Metal-Oxide-Semiconductors)**. Cada tipo de detector posee sus ventajas y limitaciones y su selección se basa en el análisis de las aplicaciones en las que se lo utilizará, considerando que deben cumplir, entre otros requerimientos, con el criterio de muestreo de Nyquist, linealidad de respuesta fotométrica y alta **SNR**.

En general, en microscopía de fluorescencia de campo amplio se utilizan los **CCD**. Estos están compuestos por una matriz de elementos fotosensibles, denominados píxeles, que capturan simultáneamente una imagen en toda la superficie del detector. La información de la intensidad de la luz se almacena como una carga electrónica que es convertida a un voltaje analógico por un amplificador de lectura. Este es digitalizado y convertido a un valor numérico por un conversor generalmente situado en el chip del **CCD**. La extensión de la variación de la señal cuantificada desde los valores de intensidad que devuelve el **CCD** se denomina rango dinámico y se mide en bits. Esta intensidad, en instrumentos de grado científico, es proporcional al número de fotones capturados para un amplio espectro de longitudes de onda [104, Capítulo 10].

El registro electrónico con un **CCD** involucra tres etapas: interacción de la luz con la superficie fotosensible, almacenamiento de la carga liberada y su lectura o medición. Cada píxel del **CCD** absorbe fotones en una región especializada denominada capa de agotamiento. La absorción de un fotón en esta región produce la liberación de un electrón y la consecuente formación de un hueco cargado positivamente en la red de cristal del silicio.

Por lo tanto, inicialmente, los píxeles actúan como pozos de potencial, almacenando la carga durante un intervalo de tiempo dado, denominado tiempo de exposición. La cantidad de carga almacenada es proporcional al flujo de luz en el píxel hasta llenar la capacidad del pozo. Una vez que se recogen las cargas, se aplica una secuencia de pasos de voltajes para desplazar la carga a lo largo de canales de transferencia hacia el amplificador de lectura. La capacidad de almacenamiento de carga de un pozo de potencial en un **CCD** es, fundamentalmente, una función del tamaño físico de los píxeles individuales [104, Capítulo 10].

Las imágenes digitales están inexorablemente contaminadas, en mayor o menor medida, por ruido. Aun en el caso de un detector ideal hay ruido, cuyo origen está en las variaciones aleatorias en el flujo de fotones, es decir, en la señal. En 1993, Donald Snyder y Richard White propusieron un modelo de las distribuciones estadísticas de las fuentes de ruido en dispositivos **CCD**. En este modelo, se incluyen varias fuentes de ruido (excluyendo el de digitalización), que básicamente siguen dos distribuciones, Poisson y Gaussiana [107]. Este conjunto de fuentes de ruido pueden

ser ampliamente separadas en dos categorías, aquel conjunto de fuentes que depende de la señal, o ruido intrínseco y el conjunto de fuentes de ruido extrínseco a la señal.

Básicamente, el ruido intrínseco en un **CCD** sigue una distribución Poisson, cuya densidad de probabilidad está dada por:

$$p(i_n) = \frac{\bar{i}_n^{i_n} e^{-\bar{i}_n}}{i_n!}, \quad (1.2)$$

donde i_n es el número de fotones capturados en el píxel n y \bar{i}_n es la media del proceso Poisson en dicho píxel. Esto pone una cota superior a la máxima **SNR** que puede alcanzar un **CCD**, que se puede determinar, en el caso de no existir ruido extrínseco, como la raíz cuadrada de la señal cuantificada en número de fotones [104, Capítulo 10].

El modelo más común de degradación por ruido extrínseco es el que aparece en forma aditiva a la intensidad de la señal, y en **MFCAs** tiene al menos dos componentes. Uno es el que representa el ruido debido a un nivel de intensidad de fluorescencia de fondo. En este caso, también sigue una distribución Poisson, por la misma razón que el ruido debido a la señal. El otro, más importante desde la ingeniería del instrumento, se origina en el mismo **CCD** y se conoce comúnmente como ruido electrónico.

El ruido electrónico, en general se modela con una distribución Gaussiana. De hecho, los fabricantes de **CCDs** suelen simplificar en un único parámetro los ruidos correspondientes al detector. Este es la desviación estándar, σ_{ro} de la Gaussiana y la media se refiere al nivel de *offset* que el fabricante fija en el **CCD** para evitar lecturas de intensidades negativas.

Brevemente, se puede decir que los **CCDs** presentan básicamente dos tipos de ruido electrónico, el oscuro y el de lectura. El primero corresponde a las fluctuaciones en la cantidad de cargas electrónicas que se acumulan en los pozos de potencial, cuando el detector está en completa oscuridad. Esta acumulación de carga es una consecuencia de la excitación térmica que se da en el **CCD**. Las cargas debidas al ruido oscuro han sido reducidas desarrollando **CCDs** que almacenan huecos, en lugar de electrones. Los **CCDs** de grado científico generalmente están refrigeradas, ya que la acumulación de carga oscura es reducida en un orden de magnitud por cada 20 °C de disminución de temperatura. Así, refrigerando a -20 °C, se reduce el ruido de corriente oscura a un valor que es prácticamente despreciable para la mayoría de las aplicaciones de microscopía [104, Capítulo 10].

El ruido de lectura, por su parte, surge de la conversión de cargas a valores de voltaje, y aumenta con la velocidad de las mediciones de la carga acumulada en cada píxel. Esto se debe a que a mayores velocidades de lectura, se requieren amplificadores de mayor ancho de banda, lo que inevitablemente está asociado a un mayor nivel de ruido. El enfriamiento del **CCD** reduce el ruido del amplificador de lectura, pero hay una temperatura por debajo de la cual el rendimiento del amplificador se reduce [104, Capítulo 10].

1.2.1.6. Imágenes digitales

Como los dibujos de Robert Hooke en *Micrographia*, o las copias realizadas con la cámara lúcida de Wollaston, los detectores actuales, adecuadamente acoplados a la tecnología informática, permiten

la persistencia del registro de las observaciones realizadas con el microscopio como archivos de imágenes digitales.

Actualmente, los archivos de imágenes digitales, además de almacenar información de alguna propiedad del espécimen (p. ej. intensidad de fluorescencia), pueden contener información cuantitativa, ya sea espacial, temporal o ambas, relacionadas a procesos bioquímicos en la célula. Esto es particularmente valioso cuando se utilizan sondas fluorescentes para detectar y analizar moléculas individuales *in vivo*. Por lo tanto, estas imágenes contienen datos relacionados a concentración de proteínas, cinética enzimática, dinámica celular, etc. En consecuencia, para usar el microscopio como un instrumento cuantitativo, la información del registro obtenido se almacena de tal forma, que permite ser manipulada adecuadamente conservando fielmente datos y metadatos [104, Capítulo 15].

Resulta importante mencionar que los sistemas comerciales de microscopía no siguen un estándar para el almacenamiento de los registros, como es el caso de imágenes médicas. Existe una gran variedad de sistemas de microscopía, cada cual con su software y su formato de archivos propietario, que almacena los datos del instrumento de acuerdo a reglas propias. Por lo tanto, es común que las imágenes sean convertidas a formatos más difundidos, entre ellos .jpg o .tiff con la consecuente posibilidad de pérdida de información, ya sea por la compresión (con pérdidas) de los datos, por no exportar los metadatos o bien por ambas. Dependiendo de la información que se pierda en estas conversiones, es posible que no puedan aplicarse las técnicas de procesamiento y análisis, o bien que estas imágenes pierdan su valor científico por completo.

Para resolver este problema, y otros asociados a la gestión de imágenes multidimensionales, se formó un consorcio de fabricantes de microscopios, desarrolladores de software y científicos, con el propósito de desarrollar el entorno abierto de microscopía (OME, *Open Microscopy Environment*). Este define un modelo de datos y una implementación de software que sirven de marco informático en experimentos en ciencias biológicas que utilicen microscopía, incluyendo representación de los parámetros de adquisición, anotaciones y resultados de análisis de imágenes. OME está diseñado para soportar *high-content cell-based screening* como así también aplicaciones tradicionales de análisis de imágenes. El modelo de datos de OME, expresado en *Extensible Markup Language* (XML) y realizado en una base de datos tradicional es tanto extensible como autodescriptivo, permitiendo que pueda acoplarse casi cualquier análisis y registro requerido [55].

1.2.2. Seccionamiento óptico

Las primeras herramientas para la interpretación de la estructura tridimensional en microscopía óptica se originan con la estereología y actualmente siguen siendo ampliamente utilizadas y en continuo desarrollo. Otra forma de obtener información tridimensional es con el uso de microscopios estereológicos. Estos sistemas poseen dos juegos de lentes dispuestas de forma tal que cada lente proyecta una imagen en cada ojo, permitiendo al operador tener una visión tridimensional del espécimen observado.

Las técnicas tomográficas también se han desarrollado en el área de la microscopía óptica [77, 82, 102, 8]. La más aplicada en MFCA es el SO. Fue desarrollada y aplicada desde las primeras

décadas del siglo pasado [77]. Desde un punto de vista empírico, en esta técnica se registra una secuencia de imágenes, enfocando a distintas posiciones a lo largo del eje óptico las estructuras de la muestra. Originalmente, el SO se realizaba manualmente, registrando en papel fotográfico la secuencia de las imágenes. Para realizar las secciones ópticas de manera controlada y precisa, se disponía de un transportador centrado en el tornillo micrométrico del microscopio. Los avances en óptica, ingeniería y ciencias de las imágenes han llevado al SO a un nivel de automatización que actualmente permite autoenfocar, definir regiones de interés y realizar SO con una gran precisión, capturando automáticamente imágenes multidimensionales.

En el LAMAE entre los años 1997 y 2004 se desarrolló un microscopio de SO basado en un microscopio de fluorescencia de campo amplio [6, 26, 33, 21]. Desde el año 2003 al presente se han desarrollado métodos de desconvolución para corregir las aberraciones en las imágenes obtenidas por SO [35, 36, 37, 117, 46, 119, 118]. También se desarrollaron metodologías de calibración para MFCA [41, 19, 40, 44, 113, 45].

1.2.3. Técnicas asociadas a la MFCA

La elección del marcador fluorescente y el tipo de marcación que se realiza en los especímenes depende de la aplicación. Debido a esto, algunas de estas técnicas pueden desarrollarse para ser registradas con MFCA, con los componentes fundamentales descritos anteriormente, pero otras requieren de elementos tecnológicos adicionales que cambian la configuración del microscopio, o bien de otro tipo de microscopio de fluorescencia. En esta sección se revisan las técnicas utilizadas para la marcación fluorescente de especímenes, con el propósito de dar una visión general, pero no exhaustiva, de las mismas.

La inmunofluorescencia es una técnica ampliamente utilizada para la visualización y cuantificación de la distribución de componentes celulares específicos (p. ej. proteínas) en células y tejidos. Básicamente, hay dos formas de realizar este método: el directo, en el que los anticuerpos primarios son marcados con una sonda fluorescente y se unen directamente al antígeno. En esta técnica, la especificidad, dada por la relación antígeno-anticuerpo, del método es alta, pero, en general, la señal fluorescente es débil. El segundo método, es el indirecto. En este, un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo, es utilizado para reconocer al anticuerpo primario. Esta modalidad confiere mayor disponibilidad de sitios a los cuales el anticuerpo secundario puede acoplarse. Posee menos especificidad, pero se logra una señal fluorescente notablemente más intensa que en el primer caso [124, Capítulo 12].

La técnica de inmunofluorescencia se utiliza para obtener la localización espacial de proteínas tales como receptores, canales iónicos, proteínas del citoesqueleto, enzimas, etc. Esta técnica habitualmente es empleada en tejidos fijados, lo que resulta en al menos dos limitaciones. Por un lado, se requiere el procesamiento del tejido y el posterior seccionamiento físico seriado, lo que puede introducir artefactos, debido al efecto de corte de la cuchilla. Otro impedimento es que la estructura y la función no pueden ser analizadas en forma dinámica [124, Capítulo 12]. Esta técnica también puede ser aplicada *in vivo* en cultivos celulares y en montajes completos de organismos pequeños. Sin embargo, sus aplicaciones están más restringidas, debido a las manipulaciones que deben previamente a la marcación.

Otra técnica utilizada para visualizar y localizar específicamente secuencias de ADN y ARN, es la **fluorescencia por hibridación *in situ* (FISH, *Fluorescence in situ Hybridization*)**. Esta técnica ha sido muy empleada para diagnóstico e investigación. Entre las principales aplicaciones se incluye el rastreo de aberraciones genéticas prenatales y posnatales, diagnósticos genéticos de preimplantaciones, genética de cáncer y biología molecular del desarrollo, entre otras. La **FISH** permite el análisis microscópico de anomalías cromosómicas tales como el aumento o disminución del número de cromosomas, traslocaciones, etc. [124, Capítulo 12].

Cuando se requiere la identificación y el análisis de moléculas funcionalmente relacionadas se pueden emplear análisis cuantitativos de colocalización. Estos involucran el análisis simultáneo de la ubicación y expresión de múltiples moléculas blanco. La aplicación más común es determinar la colocalización entre dos (o más) proteínas marcadas con diferentes fluoróforos. El análisis de colocalización cuantitativo permite estimar la distancia a la cual dos o más proteínas se encuentran en una región celular o tisular. Esto habilita el mapeo de potenciales interacciones proteína-proteína con precisión subcelular, proveyendo, por lo tanto, una mejor comprensión de cómo son regulados los mecanismos intracelulares. En términos de análisis de imágenes, esto involucra la cuantificación del solapamiento de canales [124, Capítulo 12].

Otra aplicación de la microscopia de fluorescencia es la relación de imágenes, o *ratio imaging*. Esta técnica está representada por tres métodos principales, a saber, relación de marcado combinacional, hibridación genómica comparativa y registro de relación iónica. El principio en el que se basa esta técnica es que la relación de intensidades, de dos o más longitudes de onda, computadas sobre un píxel o región de interés, evita los problemas asociados con las variaciones de intensidad en imágenes de una única longitud de onda. La técnica consiste en introducir en la célula un marcador fluorescente sensible a la concentración iónica, y luego registrar dos imágenes. La primera imagen es adquirida en el canal de la longitud de onda de emisión de análisis, y la segunda imagen se la obtiene en un canal a una longitud de onda de referencia. La medición establece una relación de los cambios de nivel de gris en la misma ubicación pero a diferentes longitudes de onda [124, Capítulo 12].

Otra técnica aplicada en la **MFCA** es la **transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET, *Förster Resonance Energy Transfer*)**, que puede ser utilizada para extraer información del entorno cercano (en el rango de los nanómetros) de moléculas marcadas con fluoróforos. Permite detectar interacciones macromoleculares y determinar la proximidad intra- e intermolecular de fluoróforos apareados. La **FRET** involucra la transferencia de radiación de un fluoróforo donante a un fluoróforo aceptor, apropiadamente posicionado. La **FRET** ocurre cuando hay un solapamiento significativo de los espectros de emisión del donante y el de absorción del aceptor [124, Capítulo 12].

La técnica denominada **registro de imágenes del tiempo de vida media de la fluorescencia (FLIM, *Fluorescence Lifetime Imaging*)** permite la medición del tiempo de decaimiento de un fluoróforo en estado excitado al estado basal. En las mediciones de **FLIM**, se obtiene una serie de imágenes de fluorescencia a alta velocidad. Generalmente, la detección se realiza luego de un pulso de excitación laser en el campo de visión o en la región de interés. El tiempo de vida media de la fluorescencia se calcula píxel a píxel asumiendo un decaimiento monoexponencial. Se realiza un ajuste de curvas, y los tiempos son determinados por la técnica de mínimos cuadrados [124, Capítulo 12].

La técnica [recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueo \(FRAP, *Fluorescence Recovery After Photobleaching*\)](#) se utiliza para estudiar la dinámica de moléculas marcadas, específicamente el comportamiento de proteínas en células vivas. El proceso implica el fotoblanqueo de una región de interés. Esto permite el estudio temporal de la consecuente recuperación de la fluorescencia en dichas regiones, resultado del movimiento de moléculas no blanqueadas de los alrededores hacia la región fotoblanqueada [\[124\]](#), Capítulo 12].

1.3. Herramientas de análisis y calibración

El parámetro más importante de un microscopio es su resolución o poder de resolución. Este se define como la capacidad que tiene el instrumento para reproducir en la imagen, las estructuras existentes en el espécimen. En óptica, la resolución se define como la distancia mínima que deben estar separadas dos fuentes puntuales para ser reconocidas como objetos independientes. No existe una única manera de determinar esta distancia. Sin embargo, tanto en microscopía óptica convencional como de fluorescencia hay dos criterios comúnmente usados para medirla. Uno es la distancia de Abbe [\[1\]](#), [\[124\]](#), una aproximación utilizada desde 1881, que corresponde al diámetro a la mitad de la amplitud del pico central de la [PSF](#) y se puede determinar por:

$$r_{\text{Abbe}} = 0,5 \frac{\lambda}{\text{NA}}. \quad (1.3)$$

El otro criterio para establecer el poder de resolución de un microscopio es el radio del disco de Airy. Este corresponde al primer cero de la [PSF](#) en el plano imagen de una lente con una apertura circular, el cual puede ser calculado mediante:

$$r_{\text{Airy}} = 0,61 \frac{\lambda}{\text{NA}}. \quad (1.4)$$

Otra herramienta muy utilizada para la calibración de microscopios es la [función de transferencia de modulación \(MTF, *Modulation Transfer Function*\)](#), esta es un instrumento muy eficiente para el análisis de sistemas que producen imágenes en general, porque describe en términos cuantitativos la relación objeto-imagen, estableciendo un marco de comparación para analizar sistemas que pueden estar compuestos por varios componentes electrónicos y ópticos. La [MTF](#) describe el porcentaje de modulación o cambio en contraste que ocurre en dispositivos que permiten manejar señales de entrada y salida [\[86\]](#). En microscopía óptica, se la ha utilizado principalmente en los registros de video microscopía [\[67\]](#).

En la actualidad, la herramienta más empleada para análisis y calibración de sistemas de microscopía óptica es la [PSF](#). Corresponde a la imagen de una fuente puntual teórica, y es una medida del poder de resolución de un sistema óptico [\[87\]](#). Su determinación puede ser clasificada como experimental, teórica o analítica [\[124\]](#), Capítulo 14] [\[99\]](#). La determinación teórica, responde a un conjunto de ecuaciones matemáticas que describe el modelo físico de las ópticas. En algunos modelos, los parámetros se basan en los datos del instrumento y las condiciones de captura, mientras que en otros, los parámetros son puramente matemáticos [\[54\]](#), [\[80\]](#), [\[99\]](#), [\[124\]](#).

Las principales ventajas de la determinación de la **PSF** en forma teórica son la posibilidad de realizar el modelado de ciertas aberraciones y la ausencia de ruido, siendo esto de gran utilidad en restauración de imágenes. No obstante, es común que en la práctica no se conozcan con exactitud y precisión los detalles para completar los parámetros del modelo, por lo tanto los resultados predichos suelen estar alejados de la situación real. Se suma a esto, que también es muy frecuente en la práctica, que el modelo sea insuficiente para describir la realidad que se desea representar [105].

En la determinación experimental de la **PSF** se utilizan esferas fluorescentes cuyo tamaño está por debajo de la resolución del microscopio. En la forma de operación convencional, las esferas son colocadas y registradas en la cara inferior del cubreobjetos, generalmente, sin tomar en cuenta las condiciones experimentales en las que operará el microscopio. Esta forma de determinación es muy frecuente en la calibración de microscopios de fluorescencia, ya que permite revelar aberraciones que no pueden establecerse de otro modo [75, 3]. Algunas de estas aberraciones pueden corregirse con los distintos elementos de ajuste y alineación del microscopio.

La **PSF** experimental suele ser el promedio de varios registros de un conjunto de esferas, cuyo propósito es doble. Por un lado, se disminuye el nivel de ruido y, por otro, se generaliza en un único conjunto de datos la **PSF** del instrumento. Un único registro de una esfera puede tener un nivel de ruido alto para aplicaciones de restauración, y tanto su versión suavizada como así también el promediado de varios registros, tiene el inconveniente de presentar una resolución más pobre que la teórica. Para reproducir en la **PSF** las condiciones experimentales, las esferas deberían ser registradas en las mismas condiciones que en las que se captura el espécimen, *in situ*. Una forma de hacerlo, es embebiendo las esferas en la muestra, representando más exactamente la situación de captura.

En general, en la determinación experimental de la **PSF** se asume que esta es invariante en el espacio. Podría decirse que, para cortes finos, menores a $5 \mu\text{m}$, la incidencia del espécimen en la **PSF** puede ser despreciable, pero cuando se trabaja con especímenes de mayor espesor, su presencia introduce artefactos y aberraciones en las imágenes. De hecho, bajo las condiciones en las que se realiza el estudio en esta tesis y despreciando la incidencia del espécimen en la **PSF**, la observación de una sección óptica a profundidades diferentes de las que habilita el diseño de la lente objetiva, introduce aberraciones esféricas [54].

Para estimar la resolución de un microscopio a partir de una determinación experimental o teórica de la **PSF** se puede utilizar el **ancho completo a la mitad del máximo (FWHM, Full Width at Half Maximum)**. Esta es una medición fácil de realizar y da una idea bastante precisa de la resolución del microscopio [104, Capítulo 26]. Básicamente, consiste en determinar el ancho de la **PSF** a la mitad del pico de intensidad de la **PSF**. El **FWHM** aplicado a la determinación experimental de la **PSF** también es utilizado en aquellas situaciones en las que se desconocen los detalles de las lentes y sus condiciones de uso. Así, explorando distintas configuraciones podría evaluarse cuál es el conjunto que produce el **FWHM** más estrecho, para así deducir el mayor poder de resolución del microscopio.

Un tercer modo de determinación de la **PSF** es mediante técnicas de estimación. Esta tendría su origen en el algoritmo paramétrico de desconvolución ciega [80], de aplicación en microscopia

óptica. Consiste en el ajuste de un modelo teórico paramétrico de la **PSF** a los datos de un registro de una **PSF** experimental. Esta metodología se ha desarrollado más recientemente en **MFCA**, tal vez como consecuencia de la emergencia de nuevas aplicaciones como por ejemplo la microscopia de localización [31, 97, 88].

Las contribuciones en este campo están representadas principalmente por los trabajos realizados por Hanser et al. [63], Aguet et al. [11], Mortensen et al. [85] y Kirshner et al. [73]. Estos autores contribuyeron con algoritmos destinados a estimar los parámetros de la **PSF** de un modelo teórico a partir de datos reales. Hanser et al. [63] desarrolló una metodología para estimar los parámetros de un sistema de microscopia usando algoritmos de recuperación de la fase de la función pupila a partir de datos experimentales. Aguet et al. [11] y Kirshner et al. [73] contribuyeron con algoritmos que estiman los parámetros del modelo teórico de Gibson y Lanni a partir de datos reales. Adicionalmente, Aguet et al. [11] investigó la factibilidad de la localización de partículas a partir de secciones desenfocadas, analizando la **CRLB**.

Desde principios de este siglo se han realizado esfuerzos para evaluar comparativamente, la eficiencia de los distintos métodos de estimación de parámetros de la **PSF** aplicados a microscopia óptica. Uno de los primeros estudios fue realizado por Cheezum et al. [25], quienes compararon cuantitativamente el rendimiento de cuatro métodos comúnmente utilizados en problemas de seguimiento de partículas: correlación cruzada, suma de diferencias absolutas, centroide y ajuste Gaussiano directo. Los autores encontraron que el algoritmo de correlación cruzada resultó el más exacto para partículas grandes y para fuentes puntuales más pequeñas, mientras que el ajuste Gaussiano directo a la distribución de intensidades, es superior en términos de exactitud y precisión, así como también más robusto a baja **SNR**.

Otro estudio comparativo es el de Abraham et al. [2], quienes compararon el rendimiento de los métodos de estimación por máxima verosimilitud y mínimos cuadrados para ajustar datos de moléculas únicas bajo diferentes escenarios de captura y ruido. Los resultados mostraron que ambos estimadores, en promedio, son capaces de recuperar la verdadera localización de una molécula, en todos los escenarios analizados. En particular, encontraron que, bajo errores de especificación del modelo y niveles bajos de ruido, el método de máxima verosimilitud es más preciso que el método de mínimos cuadrados no lineales. Abraham et al. [2] utilizaron perfiles Gaussianos y de Airy para modelar la formación óptica de la imagen y el estudio del efecto de la pixelación en los resultados de los métodos de estimación.

Los antecedentes citados precedentemente, constituyeron avances importantes en la investigación y el desarrollo de herramientas para la determinación precisa de la **PSF**. Sin embargo, de acuerdo a la literatura disponible, se han desarrollado escasas formas de estimación de la **PSF** más realistas. En general, se emplean perfiles Gaussianos o de Airy, y no existen estudios comparativos que analicen, en situaciones próximas a la realidad, métodos de estimación de parámetros de un modelo físico de **PSF**. Además, no se ha analizado qué sucede con estos métodos cuando se emplean condiciones diferentes de las empleadas en su obtención.

En relación a los problemas planteados en el párrafo anterior, el aporte que se hace en esta tesis, centralizado en el **Capítulo 3**, tiene que ver las formas de determinación de la **PSF** bajo el modelo de formación de la imagen propuesto en el **Capítulo 2**. Particularmente, en este capítulo se presenta un

nuevo método, desarrollado por este autor, para la estimación de parámetros del modelo de Gibson y Lanni. El método se aplica a la estimación de la posición de una fuente puntual a lo largo del eje óptico. El propósito es contar con una herramienta que permita mapear las secciones ópticas a sus posiciones correspondientes a lo largo del eje óptico. Como ya se mencionó en la introducción, este parámetro fue seleccionado debido a su importancia en la formación de la imagen computacional y su aplicación en técnicas de restauración [70, 71]. También es importante mencionar la importancia de la estimación de este parámetro en microscopía de localización [31, 97].

Además, y como parte de la investigación realizada, este nuevo método es comparado con otras formas de estimación comúnmente utilizadas, considerando diferentes fuentes y niveles de ruido en las imágenes de la fuente puntual. El principal aspecto metodológico para la comparación de los métodos de estimación, es su formulación bajo una misma aproximación numérica. Dado que estos algoritmos obtenidos resuelven computacionalmente la formulación de estos métodos estadísticos de estimación de parámetros, se considera a la **CRLB** como límite teórico de la varianza de las estimaciones. También se plantea un conjunto de medidas prácticas para la comparación, de las cuales se destaca, principalmente, el porcentaje de éxito. Esta es una medida estadística no paramétrica muy simple, que permite determinar la probabilidad que tiene un método de estimación de converger a la solución.

1.4. Restauración de imágenes de microscopía óptica

En la formación computacional de imágenes, el proceso de restauración de imágenes se refiere a la recuperación de datos originales (desconocidos) utilizando técnicas computacionales, a partir de datos registrados, que son una versión degradada de los primeros. Esta degradación puede ocurrir durante la formación de la imagen, su transmisión, almacenamiento o ambas; pudiendo asumir diversas formas, incluyendo varias fuentes de ruido, borrono variante o invariante, *aliasing*, artefactos de compresión, etc. [58].

La reconstrucción de imágenes también pertenece al campo de la formación computacional de imágenes, pero a diferencia de la restauración, los datos a partir de los cuales se construye la imagen resultan de la interacción entre el objeto desconocido y la dispersión de algún tipo de onda incidente. En general, ya sea restauración o reconstrucción, para la formar la imagen computacional, el proceso a través del cual, se asume, se obtuvieron los datos debería ser revertido. Este proceso se denomina en forma general problema inverso.

No está claro quién o quiénes formularon por primera vez el concepto de problema inverso en su forma general. En algunos reportes, se atribuye a Euler a mediados del siglo XVIII, mientras que en otros a Tikhonov en el siglo XX, pero no se ha encontrado documentación consensuada del origen del concepto. Recientemente, Aliaga [12] considera que el primer planteo conceptual de problema inverso fue formulado en 1929 por el astrofísico Armenio-Soviético, Viktor Ambartsumian, de acuerdo a información extraída de un libro con una selección de sus artículos [13].

Los problemas inversos constituyen un campo de investigación muy activo en las ciencias matemáticas, así como en otras disciplinas científicas y en la ingeniería. En particular, en la formación computacional de imágenes, es un tema fundamental y de frecuente abordaje, debido a que la

formación de estas involucra un proceso (o un conjunto de procesos), desde el cual se debe extraer (revertir, inferir, medir indirectamente, etc.) las propiedades de los objetos, o fenómenos, observados. En general, los problemas inversos resultan de difícil resolución, porque la información con la que se cuenta es limitada y se deben recuperar los datos que generaron esa información. Un ejemplo que ilustra, la complejidad de los problemas inversos, es el dado por Ribes y Schmitt [95]: *... si se le pregunta a alguien ¿cuánto es $1 + 2$?, responderá 3; pero si la pregunta es planteada al revés, ¿qué par de números sumados da 3? la respuesta no es tan simple, ya que existen soluciones infinitas.*

Los problemas inversos pertenecen al conjunto de los denominados problemas mal propuestos o mal formulados (del inglés, *ill-posed*). Estos no cumplen con la definición del matemático Jacques Hadamard, quien estableció que un problema bien propuesto (del inglés, *well-posed*), debe cumplir plenamente las condiciones de existencia, unicidad y estabilidad [61, 95]. Una anécdota de interés histórico es que Hadamard, contrariamente a lo que se piensa actualmente, creía que los problemas mal propuestos son artificiales y no describen problemas físicos reales. Sin embargo, estos problemas surgen de forma natural en la forma de problemas inversos en diversas áreas de la ciencia y la ingeniería [61].

Los problemas inversos, en sentido amplio, pueden clasificarse como lineales y no lineales. En los primeros hay una relación de linealidad entre entradas y salidas del sistema, mientras que en los problemas inversos no lineales, esta relación es más compleja [69, Capítulo 1] [61, Capítulo 1].

En el campo de las imágenes, una interesante aplicación de problema inverso no lineal, que pone en evidencia su complejidad, es el problema inverso de la tomografía de impedancia eléctrica (EIT, *Electrical Impedance Tomography*). Este fue formulado por el ingeniero y científico argentino Alberto Calderón en 1980, aunque se cree que el planteo del problema, ocurrió varias décadas antes [27, Capítulo 19]. La EIT es una técnica de diagnóstico no invasiva, que permite determinar la conductividad eléctrica de una sección transversal del cuerpo, mediante mediciones con electrodos de superficie.

Los problemas inversos lineales parten de un modelo o problema directo que contiene la integral de una función, o la de la composición de varias funciones, situación que frecuentemente se da en la formación de imágenes ópticas. Por ejemplo, la intensidad registrada en un píxel de una CCD, corresponde a la integral del espectro de intensidades multiplicada por la sensibilidad del mismo, que también depende de la longitud de onda. También corresponde a una integración, el número de fotones que llega al sensor en el intervalo de tiempo en el cual este es expuesto. Asimismo, el efecto pixelación, también corresponde a una integración, ya que la intensidad final en un píxel corresponde a la acumulación de fotones provenientes de diferentes regiones del espacio.

En cada uno de estos casos, la información a recuperar o revertir, depende de la aplicación. En el caso de la restauración de imágenes ópticas, por ejemplo, que involucran múltiples longitudes de onda, se busca conocer las componentes espectrales que producen un determinado color en un píxel de la imagen. Para esto se debe conocer cómo se forma la imagen, es decir, tener un modelo del instrumento y del fenómeno. De manera similar, pero en otra aplicación, en un SO cada sección óptica proyecta una porción del espacio tridimensional donde reside el espécimen en uno bidimensional, en el que se forma la imagen, y, a partir de los datos capturados, de la información

del instrumento y del fenómeno, se intenta la restauración de la información tridimensional.

Resumiendo, esta naturaleza integral de la formación de la imagen puede ser expresada matemáticamente de la siguiente manera:

$$i(\bar{x}) = \int_{\mathbb{X}} h(\bar{x}, \bar{x}') o(\bar{x}') d\bar{x}', \quad (1.5)$$

donde i es la imagen (observación, medición, distribución de intensidades, etc.) en la posición espacial \bar{x} de la propiedad (fenómeno, distribución de fluorescencia, etc.) o , que se observa. h es el núcleo (del inglés, *kernel*) de la integral, el cual puede tener diversos significados físicos. Podría ser, por ejemplo, la función de transferencia espectral o la **PSF**, dependiendo de la aplicación. \mathbb{X} es el espacio donde \bar{x}' es integrada. La integral de la ecuación (1.5) también se la denomina integral de Fredholm de primer tipo [61].

Cuando los datos son discretos, tal como ocurre en muchas aplicaciones actuales, los problemas inversos lineales están íntimamente relacionados al álgebra lineal y al análisis de matrices. Esto es así, debido a que la versión discreta de la integral de la ecuación (1.5) puede ser expresada en términos de una sumatoria:

$$i_n = \sum_N h_{n,n'} o_{n'}, \quad (1.6)$$

donde n representa la posición espacial discretizada y N la porción del espacio en donde se realiza la suma utilizando la variable de referencia n' . Esta sumatoria puede representarse en forma de la multiplicación de una matriz por un vector. Esto es:

$$\mathbf{i} = \mathbf{H}\mathbf{o}, \quad (1.7)$$

donde \mathbf{i} y \mathbf{o} son los vectores imagen y objeto, respectivamente.

En el caso bidimensional, estos vectores se construyen apilando consecutivamente las filas del arreglo que almacena los datos tanto de la imagen como del objeto. Si el problema directo tiene más de dos dimensiones, como es en el caso del muestreo por **SO**, una vez finalizada la primera sección óptica, se continúan apilando las filas de la siguiente y así sucesivamente, hasta finalizar el último plano. La matriz \mathbf{H} es una matriz que se construye a partir de la discretización del núcleo h de la ecuación (1.5). Planteado así entonces, el problema inverso de la restauración consiste en encontrar \mathbf{o} dados \mathbf{i} y \mathbf{H} .

Como se puede observar en la representación matricial de la ecuación (1.7), surge la dificultad de la inversión de matriz \mathbf{H} . Generalmente, \mathbf{H} es una matriz singular o, en el mejor de los casos, está mal condicionada. Esto significa que un pequeño cambio en la entrada provoca grandes variaciones en la salida.

Desde una perspectiva intuitiva, en la formación de imágenes ópticas, por ejemplo, la función h suele tener un pico central que decae rápidamente a cero. Generalmente, el pico y las regiones circundantes, tienen una extensión pequeña comparada a las dimensiones de las imágenes que

se procesan. Esto conduce a que en la discretización de h para construir la matriz \mathbf{H} , gran parte de los valores sean cero o muy próximos. Por lo tanto, los renglones de la matriz \mathbf{H} poseen una gran cantidad de valores pequeños o cero y, además, son bastante similares. De hecho, en ciertas condiciones, los datos en una fila de \mathbf{H} son sólo una versión desplazada de las filas localizadas inmediatamente por encima y por debajo. Matrices con valores en un entorno a la diagonal principal, se denominan bandeadas y presentan ciertas ventajas numéricas y de almacenamiento, pero heredan las dificultades numéricas si están mal condicionadas [24].

Sin que su incidencia sea tan crítica, otro problema que aparece en los problemas de reconstrucción y restauración de imágenes, es el tamaño que puede tomar \mathbf{H} . Esto se debe a que las dimensiones de la matriz \mathbf{H} deben coincidir con las del vector imagen, \mathbf{i} . Si la imagen a procesar tiene N filas y M columnas, entonces el vector \mathbf{i} tiene una longitud $N \times M$, por lo tanto la matriz \mathbf{H} tiene dimensiones $NM \times NM$. Si la imagen considerada es tridimensional, entonces las dimensiones de la matriz \mathbf{H} vienen dadas por el producto de las tres dimensiones. Por ejemplo, una imagen tridimensional pequeña, de $64 \times 64 \times 64$ vóxeles, requiere una matriz de $64^3 \times 64^3$ elementos. Si adicionalmente se considera que los datos se representan en doble precisión, esto resulta en una limitante para la mayoría del hardware de cómputo del que disponen los usuarios comunes.

Desde un punto de vista numérico, existen dos estrategias para la resolución de los problemas inversos como el formulado en la ecuación (1.7): la directa y la iterativa. En la primera, se llega a la solución en un número de pasos preestablecidos. Por ejemplo, la eliminación gaussiana, o bien el método de Gauss-Jordan. Estos métodos exhiben inconvenientes con los errores de redondeo, que, si bien pueden ser mejorados con una representación numérica de mayor precisión, técnicas de pivoteo o ambas, no logran buenos resultados en matrices bandeadas [24].

Otras técnicas directas están relacionadas con la factorización de matrices. Por ejemplo, el método LU factoriza la matriz \mathbf{H} en dos matrices triangulares, una inferior \mathbf{L} y una superior, \mathbf{U} . Este método requiere obligatoriamente la aplicación de un pivoteo previo, para evitar divisiones por cero. La técnica LU es un método general y existen variantes que presentan diferencias en las estructuras de la matriz \mathbf{L} y \mathbf{U} [24].

La descomposición en valores singulares (SVD, *Singular Value Decomposition*) es otro método directo. Este se basa en la factorización de la matriz \mathbf{H} mediante el siguiente producto $\mathbf{H} = \mathbf{U}\mathbf{\Sigma}\mathbf{V}^T$, donde \mathbf{U} y \mathbf{V} son matrices ortogonales, que cumplen $\mathbf{U}^T\mathbf{U} = \mathbf{I}$ y $\mathbf{V}^T\mathbf{V} = \mathbf{I}$, y $\mathbf{\Sigma}$ es una matriz diagonal cuyos elementos σ_i son positivos y aparecen en orden decreciente. Estas cantidades σ_i se denominan valores singulares de \mathbf{H} y las columnas de \mathbf{U} y \mathbf{V} son los vectores singulares izquierdos y derechos, respectivamente. La SVD es una técnica robusta a los errores numéricos [62].

La segunda estrategia para resolver numéricamente los problemas inversos lineales es el enfoque iterativo, o de aproximaciones sucesivas. En estos, partiendo de una estimación inicial, la solución se aproxima iterativamente. Estos métodos tienen la ventaja de permitir el control de las fluctuaciones espurias mediante la interacción con la solución conforme se desarrolla. Entre estos métodos se puede mencionar al método de relajación de punto simultáneo, que permite aproximar la solución a

un sistema de ecuaciones mediante la regla:

$$\hat{o}_n^{(k+1)} = \hat{o}_n^{(k)} + \frac{\kappa}{H_{nn}} \left(i_n - \sum_m H_{nm} \hat{o}_n^{(k)} \right), \quad (1.8)$$

donde n representa la posición en los vectores \mathbf{o} e \mathbf{i} y H_{nm} corresponde al elemento de la fila n y de la columna m de \mathbf{H} . El supraíndice entre paréntesis (k) representa la iteraciones. El factor de conversión, κ , adecúa la velocidad de convergencia. Cuando $\kappa = 1$, la técnica se conoce como método de Jacobi.

Otro método iterativo, que incrementa la velocidad de convergencia, es el método de punto sucesivo, el cual es una modificación al método de la ecuación (1.8). En esta técnica, cada valor nuevo o_n , se calcula en base a las estimaciones obtenidas en las ecuaciones previas, o_{n-i} , con $1 \leq i < n$. Este método también se conoce como sobrerrelajación de punto sucesivo [69]. En general, la convergencia de estos métodos está garantizada si la diagonal de \mathbf{H} es dominante. Es decir, si se cumple que $H_{nn} > \sum_{n \neq m} |H_{nm}|$.

1.4.1. Convolución y desconvolución

Si se considera que el problema directo, además de ser lineal, es invariante en el espacio, entonces se habla de integral de convolución. En estas condiciones, el núcleo $h(\bar{x}, \bar{x}')$ de la ecuación (1.5) puede ser expresado en función de la diferencia $h(\bar{x} - \bar{x}')$. Es decir,

$$i(\bar{x}) = \int_{\mathbb{X}} h(\bar{x} - \bar{x}') o(\bar{x}') d\bar{x}'. \quad (1.9)$$

Esta integral de convolución es una muy buena aproximación en una gran variedad de situaciones. Esto ha conducido a que se desarrollen numerosos métodos de restauración, basados en este problema directo, muy difundidos en una multiplicidad de áreas de la ciencia y la ingeniería.

Pese a la existencia de una gran cantidad de material bibliográfico relacionado con el tema convolución, no hay muchos antecedentes que precisen el origen del concepto. Se considera que la operación de convolución fue utilizada por Euler a mediados del siglo XVIII, pero recién a finales del siglo XIX recibió la denominación de convolución (del inglés, *convolution*), siendo esa la traducción más aceptada de *faltung*, palabra del alemán con la que originalmente se nombró esta clase de problema directo [47].

Al igual que en el problema inverso lineal de la ecuación (1.5), la versión discreta del problema de la ecuación (1.9), también puede representarse en forma de sumatoria y matricial. Por tratarse de un caso particular de las ecuaciones (1.5), (1.6) y (1.7), se puede conservar la notación, sin embargo, para representar la convolución entre dos funciones, en general se utiliza símbolo $*$ a modo de operador binario. Entonces para el caso continuo, la integral de convolución tiene la forma:

$$i(\bar{x}) = h(\bar{x}) * o(\bar{x}), \quad (1.10)$$

y para el caso discreto:

$$i_n = h_n * o_n. \quad (1.11)$$

En la convolución, la matriz \mathbf{H} adopta características especiales, dado que el núcleo es el mismo, independientemente de la posición del espacio en la que se encuentre. Por lo tanto, cada fila de la matriz \mathbf{H} es una versión desplazada de la anterior. En la práctica, y como se mencionó anteriormente, el núcleo h es pequeño comparado con los tamaños de las imágenes a restaurar, por lo tanto, si la extensión del núcleo está preestablecida, deben determinarse las condiciones de contorno con las que se completará la matriz \mathbf{H} en la representación matricial de la ecuación (1.7). Hansen et al. [62] Capítulo 4] dan una clasificación detallada e intuitiva de estas matrices en aplicaciones de desbarroneo de imágenes.

La integral de convolución de la ecuación (1.9) tiene otro aspecto que ha sido explotado ampliamente en la desconvolución. Este consiste en una propiedad que establece que la convolución de funciones en el espacio corresponde al producto de funciones representadas en el dominio de las frecuencias de Fourier. Esta propiedad, salvo un factor de escala, también tiene su versión discreta. La convolución involucra desplazamientos, adiciones y multiplicaciones. Pero en el dominio de las frecuencias este número de operaciones puede reducirse a una multiplicación punto a punto en cada frecuencia. La cuestión es qué tan costoso es computacionalmente transformar los datos del dominio espacial al de frecuencias de Fourier. Esto fue resuelto con el algoritmo [transformada rápida de Fourier \(FFT, *Fast Fourier Transform*\)](#), un método computacional rápido para la determinación de la [transformada discreta de Fourier \(DFT, *Discrete Fourier Transform*\)](#).

Jansson [69] clasifica los métodos de desconvolución en lineales y no lineales con restricciones. Para este autor, un método de desconvolución es lineal, si los elementos de la salida (la restauración), pueden ser expresados como una combinación lineal de los elementos de entrada (imagen).

En el caso de los métodos lineales, tanto las técnicas directas como las iterativas comentadas precedentemente han sido estudiadas y aplicadas para el caso de la desconvolución. Si se considera la representación matricial, surge la dificultad de la inversión de matriz, y como ya se indicó, esta formulación matricial presenta el problema de estar mal condicionada, más allá de que en aplicaciones de [MFCA](#), el tamaño también es un factor particularmente importante.

Entre las técnicas iterativas se puede mencionar el método de Van Cittert, quien en 1931 postuló que los datos i_n podrían ser considerados como una primera aproximación $o_n^{(0)}$ a la distribución original o_n . Esto es así, ya que en ausencia de la desconvolución, el usuario generalmente ignora (correcta o incorrectamente) las aberraciones que introduce el instrumental y usa los datos asumiendo que son la mejor representación de la propiedad o fenómeno que mide [69]. Van Cittert supuso que el error de estimación de la imagen, dado por $i(\bar{x}) - i^{(0)}(\bar{x})$, está relacionado con el error en el estimador de la distribución del objeto, $o(\bar{x}) - o^{(0)}(\bar{x})$ [69] y planteó que este error de estimación de imagen puede ser aplicado como una corrección al de la distribución del objeto, produciendo así un nuevo estimador:

$$\hat{o}_n^{(k+1)} = \hat{o}_n^{(k)} + (i_n - h_n * \hat{o}_n^{(k)}). \quad (1.12)$$

Sobre este método básico se han realizado numerosas variaciones, lo que ha permitido el surgimiento de métodos no lineales que exhiben mejores prestaciones. El método de Van Cittert también ha sido identificado con filtros inversos, y también con la solución a sistemas de ecuaciones lineales, por

medio de métodos iterativos de relajación de punto simultáneo (ver ecuación (1.8)). Su convergencia ha sido analizada por Hill and Ioup (1976) según lo cita Jansson en [69, Capítulo 3], Crilly en [69, Capítulo 5] y también por Xu et al. [125].

Otro conjunto de técnicas de desconvolución es el representado por los filtros inversos, de los cuales el filtro de Wiener es uno de los que mejores resultados ha mostrado en la práctica. Esta técnica de restauración considera la estimación de $\hat{\mathbf{o}}$, tal que $\mathbf{H}\hat{\mathbf{o}}$ aproxime a \mathbf{i} en el sentido de mínimos cuadrados [22, 108, 56]. En particular, este método de restauración sólo requiere un cómputo modesto, aunque es muy sensible a la PSF, ya que pequeños errores de especificación de la PSF pueden resultar en artefactos significativos en las imágenes. Este método también puede ser obtenido desde la teoría Bayesiana, conocida como solución de Tikhonov-Miller [103]. El filtro de Wiener suele ser usado en la práctica como una primera aproximación y como atenuador de ruido en técnicas iterativas [22, 121, 103].

Otros métodos lineales se desarrollaron especialmente para ser aplicados en MFCA. Tal es el caso del método lineal regularizado desarrollado por Preza et al. [92]. Esta técnica fue implementada en el LAMAE [36], evaluado en lentes de varias aperturas numéricas y aumentos, y utilizando determinaciones experimentales de la PSFs, obteniéndose restauraciones modestas comparadas a métodos no lineales con restricciones implementados posteriormente.

Los métodos no lineales con restricciones, se basan en procesos iterativos de aproximaciones, en los que la solución es forzada a cumplir un conjunto determinado de restricciones físicas [69, 103]. Por ejemplo, en instrumentos que miden intensidad de luz, la restricción de positividad es la más aplicada. Esta restricción implica que la solución es forzada a tomar sólo valores positivos, ya que los negativos son físicamente imposibles. Usualmente, es la forma más fácil de implementar límites de amplitud y, en ocasiones, es inherente a la forma en la que se representa la solución. Otra restricción física son los límites espaciales. En esta se asume que la solución se desvanece a partir de cierta extensión. En la práctica, este tipo de restricción ejerce una influencia más débil que el límite de amplitud en la solución [69].

Algunas formulaciones de técnicas no lineales son modificaciones de métodos lineales iterativos. Por ejemplo, el método de Jansson es una versión modificada del método de Van Cittert, que añade una función de relajación que multiplica al término de corrección, conduciendo a una solución no lineal. Fue el primero en considerar y adecuar la solución a los límites inferior y superior del rango de intensidades. También fue el primero en demostrar la potencia real de la positividad, mostrando sustanciales mejoras de resolución, aun en presencia de ruido. En su primera aplicación, esta función de relajación proveyó un excelente estimador luego de sólo diez iteraciones. Las publicaciones originales son del año 1968 y 1970 según lo cita Jansson [69]. Crilli et al. investigaron indirectamente el método de Jansson a partir de la versión de Agard et al. [8], desarrollada para aplicaciones de MFCA, que aceleraba la convergencia del método. Todas estas versiones modificadas del método original de Van Cittert se conocen como formulaciones aditivas.

Otras técnicas de desconvolución están representadas por las formulaciones multiplicativas o de proporción. En este grupo aparecen métodos como el de Gold y el de Richardson-Lucy, entre otros. Los métodos de proporción se basan en el mismo principio que el de Van Cittert, esto es, emplean una corrección para mejorar el estimador, pero en lugar de hacerlo en forma aditiva, lo hacen en

forma multiplicativa. En 1964, Raymond Gold desarrolló un método similar al de Van Cittert pero con una formulación multiplicativa, que garantiza la positividad de la solución tanto la si **PSF** como los datos, son positivos. Esta aplicación estaba orientada al tratamiento de las mediciones de un sistema detector de neutrones.

Sibarita [103] plantea clasificaciones adicionales a la de métodos lineales y no lineales propuestos por Jansson [69]. Entre ellas, los algoritmos estadísticos de desconvolución, una clase de métodos que maximizan la función de verosimilitud. En estos casos, se asume que los datos de la imagen están afectados por una fuente de ruido, en general es intrínseca y sigue una distribución Poisson. Por lo tanto, la información estadística sobre el ruido presente en las imágenes es incorporada en esta familia de algoritmos.

Las primeras soluciones de este tipo de algoritmos fueron obtenidas independientemente en óptica y astronomía por Richardson [96] y Lucy [78], respectivamente. Desde entonces se lo conoce como método de Richardson-Lucy. Como se indicó anteriormente, Jansson [69] lo agrupa en la familia de métodos de proporción, dado que el término de corrección aparece en forma multiplicativa. La formulación original de este algoritmo se basó en la teoría Bayesiana, y también produce una solución positiva tanto la **PSF** como los datos son positivos [103]. Un aspecto interesante de este método, es que es el algoritmo mayoritariamente empleado en la desconvolución ciega (del inglés, *blind deconvolution*). En este problema, tanto la distribución general o , como la **PSF**, h , se suponen desconocidos y son estimados a través del proceso iterativo de aproximaciones [62, 103].

Otra clasificación considerada por Sibarita [103], son los algoritmos que utilizan una función de regularización. Esta es una forma de sortear los problemas de convergencia e incrementar la velocidad de los algoritmos iterativos de aproximaciones sucesivas. En general, se supone que el ruido adopta una distribución Gaussiana, lo que simplifica en cierta manera la complejidad matemática para obtener el algoritmo. Un ejemplo de este tipo de algoritmos regularizados es el método iterativo con restricciones de Tikhonov-Miller o ICTM (del inglés, *Iterative Constrained Tikhonov-Miller*) que ha sido también adaptado para cumplir con la restricción de positividad en la solución.

1.4.2. Técnicas de restauración aplicadas a MFCA

La aplicación de técnicas de restauración de imágenes en la **MFCA** surgen tiempo después de haber sido aplicadas en otras áreas de la ciencia e ingeniería. En general, la restauración de imágenes en **MFCA** se basa en la aplicación de algoritmos de desconvolución. Del conjunto de aplicaciones, se pueden mencionar algunas de las publicaciones que utilizan estas técnicas en imágenes de **MFCA** con el propósito de mejorar el análisis tridimensional de especímenes biológicos. Estas aplicaciones, aun siendo del área de la microscopia, tienen impacto en distintos niveles de organización biológica.

Por ejemplo, Avinash et al. de 1993 [14] utilizaron la desconvolución, contrastándola con otras técnicas de procesamiento, para corregir las imágenes de **SO** para medir el diámetro de las arteriolas del sistema de microcirculación en la cóclea de *Cavia porcellus*. Otro nivel de organización es la determinación de patrones de distribución molecular. Por ejemplo, en un trabajo desarrollado en el **LAMAE** se evaluó la expresión de E-caderina durante la morfogénesis de la piel de *Rhinella*

arenarum, en un modelo de alteración de la adhesión celular. Para esto se utilizaron la técnica de montaje completo, [SO] desconvolución y análisis tridimensional [68].

En relación con publicaciones técnicas sobre restauración aplicadas a [MFCA], como antecedente histórico se puede mencionar el trabajo de Weinstein y Castleman [123]. Los autores implementaron la técnica de [SO], técnicas de procesamiento de imágenes y representación de pares de imágenes estereográficas, para la mejora del análisis tridimensional de especímenes frente a las técnicas basadas seccionamiento físico de las muestras.

De acuerdo al resumen de técnicas planteadas por Agard [8], tanto el trabajo de Weinstein y Castleman de 1971 como el de Shantz de 1976, dan origen a la técnica de planos vecinos que ha sido muy utilizada en microscopia. Sin ser una técnica de restauración como las definidas previamente, emplea la [PSF] para la corrección de las imágenes. Básicamente, elimina la información fuera de foco en cada sección óptica, considerando un porcentaje de aporte de intensidad de planos vecinos por debajo y por encima de la sección tratada. En la misma publicación, Agard [8] presenta una adaptación del algoritmo iterativo con restricción de positividad de Van Cittert. En todos estos casos, se asume invarianza espacial y las [PSFs] son representadas con los perfiles Gaussianos, de Airy, o bien los modelos de Hopkins [66] y Stokseth [112].

Para los microscopistas, que mayormente están especializados en las técnicas relacionadas a la preparación de las muestras de microscopia y en menor medida en el área de procesamiento de imágenes, existe una multiplicidad de publicaciones, que a modo de tutoriales los guían en el uso de la desconvolución. Entre estos trabajos se destaca el de Agard et al. [9] y el de Wallace et al. [121]. Otro antecedente importante es la revisión exhaustiva de algoritmos de desconvolución con pruebas realizadas con paquetes de software privativo [103] y los de Sarder y Nehorai [99] que presentaron una visión general de las técnicas de desconvolución aplicadas a la [MFCA], con pruebas basadas en datos simulados y reales.

En un artículo reciente, Sage et al. [98], documentaron el desarrollo e implementación del paquete de software libre denominado DeconvolutionLab2. Su propósito es brindar una solución al problema del uso de la desconvolución por usuarios finales, quienes deben seleccionar un algoritmo apropiado, calibración y parametrización, haciendo frente a la potencial demanda computacional. Los autores examinan varios algoritmos comúnmente utilizados en desconvolución de imágenes de microscopia: filtro inverso regularizado, regularización de Tikhonov, Landweber, Tikhonov-Miller, Richardson-Lucy y umbralamiento. Los autores evaluaron los métodos utilizando datos simulados e imágenes experimentales reales. Distinguen algoritmos en términos de la calidad de la imagen, rendimiento, usabilidad y requerimientos computacionales.

Dando cuenta de la creciente aplicación de estas técnicas, en las últimas ediciones de los libros de procesamiento de imágenes se destinan capítulos completos al tratamiento de la formación de imágenes multidimensionales en microscopia de fluorescencia y su restauración. Tal es el caso de Wu et al. [124] que trata sobre el registro de imágenes tridimensionales con diversos modos de microscopia de fluorescencia, así como técnicas de procesamiento y análisis adaptadas (o bien extendidas) a tres dimensiones. En dicho libro, se analizan diversas aplicaciones de software, y con varios tipos de licencia que implementan estas técnicas. De la misma manera, el afamado libro *Handbook of biological confocal microscopy* de Pawley [91], posee varios capítulos y secciones

destinadas al proceso de desconvolución, en la que se incluye su aplicación a otros modos de microscopia.

En los últimos años se han desarrollado un conjunto de técnicas de restauración para aplicar en MFCA que consideran la variación de la PSF en profundidad. Algunas de estas técnicas, utilizaron el modelo de Gibson y Lanni como modelo de formación de la imagen óptica, o bien versiones simplificadas o extendidas (p. ej. variación del índice de refracción en el espécimen). En 2004, Preza y Conchello [93] desarrollaron un método de desconvolución por estratos, el cual asume que la PSF es invariante en estratos. Los autores asumieron que los datos están afectados por ruido intrínseco que sigue una distribución Poisson, y utilizaron el algoritmo de desconvolución de máxima verosimilitud, que restaura los datos de acuerdo a un modelo de formación de la imagen óptica contaminado con este ruido.

Posteriormente, Shaevitz y Fletcher desarrollaron una técnica que permite medir el cambio de la PSF en relación a la distancia entre la fuente puntual y el cubreobjetos [100]. Utilizando estas PSFs realizaron pruebas de desconvolución tridimensional con esferas de $2\ \mu\text{m}$ logrando reducir la dispersión axial debida a la difracción. Para lograr este objetivo, utilizaron el método desarrollado por Preza et al. [93].

En 2008, Řeřábek [7] utilizó el algoritmo de Richardson-Lucy en una aplicación de astronomía, para restaurar imágenes degradadas por diferentes tipos de aberraciones. Para esto, el campo visual fue dividido en una grilla en la que en cada celda se considera la PSF invariante. En particular, en función de la distribución de las aberraciones en las lentes, para la división en la grilla se asumió una geometría circular. El modelo de formación de la imagen óptica se basó en una aproximación polinómica de Zernike.

Otro antecedente es el de Kim et al. [72], quienes aplicaron desconvolución a imágenes de MFCA, utilizando el método de estimación de la verosimilitud penalizado y la PSF variante en la profundidad. Para esto realizan una estimación de la PSF ajustando datos de una determinación experimental a una formulación simplificada del modelo de Gibson y Lanni. Asumieron que las imágenes están contaminadas por ruido intrínseco que sigue una distribución Poisson. En dicho estudio concluyeron que en simulaciones y experimentos, el método propuesto mostró mejor rendimiento que otros métodos existentes.

Chacko et al. [23], desarrollaron un algoritmo iterativo rápido de desconvolución tridimensional, que utiliza diferentes PSF en cada profundidad. Para esto, el sistema óptico fue modelado como un banco de filtros en el que cada canal corresponde a una PSF distinta, dependiente de la posición a lo largo del eje óptico. En este trabajo, para el testeo del algoritmo se emplearon imágenes simuladas de esferas embebidas en un gel acuoso.

Kim et al. en 2015 [70] propusieron resolver mediante una aproximación por desconvolución ciega la estimación de la PSF que depende del espécimen. El método propuesto se compone de tres etapas: primero, una estimación no paramétrica promediada de la PSF utilizando el algoritmo de Richardson-Lucy, que parte de una estimación inicial del parámetro dada por la predicción de la profundidad desde un análisis de intensidades. En segundo lugar, la PSF es ajustada al modelo de Gibson y Lanni. Finalmente, la restauración es llevada a cabo utilizando una versión variante en profundidad del algoritmo *Expectation-Maximization* de Dempster et al. [30], implementado para

microscopia por Holmes et al. [64].

Patwary y Preza [89] desarrollaron y evaluaron un algoritmo de restauración variante en la profundidad utilizando una base ortonormal para la descomposición de la **PSF**. Esta se basa en el análisis de componentes principales, el cual es computacionalmente intensivo. Los autores desarrollaron un método para reducir el número de **PSFs** para el cómputo de las componentes principales, logrando una aproximación computacionalmente manejable para muestras gruesas. Los resultados de las restauraciones tanto en imágenes sintéticas como en experimentales mostraron consistencia y el algoritmo propuesto maneja eficientemente las aberraciones introducidas debidas a la profundidad utilizando un número pequeño de componentes principales. Los autores compararon el algoritmo basado en el análisis de componentes principales con el desarrollo anterior [93], encontrando que el método propuesto mejora en un 50 % la exactitud y, simultáneamente, reduce el tiempo de procesamiento en un 64 %.

Más recientemente, Kim et al. [71], reportaron avances en la corrección de las degradaciones considerando variaciones en el índice de refracción del espécimen. Para ello, los autores proponen acotar una serie de parámetros en el modelo matemático de la **PSF** a partir de imágenes registradas en las cuales el modelo de la **PSF** tiene una forma asimétrica variante en profundidad. Luego de generar una **PSF** inicial desde el análisis de intensidad, los parámetros son estimados en base a un estimador de máxima verosimilitud. Utilizando esta **PSF** estimada, los autores implementaron un algoritmo de *Expectation-Maximization* acelerado para la desconvolución. Los resultados muestran que el algoritmo desarrollado es superior en términos de la exactitud, evaluada cuantitativamente con el **FWHM**, contraste relativo, valores de desviación estándar de picos de intensidad y de **FWHM**.

De acuerdo al material bibliográfico revisado sobre el tema restauración de imágenes en microscopia, se observa que en general la técnica más aplicada es la desconvolución, incluso en aquellos casos en los que se asume un modelo variante en el espacio. El interrogante que surge es, si se asume que la formación de la imagen en **MFCA** es variante en el espacio, ¿podría ser adecuada la convolución como modelo directo? Para tener una aproximación a la respuesta de este interrogante general, en esta tesis se destina el **Capítulo 4**. En este se estudian las técnicas de restauración de imágenes que comúnmente son utilizadas para la formación de la imagen computacional en **MFCA**, y se las analiza bajo las condiciones de captura dadas por modelo de formación de la imagen que se obtiene en el **Capítulo 2**. Para esta etapa, se utilizan imágenes generadas artificialmente, las cuales son degradadas de acuerdo al modelo de formación mencionado. La imagen patrón utilizada posee todos los detalles discernibles a simple vista, y sus niveles de intensidad están pseudocoloreados mediante una tabla de colores para identificarlos fácilmente. Cuando las imágenes son procesadas con el modelo mencionado, todos sus detalles se ven degradados sustancialmente.

En el capítulo destinado la restauración de imágenes, también se presentan desarrollos propios de este autor. Se plantea una nueva estrategia para la desconvolución por estratos, que utiliza el método de ventaneo para separar capas que se asumen invariantes en el espacio. Además, se desarrollan dos algoritmos de restauración para **MFCA** en los que se asume varianza espacial en el eje óptico. Todos los algoritmos analizados en este capítulo se basan en técnicas iterativas clásicas. Como parte de la investigación, todas estas técnicas se analizan comparativamente. Dado que los algoritmos

utilizados poseen parámetros de ajuste, se indaga sobre las mejores condiciones de desempeño de los mismos. Una vez ajustado estos parámetros, se analiza la calidad de la corrección de estas técnicas separándolas en tres grupos de resultados. El primer grupo corresponde a los resultados obtenidos de aplicar algoritmos de desconvolución, en los que se asume una única **PSF** invariante en el espacio. El segundo grupo corresponde a los resultados obtenidos de aplicar la desconvolución por estratos, donde se asume que la **PSF** es invariante en capas a lo largo del eje óptico. El grupo final corresponde a los resultados que se obtienen de aplicar la restauración, donde se considera una **PSF** tridimensional para cada sección óptica. Se utiliza como métrica de comparación el error cuadrático medio y, además, un análisis visual básico de las imágenes resultantes.

Capítulo 2

Formación de la imagen

Para lograr conformar una imagen computacional es necesario contar con un modelo adecuado, que represente su formación con la mayor fidelidad posible. En la formación de imágenes computacionales en microscopia de fluorescencia multidimensional, parte de las investigaciones y desarrollos han estado orientados a encontrar un modelo preciso de difracción tridimensional.

De acuerdo a Goodman [57], la primera solución rigurosa al problema de la difracción fue dada por Sommerfeld, conocida como formulación de Rayleigh-Sommerfeld. Tanto esta, como la desarrollada precedentemente por Kirchhoff, comparten simplificaciones y aproximaciones comunes. Entre ellas, la más importante es que la luz se considera un fenómeno escalar, ignorando la naturaleza vectorial de los campos electromagnéticos. Este enfoque no toma en cuenta que en los límites de la apertura, las componentes del campo eléctrico y magnético están acopladas a través de las ecuaciones de Maxwell, y no pueden ser tratadas de forma independiente. Sin embargo, hay dos condiciones en las que los enfoques escalares permiten la obtención de resultados muy exactos: (1) la apertura que difracta debe ser grande comparada con la longitud de onda y (2) los campos difractados no son observados en las cercanías de la apertura [57].

Las expresiones para la difracción de Rayleigh-Sommerfeld y Kirchhoff, que pueden diferir significativamente en ciertos sistemas ópticos, en microscopios de campo amplio son equivalentes. Esto se debe a que la distancia focal de diseño generalmente es mayor a 150 mm, las aperturas suelen estar en el orden de 1 mm a 2 mm, la longitud de onda de trabajo comprende el rango visible y los ángulos del campo imagen son pequeños (unos pocos grados) [53].

La importancia de este leve contraste, entre las teorías de difracción de Sommerfeld y de Kirchhoff, es que esta última es la base de las formulaciones de las PSFs tridimensionales en MFCA [53, 99, 124]. La formulación de Kirchhoff, también es conocida como aproximación de la óptica física [20, Capítulo 2], ha sido utilizada desde mediados del siglo XX, para investigar la formación de patrones de difracción tridimensionales producidos por una apertura circular [65]. Una importante contribución al análisis de las formulaciones de patrones de la difracción tridimensional en microscopia óptica es el trabajo de Gibson y Lanni de 1989 [53]. Los autores analizan diferentes formulaciones de los patrones de difracción de una onda esférica, que son producidos por una apertura circular, para su aplicación en la técnica de SO.

De acuerdo a la bibliografía revisada [54, 53, 11, 10, 124], la formulación más general del campo

escalar de intensidad de la **PSF** en la posición del detector $\mathbf{x}_d = (x_d, y_d, z_d)$ debido a una fuente puntual ubicada en la posición $\mathbf{x}_o = (0, 0, z)$ del espacio objeto \mathbb{X}_{Ob} , obtenida por la aproximación de Kirchoff, está dada por:

$$h_{\mathbf{x}_d}(z, \theta) = \left| \int_0^1 J_0 \left[ka\rho \frac{\sqrt{x_d^2 + y_d^2}}{z_d} \right] P(\rho, z, \theta) \rho d\rho \right|^2, \quad (2.1)$$

donde J_0 es la función de Bessel de primera especie y orden cero, $P(\rho, z, \theta)$ es la función pupila de la lente objetiva, que tiene la forma general

$$P(\rho, z, \theta) = A(\rho)e^{jW(\rho, z, \theta)}, \quad (2.2)$$

donde $A(\rho)$ es la amplitud de la función pupila, esto es, la distribución de la amplitud en el plano focal posterior de la lente objetiva, ρ es una coordenada radial normalizada y $a = z_{d*} \text{NA} / (M^2 - \text{NA}^2)^{1/2}$ es el radio de la proyección de la apertura limitante del sistema de microscopia, todos referidos al plano focal de la apertura posterior de la lente objetiva. z_{d*} es la distancia en donde se ubica el dispositivo de captura, NA es la apertura numérica del sistema, M es la magnificación total y $W(\rho, z, \theta)$ es la aberración de fase [57, 22, 124], que puede expresarse como,

$$W(\rho, z) = zC(\rho) + B(\rho). \quad (2.3)$$

Hay diferentes opciones para las funciones A , B y C de las ecuaciones 2.2 y 2.3. La forma empleada cuando no hay suficiente información disponible del instrumento, es utilizar expansiones en serie con bases apropiadas. Por ejemplo, una posible elección para representar las funciones A , B y C es una expansión en series de potencias. Otra posible base, utilizada para representar aberraciones de fase en sistemas ópticos en general, es el conjunto de polinomios radiales de Zernike [80].

Otra forma, y como se verá en la siguiente sección, de determinar la aberración de fase W es a partir del modelo analítico de Gibson y Lanni [54], el cual contempla los datos del instrumento y de la muestra, como índices de refracción, espesores de los vidrios, entre otros.

2.1. Modelo de Gibson y Lanni

Si se poseen los datos del instrumento y las condiciones en las que se emplea, se puede utilizar el modelo desarrollado por Gibson y Lanni [54]. Este se basa en la determinación de la aberración de fase W , calculando la **diferencia de camino óptico (OPD, Optical Path Difference)** entre dos haces de luz originados en condiciones diferentes, esto es $W = \frac{2\pi}{\lambda} \text{OPD}(\rho, z)$. Una supone que el sistema óptico es utilizado de acuerdo al funcionamiento óptimo dado por el fabricante (condiciones de diseño); la otra, es la que se da en condiciones por fuera de las de diseño, siendo esta última la situación más habitual.

En condiciones de diseño, la imagen de una fuente puntual, que produce una lente objetiva (ideal) de un microscopio, corresponde al patrón de difracción producido por la onda esférica convergente

de salida, en respuesta a la onda esférica divergente de entrada a la lente desde la fuente puntual. En este caso ideal, se dice que la imagen está libre de aberraciones y limitada por la difracción. Una característica interesante de este modelo es que la **OPD** depende de parámetros ópticos fáciles de obtener a partir de las hojas de datos del instrumento (ver Tabla 2.1 para un listado de los parámetros involucrados y su descripción).

Tabla 2.1: Parámetros del modelo de Gibson y Lanni.

Parámetro	Descripción
NA	Apertura numérica
M	Magnificación total
n_{oil}^*	Índice de refracción nominal
t_{oil}^*	Distancia de trabajo nominal
n_{oil}	Índice de refracción del aceite de inmersión usado
n_g^*	Índice de refracción del cubreobjetos
t_g^*	Espesor nominal del cubreobjetos
n_g	Índice de refracción del cubreobjetos usado
t_g	Espesor del cubreobjetos usado
n_s	Índice de refracción del medio
t_s	Posición de la fuente puntual desde el cubreobjetos
z_d^*	Longitud de diseño de tubo óptico
z_d	Longitud real del tubo óptico
Δz	Desenfoque del sistema

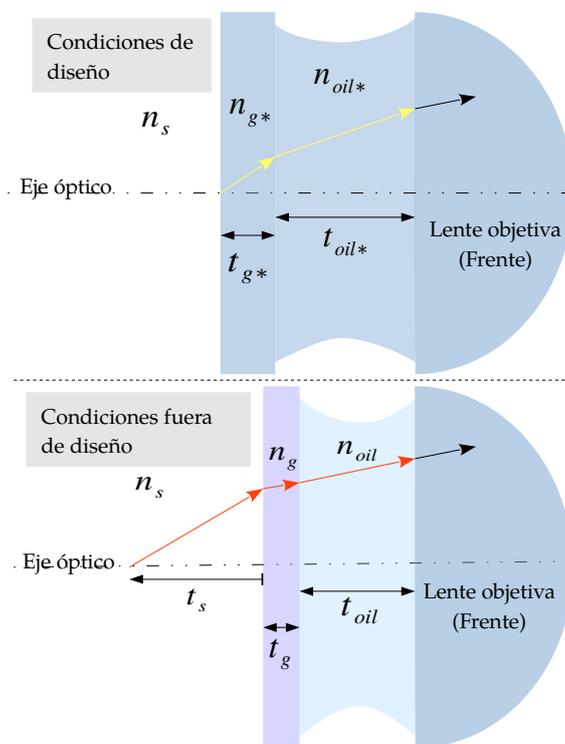


Figura 2.1: Caminos de los rayos en condiciones de diseño y fuera de diseño para el modelo del Gibson y Lanni

En condiciones de diseño, el plano objeto, inmediatamente debajo del cubreobjetos, está en foco

en el plano de diseño del detector (origen de flecha amarilla en Figura 2.1). Sin embargo, en condiciones fuera de diseño, para observar una fuente puntual localizada en la profundidad t_s del espécimen, la platina debe ser desplazada a lo largo del eje óptico hacia la lente hasta que la porción del objeto observado se encuentre en foco en el plano del detector (origen de flecha roja en Figura 2.1).

El desplazamiento de la lente hacia el cubreobjetos provoca un decrecimiento en el espesor de la capa de aceite de inmersión, que separa el elemento frontal de la lente objetiva del cubreobjetos. Sin embargo, este corrimiento no es siempre el mismo, puesto que si además el haz debe atravesar espesores e índices de refracción no nominales, tanto del cubreobjetos como del aceite de inmersión, el ajuste correcto de la posición dependerá de la combinación de la totalidad de los parámetros.

Por lo tanto, cuando el instrumento se utilice por fuera de las condiciones de diseño, el patrón de difracción se verá degradado respecto de la situación ideal y en efecto, cuanto más alejada esté una configuración de adquisición de esta situación ideal, más degradada estará la calidad de las imágenes. Con este planteo inicial, Gibson y Lanni obtuvieron una aproximación a la OPD dada por la siguiente expresión:

$$\begin{aligned}
 \text{OPD} \approx & n_{oil} \left[\Delta z + \frac{(z_{d^*} - z_d) a^2 n_{oil}}{z_{d^*} z_d \text{NA}^2} \right] \sqrt{1 - \left(\frac{\text{NA} \rho}{n_{oil}} \right)^2} + \frac{a^2 \rho^2 (z_{d^*} - z_d)}{2 n_{oil} z_{d^*} z_d} \\
 & + n_s t_s \left\{ \sqrt{1 - \left(\frac{\text{NA} \rho}{n_s} \right)^2} - \left(\frac{n_{oil}}{n_s} \right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{\text{NA} \rho}{n_{oil}} \right)^2} \right\} \\
 & + n_g t_g \left\{ \sqrt{1 - \left(\frac{\text{NA} \rho}{n_g} \right)^2} - \left(\frac{n_{oil}}{n_g} \right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{\text{NA} \rho}{n_{oil}} \right)^2} \right\} \\
 & - n_{g^*} t_{g^*} \left\{ \sqrt{1 - \left(\frac{\text{NA} \rho}{n_{g^*}} \right)^2} - \left(\frac{n_{oil}}{n_{g^*}} \right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{\text{NA} \rho}{n_{oil}} \right)^2} \right\} \\
 & - n_{oil^*} t_{oil^*} \left\{ \sqrt{1 - \left(\frac{\text{NA} \rho}{n_{oil^*}} \right)^2} - \left(\frac{n_{oil}}{n_{oil^*}} \right)^2 \sqrt{1 - \left(\frac{\text{NA} \rho}{n_{oil}} \right)^2} \right\},
 \end{aligned} \tag{2.4}$$

cuyos parámetros han sido descriptos en la Tabla 2.1

En la mayoría de las aplicaciones, las coordenadas del detector \mathbf{x}_d , ubicado en el espacio imagen \mathbb{X}_{Im} , deberían ser expresadas en las dimensiones de las coordenadas $\mathbf{x} = (x, y, z)$ del espacio objeto \mathbb{X}_{Ob} . Esto se puede lograr proyectando el plano imagen (x, y, z_d) al plano focal frontal de la lente objetiva. Esto se obtiene dividiendo este espacio por el negativo de la magnificación total del sistema, M . Esta proyección contrarresta la magnificación y los 180 grados de rotación respecto del eje óptico introducidos por la proyección del sistema óptico y ubica a la imagen en el sistema de coordenadas del espécimen [22].

Obtenida la aberración de fase $W = k\text{OPD}(\rho)$ y considerando la función amplitud de la pupila como $A(\rho) = A/z_d$ (siendo A una constante compleja), el campo de intensidad de la imagen de una fuente puntual, ubicada en la posición $\mathbf{x} = (0, 0, z = t_s)$, expresado en las coordenadas del espacio del

espécimen se obtiene realizando los reemplazos correspondientes en la formulación de la ecuación [2.1](#); lo que en consecuencia da:

$$h_{\mathbf{x}}(\theta) = \left| \frac{A}{z_d} \int_0^1 J_0 \left[ka\rho \frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{M \times z_d} \right] e^{jW(\rho;\theta)} \rho d\rho \right|^2, \quad (2.5)$$

donde $\theta = \{\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_L\}$ es el conjunto de los L parámetros fijos listados en la Tabla [2.1](#). En este punto, es importante mencionar que en la formulación dada en la ecuación [\(2.5\)](#) t_s es un parámetro del modelo. Esto no siempre es así, ya que también es dependiente de la aplicación. Por ejemplo, en la determinación de la [PSF](#) puede ser uno de los parámetro a estimar, o en la restauración de imágenes puede ser la variable independiente en la dirección del eje óptico, o bien ambas [\[70\]](#).

Gibson y Lanni propusieron este modelo en 1991 [\[54\]](#). Los trabajos estaban orientados a la formulación del modelo y a su prueba experimental. No se hallaron reportes posteriores que analicen qué sucede en en condiciones de muestreo por [SO](#). Por este motivo, en la presente tesis se consideró importante plantear una serie de pruebas del modelo, para intentar identificar en qué consiste la varianza espacial revelada por el mismo, cómo esta afecta la resolución en el espacio, en qué consiste el modelo de formación de la imagen óptica por [SO](#) en un [MFCA](#), así como determinar qué incidencia tiene la longitud de onda en el mismo.

2.2. Resultados

2.2.1. Perfiles de intensidad

Como una primera etapa se realizó el análisis del modelo, en base a la evaluación de los cambios en los perfiles de intensidades lateral y axial. Para lograr esto, se generaron perfiles de intensidad a partir del modelo de Gibson y Lanni, con los valores por defecto mostrados en el [Apéndice B](#).

En las Figuras [2.2](#) y [2.3](#) se resumieron, para una única longitud de onda, los cambios más notables en función de la posición t_s . En estas se pueden observar los siguientes efectos: asimetría del pico de la [PSF](#); cambio en la intensidad del pico, la cual disminuye conforme la fuente puntual se ubica más profundamente; desplazamiento del foco respecto de la posición de la fuente, representado como Δz_0 ; y cambios en las resoluciones axial y lateral, referidas en las Figuras [2.2](#) y [2.3](#) como el [FWHM](#), respectivamente.

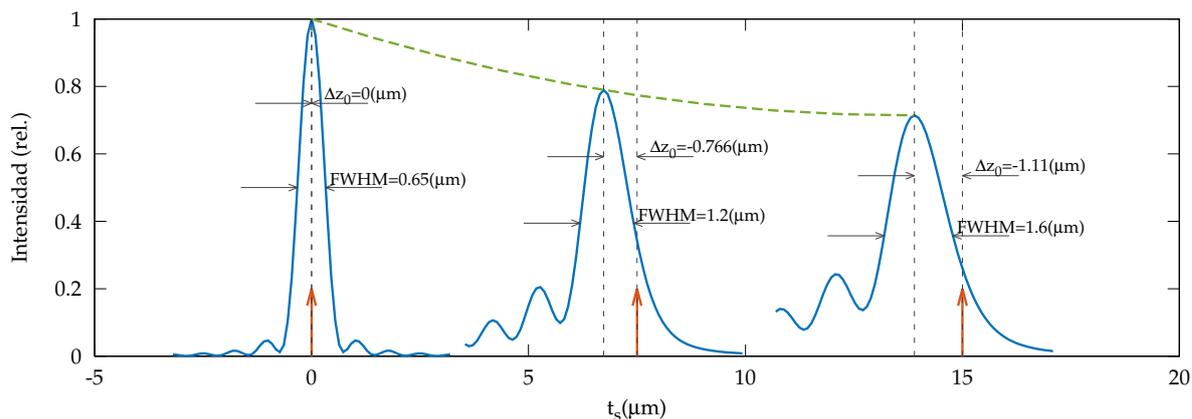


Figura 2.2: Perfiles de intensidad axial del modelo de Gibson y Lanni en función de la posición de la fuente puntual, t_s

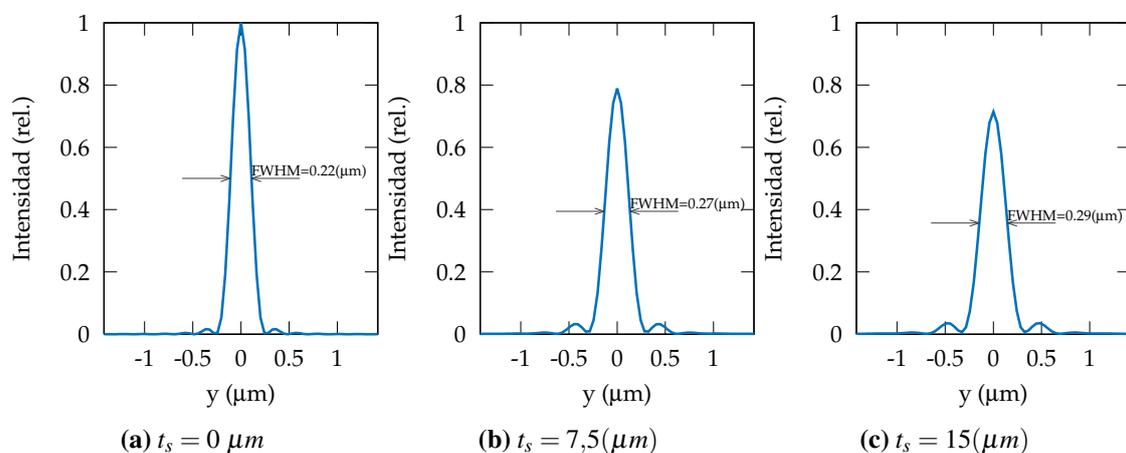


Figura 2.3: Perfil de intensidad del modelo de Gibson y Lanni en función de la posición de la fuente puntual, t_s , en el plano de captura.

2.2.2. Análisis de la PSF en el seccionamiento óptico

De acuerdo a los cambios observados en los perfiles de intensidad axial y lateral en la primera etapa de análisis, para estudiar la **PSF** en el registro por **SO** se seleccionaron las siguientes medidas: **FWHM** en las direcciones axial y lateral, intensidad de los picos de la **PSF** a lo largo del eje óptico relativas al pico en $t_s = 0$ y corrimiento del foco Δz_0 . Para el análisis de los cambios en estas medidas se consideró: λ , n_{oil} , n_g , t_g y n_s , cuyas descripciones constan en la Tabla 2.1. Para los parámetros analizados en las versiones fuera de diseño, se utilizaron valores comúnmente encontrados en la práctica. En relación con los valores de diseño, estos fueron referidos a los aportados para el instrumento de referencia, cuyas características se detallan en el **Apéndice C**.

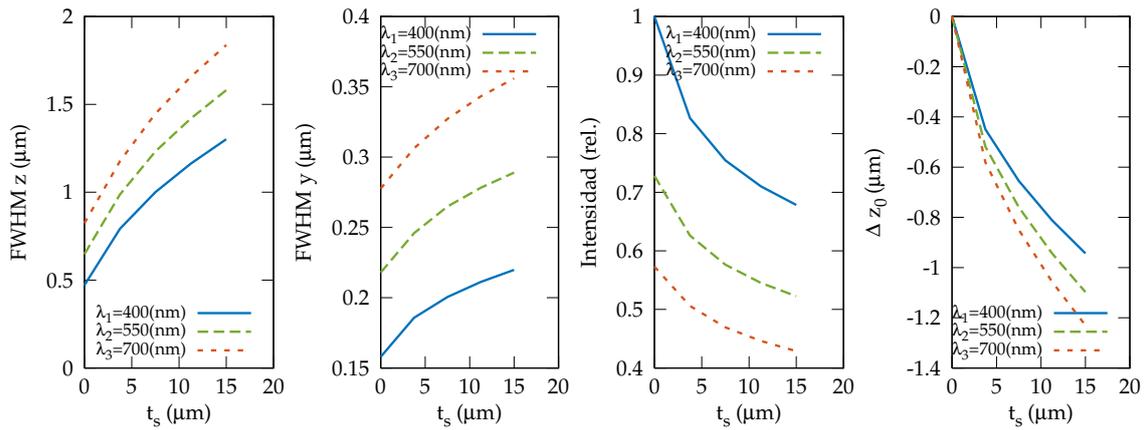


Figura 2.4: Medidas realizadas en el modelo de Gibson y Lanni en función de la profundidad t_s , para tres valores de longitud de onda, λ .

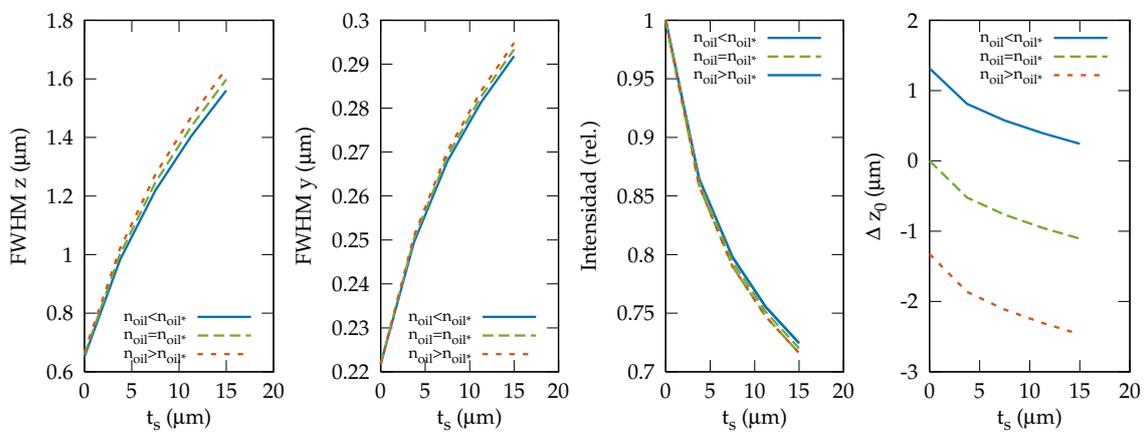


Figura 2.5: Medidas realizadas en el modelo de Gibson y Lanni en función de la profundidad t_s , para tres valores del índice de refracción del aceite de inmersión, n_{oil} .

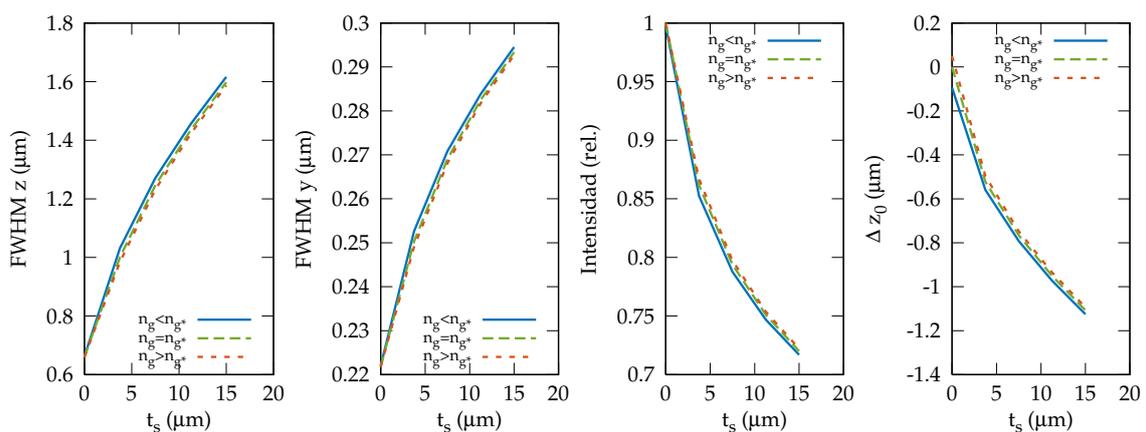


Figura 2.6: Medidas realizadas en el modelo de Gibson y Lanni en función de la profundidad t_s , para tres valores del índice de refracción del cubreobjetos, n_g .

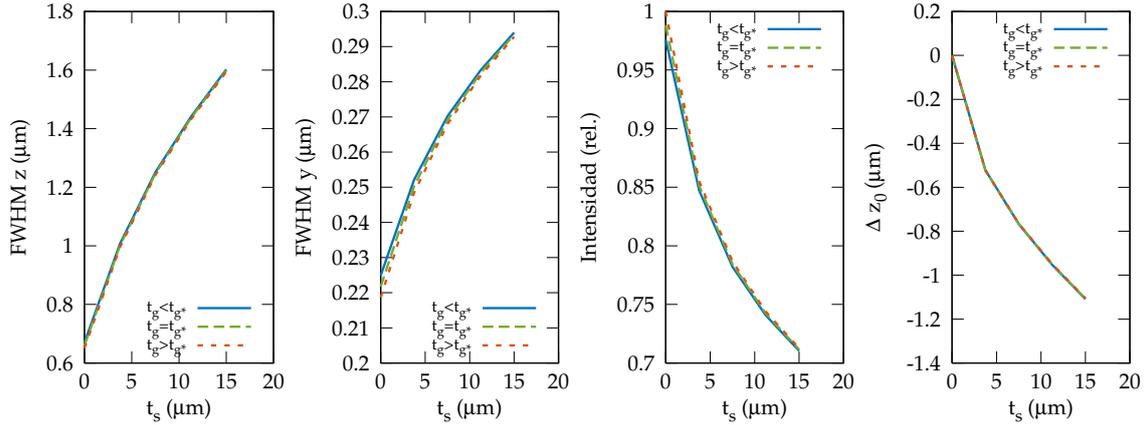


Figura 2.7: Medidas realizadas en el modelo de Gibson y Lanni en función de la profundidad t_s , para tres valores del espesor del cubreobjetos, t_g .

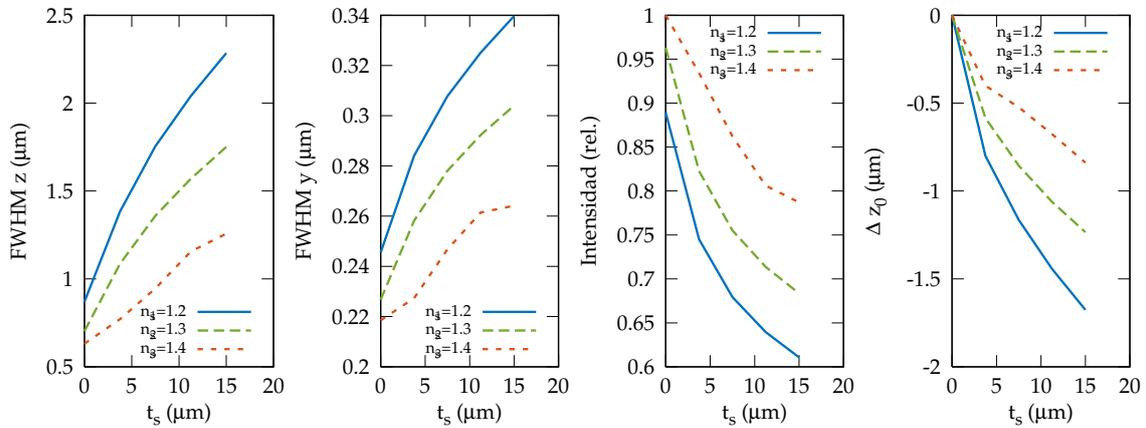


Figura 2.8: Medidas realizadas en el modelo de Gibson y Lanni en función de la profundidad t_s , para tres valores del índice de refracción del espécimen, n_s .

De este conjunto de resultados se desprende que el índice de refracción y el espesor del cubreobjetos (Figuras 2.6 y 2.7) son los que exhiben menos cambios en el SO. Es decir, estos parámetros no inciden mayoritariamente en las variaciones intrínsecas de la PSF en el SO. Por el contrario, la longitud de onda y los índices de refracción del aceite de inmersión y el del espécimen inciden en las distintas medidas analizadas.

La longitud de onda presenta modificaciones importantes en las cuatro medidas consideradas (Figura 2.4). Por su parte, el aceite de inmersión presenta una variación importante en el corrimiento del foco (Figura 2.5), para un cambio menor al 1 % en el valor del índice de refracción del aceite de inmersión. Sin embargo, no hay cambios aparentes en las resoluciones lateral y axial, y la intensidad. Por su parte, el índice de refracción del espécimen presentó importantes variaciones en las cuatro medidas consideradas (Figura 2.8).

La captura de la dimensión dada por la longitud de onda se separa en canales. Cada canal tiene un espectro final que resulta de la combinación de los espectros de emisión del fluoróforo y de transmisión del espejo dicróico y del filtro de emisión. Estos son seleccionados para lograr la separación óptima de las marcaciones de las diferentes estructuras en el interior del espécimen. Dado que cada canal está formado por un espectro y en virtud que la longitud de onda mostró tener

importantes variaciones en las medidas consideradas en el [SO], surgió el interrogante de si en el [SO] podría haber alguna diferencia entre considerar la longitud de onda pico del fluoróforo, la del pico del espectro final o bien el espectro final completo.

Para analizar esta situación se combinaron los espectros de emisión del Cy3 -un fluoróforo comúnmente utilizado como marcador- y los espectros de los filtros del cubo de filtros del instrumento de referencia más adecuado para el fluoróforo (ver Apéndice C). Luego se evaluaron los cambios en los cuatro parámetros seleccionados para analizar el modelo de Gibson y Lanni. Los resultados de esta prueba se muestran en la Figura 2.9. Se observa que no hay mayores diferencias entre considerar el pico del espectro de emisión del fluoróforo y el del espectro final que llega al sensor. Los parámetros que se ven modificados en mayor medida cuando se considera el espectro son la resolución lateral y la intensidad.

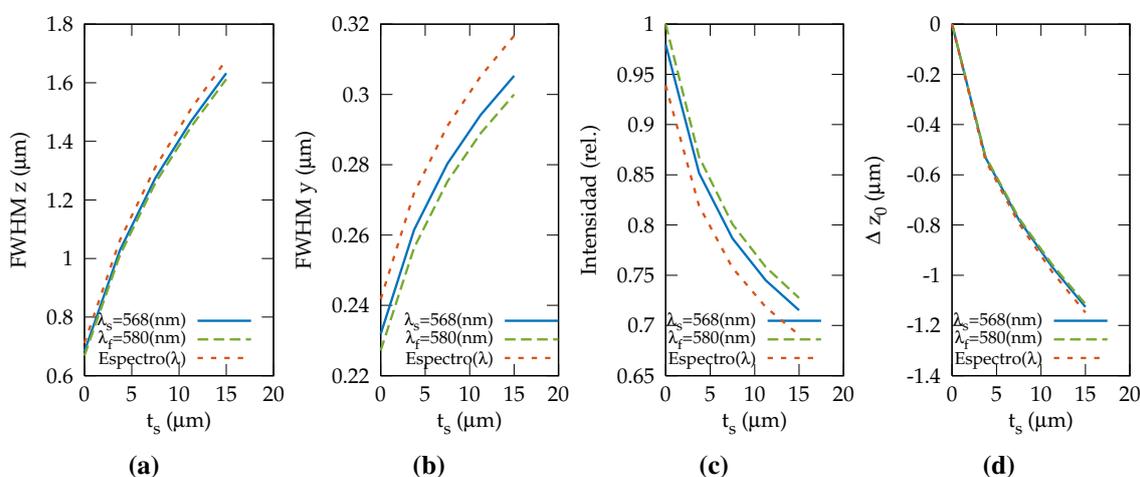


Figura 2.9: Medidas realizadas en el modelo de Gibson y Lanni en función de la profundidad t_s , para tres situaciones de composición espectral de longitudes de onda: longitud de onda del pico del espectro de fluorescencia del fluorocromo, longitud de onda del pico del espectro que pasa el filtro de interferencia de emisión y conjunto de longitudes de onda del espectro de emisión que pasa el filtro de interferencia de emisión.

2.3. Discusión y conclusiones

Gibson y Lanni propusieron el modelo analizado en este capítulo en el año 1991 [54]. Los resultados publicados se focalizaron en la formulación del modelo y a su prueba experimental. Aunque su propósito fueron las aplicaciones de [SO] en los resultados no se registra un análisis considerando el muestreo por [SO] o la medición de algún parámetro en esta condición de operación del [MFCA]. Tampoco se encontraron estudios posteriores de las variaciones de la [PSF] que se producen en un [SO]. Sí se han publicado trabajos en los que se usa el modelo de Gibson y Lanni, aunque en una cantidad mucho menor en comparación con el uso de otros perfiles, como por ejemplo el Gaussiano. Según Small [105], los usuarios suelen aproximar la [PSF] con perfiles de Airy dado que, modelos como el de Gibson y Lanni resultan complejos. Incluso en ciertos casos prácticos, el perfil de Airy suele ser tedioso de manejar, por lo tanto se suele usar un modelo de perfil Gaussiano. El argumento es que la mayoría de los modelos de [PSFs] son muy similares a una campana Gaussiana cerca

del pico central, que en ciertas condiciones, da resultados útiles y razonablemente exactos. Sin embargo, la aproximación Gaussiana falla en las colas del perfil, dado que esta decae más rápido que muchas **PSFs** y no presenta los patrones en anillo que presentan los modelos de **PSFs** más realistas.

Los resultados obtenidos en las pruebas con el modelo de Gibson y Lanni permiten cuestionar el uso de modelos simplificados en el **SO**. En estos se observan al menos tres efectos desde los perfiles de intensidades (ver Figuras **2.2** y **2.3**): cambios morfológicos, incluyendo asimetría relativa al pico de la **PSF** a lo largo del eje axial, cambios en las intensidades y en las resoluciones lateral y axial, así como el corrimiento del foco. Este último efecto, en particular, revela que las posiciones axiales de las estructuras que se observan en foco en las imágenes capturadas no son necesariamente coincidentes con las posiciones que podrían medirse directamente a partir de la distancia relativa que hay entre el cubreobjetos y la lente objetiva. Por lo tanto, en situaciones reales donde se encuentran involucrados otros factores, es prácticamente imposible conocer con certeza la posición espacial de una estructura a partir de mediciones directas entre el cubreobjetos y el objetivo. De hecho, como se ha mostrado en el conjunto de Figuras **2.8**, este efecto se ve agravado cuando el índice de refracción de la muestra difiere del valor de diseño.

El corrimiento del foco de la **PSF** no fue discutido en el trabajo original de Gibson y Lanni, y muy pocos trabajos posteriores lo plantean. Haerberlé et al. en 2001 **[59]** observan este efecto y plantean una estrategia para la calibración del microscopio mediante la estimación de parámetros de la **PSF** con el modelo de Gibson y Lanni. Para ello consideran que el desplazamiento focal es un parámetro adicional del modelo. En un trabajo posterior **[60]**, utilizó el modelo de Török **[114]** y lo comparó con el modelo de Gibson y Lanni concluyendo que este último subestima el tamaño de la **PSF**. Sin embargo, Aguet et al. **[11]** plantea que los resultados obtenidos con ambos modelos producen los mismos resultados para lentes de aperturas numéricas grandes. El corrimiento focal también fue estudiado por Mahmoudi en 2014 **[79]**, pero este fue aplicado al enfoque de un láser Gaussiano que debe propagarse a través de múltiples interfaces dieléctricas. Mahmoudi encontró que existe una proporcionalidad entre el corrimiento focal y el grado de desajuste de los índices de refracción de los medios.

Como ya se mencionó, en las mediciones realizadas en el modelo, se verificó que las resoluciones lateral y axial, así como la intensidad se ven modificadas por la profundidad en la cual se ubica la fuente puntual. Esto se ve agravado si se modifican las condiciones de diseño en relación al índice de refracción del espécimen, n_s . En particular, los cambios en la resolución lateral se contraponen con los resultados experimentales obtenidos por Shaevitz et al. **[100]**, quienes encontraron que en el **SO**, la resolución lateral no exhibe modificaciones. La discrepancia puede deberse a la profundidad a la que los autores miden la resolución lateral, que no supera los $3 \mu\text{m}$. Resulta probable que un análisis que considere un **SO** de mayor profundidad, muestre diferencias significativas en la resolución lateral. Adicionalmente, el conocimiento empírico, ha mostrado que las resoluciones obtenidas por determinación experimental de la **PSF**, generalmente son peores que las que dan los modelos teóricos. Esto se debe principalmente a que el tamaño de las microesferas que se utilizan para la determinación experimental no pueden ser infinitamente pequeñas **[74]**.

Otra de las pruebas realizadas apuntó al análisis de las posibles diferencias que existirían al

considerar una única longitud de onda, la del pico del espectro de emisión del fluoróforo o la del pico del espectro final, o bien, considerar el espectro final. De acuerdo a los resultados, tanto la intensidad como la resolución lateral son las medidas más afectadas en el [SO](#). Se sabe que las medidas obtenidas para el espectro final son más próximas a la realidad que las que se obtienen con una única longitud de onda. Por lo tanto, se podría establecer como regla general que siempre se considere el espectro final. Sin embargo, esto no puede ser considerado una regla metodológica concluyente, dado que cada situación experimental e instrumental es diferente y debe ser puntualmente analizada. Al presente, no se ha encontrado bibliografía que aborde este aspecto de la formación de la imagen en la [MFCA](#).

Otro aspecto del modelo a discutir, es el relacionado con su implementación computacional. El modelo de Gibson y Lanni es un modelo escalar, que en la época en la que fue desarrollado, presentaba la desventaja del excesivo tiempo de cómputo requerido en las aplicaciones de restauración, ya de por sí altamente intensivas [\[28\]](#), [\[80\]](#). Sin embargo, con el desarrollo de la tecnología informática, actualmente el tiempo de cómputo es razonable para usuarios finales en comparación con modelos vectoriales que requieren mayores capacidades de cómputo y, adicionalmente, es más realista que los modelos basados en perfiles Gaussianos. En una publicación reciente, Li et al. [\[76\]](#) proponen una aproximación computacionalmente eficiente al modelo de Gibson y Lanni. Esta se basa en la expresión de la integral de Kirchhoff de la ecuación [\(2.5\)](#), como una combinación lineal de funciones de Bessel reescaladas, proveyendo una forma de cálculo alternativa que evita la integración numérica.

De acuerdo a los resultados obtenidos y a la bibliografía revisada, se puede concluir que los cambios que se observan en la [PSF](#) muestran que esta presenta una importante varianza en la profundidad. Ahora bien, esto ya había sido determinado por Gibson y Lanni [\[54\]](#), sin embargo, lo que aquí se pretende destacar es que esta varianza debe considerarse en la formación de la imagen por [SO](#). Si cada sección óptica se forma con un patrón de difracción distinto, entonces la representación de la formación de la imagen óptica con la integral de convolución dada por la ecuación [\(1.9\)](#) podría ser insuficiente para este caso, porque no está claro si la convolución es, o no, una buena aproximación.

En otras palabras, al optar por la ecuación [\(1.9\)](#) como modelo directo de formación de la imagen, se asume invarianza espacial. Esto quiere decir que si se traslada la fuente puntual en el espacio objeto, la [PSF](#) conservará la morfología de su distribución de intensidades y se verá desplazada por un factor de proporcionalidad constante. Ahora bien, si no se cumple la invarianza espacial sería inadecuado utilizar la ecuación [\(1.9\)](#) como modelo directo de formación de la imagen. Más apropiado es utilizar la ecuación [\(1.5\)](#) que es más general. En esta ecuación, los cambios en la distribución de intensidades y la no linealidad del desplazamiento de la [PSF](#) puede ser representada en el núcleo como una función, que de hecho lo es, de dos variables.

En función de los resultados obtenidos, para las condiciones de captura basadas en el instrumento de referencia, de aquí en más, se considerará que la formación de la imagen óptica está mejor modelada por la integral de la ecuación [\(1.5\)](#). Esto es en virtud de que esta forma es más general, y admite núcleos variantes al desplazamiento en el espacio.

En la formulación que se plantea a continuación, el núcleo h depende del conjunto de parámetros, que se denominará en forma general θ , y que están descriptos en la Tabla [2.1](#). Además, se deben

adecuar las intensidades a fotones. Para esto se propone simplificar esta conversión en una única constante c que involucra varios factores, entre los que se pueden mencionar: concentración del fluoróforo y la eficiencia cuántica. De esta manera, la versión modificada a la ecuación (1.5) que modela la formación de la imagen óptica en el instrumento está dada por:

$$\bar{i}(\mathbf{x}; \theta) = c \times \int_{\mathbb{X}} h(\mathbf{x}, \mathbf{x}'; \theta) o(\mathbf{x}) d\mathbf{x}', \quad (2.6)$$

y su versión discreta, con la que se trabajará finalmente, está dada por:

$$\bar{i}_n(\theta) = c \times \sum_N h_{n,n'}(\theta) o_{n'}. \quad (2.7)$$

Además, y como ya se mencionó, el registro digital de imágenes ópticas es un proceso que puede constituir una causa adicional de aberraciones, debido a la incidencia de las fuentes de ruido involucradas en el proceso de adquisición [124, Capítulo 12]. Esto conduce a la siguiente propuesta para modelo general de la formación de la imagen en MFCA:

$$i_n(\theta) = S_{\text{int}} [\bar{i}_n(\theta)] + S_{\text{ext}}, \quad (2.8)$$

donde i_n es la intensidad, medida en número de fotones, en cada elemento n del dispositivo de captura, $S_{\text{int}} [\dots]$ representa el ruido intrínseco a la señal y S_{ext} representa las fuentes de ruido extrínsecas a la señal. En la constante c de esta formulación general se añaden los factores que corresponden al dispositivo de registro, entre los que, por ejemplo, se pueden mencionar su ganancia y su respuesta espectral, entre otros.

El parámetro t_s puede ser desconocido, sin embargo, con una adecuada calibración es posible tener el mapa de la posición t_s que le corresponde a cada sección óptica. Así, dependiendo del problema, en ciertas situaciones t_s es un parámetro a determinar del conjunto θ y en otros, es la variable independiente en la dirección del eje óptico. Entonces, si se considera que $o_n = \delta_n$ es una fuente puntual que se utiliza para calibración, entonces \bar{i}_n representaría la distorsión en esa porción del espacio, la formación general de la imagen dada en la ecuación (2.8) se reduce a:

$$i_n(\theta) = S_{\text{int}} [c \times h_n(\theta)] + S_{\text{ext}}. \quad (2.9)$$

En este sentido, el problema a resolver consiste en determinar la posición t_s en la que se ubica la fuente, con el propósito de calibrar el instrumento, o bien para ser utilizado en otras aplicaciones, como la localización de fluoróforos. Cuestiones como qué precisión y exactitud se pueden lograr en la determinación de la posición de una fuente puntual, bajo distintas condiciones de ruido, son aspectos que se analizan en mayor profundidad en el Capítulo 3.

Si el instrumento está calibrado y se conoce el mapa de las secciones ópticas en función de t_s , entonces se pueden aplicar técnicas de restauración de imágenes para corregir aberraciones y reducir el ruido. El problema aquí planteado puede resumirse así: dadas las imágenes capturadas por SO bajo el modelo de formación de formulado en la ecuación (2.8), ¿cuál es la distribución de

fluorescencia del espécimen que las generó? ¿son aplicables las técnicas de desconvolución que comúnmente se aplican en la formación de la imagen computacional de MFCA?. Estos interrogantes se desarrollan en el Capítulo 4.

De aquí en más, en las pruebas se considerarán tres casos de ruido. El caso NCI es la situación en la que sólo hay ruido en la señal que sigue una distribución Poisson. En los casos NCII y NCIII hay ruido en la señal con distribución Poisson y se añade ruido extrínseco que siguen distribuciones Poisson y Gaussiana, respectivamente. Con estos modelos de situaciones de ruido, se simplifica un amplio conjunto de posibilidades empíricas. Sin embargo, no todas las técnicas de estimación y restauración analizadas en los próximos capítulos consideran la versión general de ruido intrínseco y extrínseco con las distribuciones correspondientes. En este sentido, se busca analizar cualitativamente la robustez de los métodos, frente a los errores de especificación de los modelos de ruido.

Capítulo 3

Determinación de la PSF

La determinación de la **PSF** es una metodología que permite conocer precisamente la imagen de una fuente puntual que forma un sistema óptico. Esta operación tiene varios propósitos: conocer la resolución espacial que puede lograrse bajo determinadas condiciones experimentales, corregir las degradaciones introducidas por el sistema o por las fuentes de ruido en las imágenes, localizar fuentes puntuales en determinadas posiciones del espacio, etc. Por estas razones, ni su determinación experimental ni la teórica resultan suficientes en forma aislada, es la combinación de ambas la que permite tener un conocimiento más preciso de la **PSF**. De hecho, un método ideal sería aquel que permita determinar la **PSF** con la que se realiza cada registro.

En base a los resultados obtenidos en el **Capítulo 2**, determinar la **PSF** en las condiciones planteadas en un equipo de **MFCA**, que permite el registro por **SO**, consiste en conocer la **PSF** de cada plano, lo cual requiere que de la distribución de intensidades de la captura de una determinación experimental, se extraiga, entre otros posibles parámetros desconocidos, la posición de la fuente puntual en el eje axial, t_s , comparando los datos capturados con los que predice el modelo. Es por esta razón que las técnicas estadísticas de estimación de parámetros resultan fundamentales en el análisis y calibración de los sistemas ópticos. Con estas herramientas, asumiendo un modelo parametrizado de formación de la imagen, como el dado en la ecuación (2.8), es posible determinar el conjunto de parámetros del modelo que generaría determinado conjunto de datos. Adicionalmente, es posible conocer la mejor precisión con la que se estiman estos parámetros, obteniendo una cota teórica de la misma.

En la presente tesis, se han implementado tres técnicas de estimación de parámetros: minimización de la suma de los residuos al cuadrado, maximización de la verosimilitud y minimización de la divergencia (*I-divergence*) de Csiszár. Este último método, constituye uno de los aportes originales de esta tesis. El desarrollo de las tres técnicas, habilitó la realización del estudio comparativo, que permitiese analizar los tres métodos en términos de su convergencia, tiempo de cómputo, exactitud y precisión. Para dichos cálculos se asumió que el modelo de formación de la imagen de una fuente puntual es el dado en la ecuación (2.9), siendo esta contaminada con ruido en las condiciones NCI, NCII y NCIII, mencionadas anteriormente.

La construcción de un método de estimación de parámetros, requiere que previamente se establezca un criterio, o función objetivo, entre el modelo y los datos. Luego, esta función es optimizada para

encontrar el conjunto de parámetros que, de acuerdo al criterio seleccionado, torna más similar el modelo a los datos. Para esta etapa, los tres métodos de estimación mencionados previamente fueron planteados mediante la misma estrategia numérica de optimización y aplicados para la estimación del parámetro t_s , que describe la posición de la fuente puntual relativa al cubreobjetos. El planteo general para la optimización se encuentra en el [Apéndice D](#).

3.1. Métodos de estimación

En el campo del procesamiento de señales, históricamente se ha utilizado el error cuadrático (SE), o error cuadrático medio (MSE), como métrica del desempeño cuantitativo. Desde el punto de vista de la optimización, el SE presenta propiedades de convexidad, simetría y diferenciabilidad. Las soluciones suelen tener forma analítica cerrada, y cuando no, existen soluciones numéricas usualmente fáciles de formular [\[122\]](#). Kirshner et al. [\[73\]](#) desarrollaron y evaluaron un método de ajuste basado en la optimización del SE entre los datos y el modelo de Gibson y Lanni [\[54\]](#). Para resolver el problema no lineal de mínimos cuadrados, los autores utilizaron el algoritmo de Levenberg-Marquardt, obteniendo bajos tiempos de cómputo y una aproximación exacta y precisa en la localización de fuentes puntuales.

En esta forma de estimación, la función objetivo del SE está dada por:

$$SE(\theta) = \sum_{n=1}^N (i_n - \bar{i}_n(\theta))^2. \quad (3.1)$$

El mínimo del $SE(\theta)$ se obtiene haciendo sus derivadas parciales iguales a cero, esto es:

$$\frac{\partial SE(\theta_l)}{\partial \theta_l} = \sum_{n=1}^N (i_n - \bar{i}_n(\theta_l)) \frac{\partial \bar{i}_n(\theta_l)}{\partial \theta_l} \equiv 0. \quad (3.2)$$

La representación de la ecuación [\(3.2\)](#) al término de primer orden de la serie de Taylor, conduce a la siguiente formulación iterativa del estimador:

$$\theta_l^{(m+1)} = \theta_l^{(m)} - \frac{\sum_{n=1}^N (i_n - \bar{i}_n(\theta_l^{(m)})) \frac{\partial \bar{i}_n(\theta_l^{(m)})}{\partial \theta_l^{(m)}}}{\sum_{n=1}^N \left(\frac{\partial^2 \bar{i}_n(\theta_l^{(m)})}{\partial \theta_l^{(m)2}} (i_n - \bar{i}_n(\theta_l^{(m)})) - \left(\frac{\partial \bar{i}_n(\theta_l^{(m)})}{\partial \theta_l^{(m)}} \right)^2 \right)}. \quad (3.3)$$

Se ha planteado que, en aquellos casos en los que los datos pertenecen al conjunto de los reales positivos, el SE no alcanza un mínimo [\[29, 106\]](#). Esta es la situación real en la adquisición de imágenes ópticas, debido a que las intensidades registradas son siempre positivas. Una alternativa es utilizar la *I-divergence* de Csiszár, la cual es una generalización de la medida de información de Kullback-Leibler entre dos funciones de masa (o densidad, en el caso continuo) de probabilidad p y r , y se define como [\[29\]](#):

$$I(p||r) = \sum_{n=1}^N p_n \log \left(\frac{p_n}{r_n} \right) - \sum_{n=1}^N (p_n - r_n). \quad (3.4)$$

Comparado con la medida de información de Kullback-Leibler, Csizár acomoda las funciones p y r para aquellos casos en los que sus integrales no son iguales [106], agregando la sumatoria que figura como último término en el lado derecho de la ecuación (3.4). Debido a esto, la $I(p||r)$ tiene las siguientes propiedades:

- $I(p||r) \geq 0$.
- $I(p||r) = 0$ si y solo si $p = r$.

Consecuentemente, para una función r fija, $I(p||r)$ tiene un único mínimo que se alcanza cuando $p = r$. La función de masa de probabilidad r , o en el caso continuo, la función de densidad de probabilidad opera como una referencia desde la cual la función p sigue los picos y valles de r .

En esta tesis se consideró a los datos i_n de una determinación experimental de la PSF como la función de referencia. El requerimiento es que estos datos estén normalizados para que su suma total sea igual a uno. Esta forma normalizada de los datos, que se denominará d_n , representa la frecuencia relativa del número total de fotones en cada posición espacial. Esto es:

$$d_n = \frac{i_n}{\sum_{n=1}^N i_n}. \quad (3.5)$$

Entonces, reemplazando en la ecuación (3.4) a p_n por $h_n(\theta)$ y a r_n por d_n , la divergencia entre los datos d_n y la distribución teórica $h_n(\theta)$ está dada por:

$$I(h(\theta)||d) = \sum_{n=1}^N h_n(\theta) \log \frac{h_n(\theta)}{d_n} - \sum_{n=1}^N (h_n(\theta) - d_n). \quad (3.6)$$

Para minimizar $I(h(\theta)||d)$ sus derivadas parciales deben igualarse a cero, esto es:

$$\frac{\partial I(h(\theta)||d)}{\partial \theta_l} = \sum_{n=1}^N \frac{\partial h_n(\theta_l)}{\partial \theta_l} \log \left(\frac{h_n(\theta_l)}{d_n} \right) \equiv 0. \quad (3.7)$$

Representando (3.7) en serie de Taylor y aproximando a su término de primer orden, se obtiene siguiente estimador iterativo:

$$\theta_l^{(m+1)} = \theta_l^{(m)} - \frac{\sum_{n=1}^N \frac{\partial h_n(\theta_l^{(m)})}{\partial \theta_l^{(m)}} \log \left(\frac{h_n(\theta_l^{(m)})}{d_n} \right)}{\sum_{n=1}^N \left(\frac{\partial^2 h_n(\theta_l^{(m)})}{\partial \theta_l^{(m)2}} \log \left(\frac{h_n(\theta_l^{(m)})}{d_n} \right) + h_n^{-1}(\theta_l^{(m)}) \left(\frac{\partial h_n(\theta_l^{(m)})}{\partial \theta_l^{(m)}} \right)^2 \right)}. \quad (3.8)$$

Otro de los métodos estudiado se basa en el principio de la máxima verosimilitud, que establece que los datos que ocurren de forma presupuesta (es decir, asumiendo un modelo estadístico) han tenido máxima probabilidad de ocurrencia [51]. Aguet et al. [11] utilizaron esta idea para construir un método de estimación de la posición de la fuente puntual a lo largo del eje óptico. La función de verosimilitud, representada por la cantidad de fotones esperada en un punto del espacio, está dada por la ecuación (2.9), donde S_{int} corresponde a una distribución Poisson y S_{ext} representa el ruido de lectura σ_{ro} del dispositivo, siendo su distribución gaussiana. Con estas suposiciones, los autores

construyen un algoritmo basado en la maximización de la función de log-verosimilitud entre los datos capturados y el modelo. La aproximación numérica, al término de primer orden en la serie de Taylor, conduce a:

$$\theta_l^{(m+1)} = \theta_l^{(m)} - \frac{\sum_{n=1}^N \frac{\partial \bar{i}_n(\theta_l^{(m)})}{\partial \theta_l^{(m)}} \left(\frac{i_n}{\bar{i}_n(\theta_l^{(m)})} - 1 \right)}{\sum_{n=1}^N \left(\frac{\partial^2 \bar{i}_n(\theta_l^{(m)})}{\partial \theta_l^{(m)2}} \left(\frac{i_n}{\bar{i}_n(\theta_l^{(m)})} - 1 \right) - \left(\frac{\partial \bar{i}_n(\theta_l^{(m)})}{\partial \theta_l^{(m)}} \right)^2 \frac{i_n}{(\bar{i}_n(\theta_l^{(m)}))^2} \right)}. \quad (3.9)$$

3.2. Cota inferior de error de estimación

Independientemente del método de estimación empleado para aproximar la localización axial de la **PSF**, si el estimador es insesgado, su precisión estará limitada. Es decir, su varianza no puede hacerse arbitrariamente pequeña, sino que está limitada por la denominada cota inferior del error de estimación de Cramér-Rao, dada por:

$$\text{Var}(\theta_l) \geq \frac{1}{\sum_{n=1}^N h_n(\theta_l) \left(\frac{\partial \ln h_n(\theta_l)}{\partial \theta_l} \right)^2}. \quad (3.10)$$

Este es un resultado general que sólo depende del modelo de formación de la imagen [51, Capítulo 17]. Aguet et al. [11] obtuvieron una forma de calcular la cota de Cramér-Rao para localizaciones axiales. En esta tesis se utiliza esta forma de determinación de la **CRLB**, considerando el modelo de formación de la imagen dado por la ecuación (2.9).

3.3. Resultados

3.3.1. Análisis de la CRB

Se realizó un primer análisis de la **CRLB** en función de cambios en el tamaño de píxel, el número de píxeles, el total de fotones capturados en un plano y el nivel de intensidad de fondo. El propósito de este análisis fue determinar si la aplicación de las técnicas de estimación de parámetros estudiadas tienen sentido en determinadas configuraciones reales de adquisición. La **CRLB** fue calculada por la formulación obtenida por Aguet et al. [11] dada por:

$$\text{Var}(\theta_l) \geq \frac{1}{\sum_{n=1}^N \bar{i}_n(\theta_l)^{-1} \left(\frac{\partial \bar{i}_n(\theta_l)}{\partial \theta_l} \right)^2}, \quad (3.11)$$

donde $\text{Var}(\theta_l)$ representa la varianza del estimador θ_l y $\frac{\partial \bar{i}_n(\theta_l)}{\partial \theta_l}$ fue evaluada utilizando una diferencia finita central. La determinación de la **CRLB** fue realizada para cada plano, a lo largo del eje óptico para $t_s = 5 \mu\text{m}$ y representada gráficamente en función del nivel de desenfoque referido al pico de la **PSF** (ver Figura 3.1). Es conveniente aclarar que no debe confundirse esta medida con el desenfoque del sistema (Δz) indicado en la ecuación (2.4).

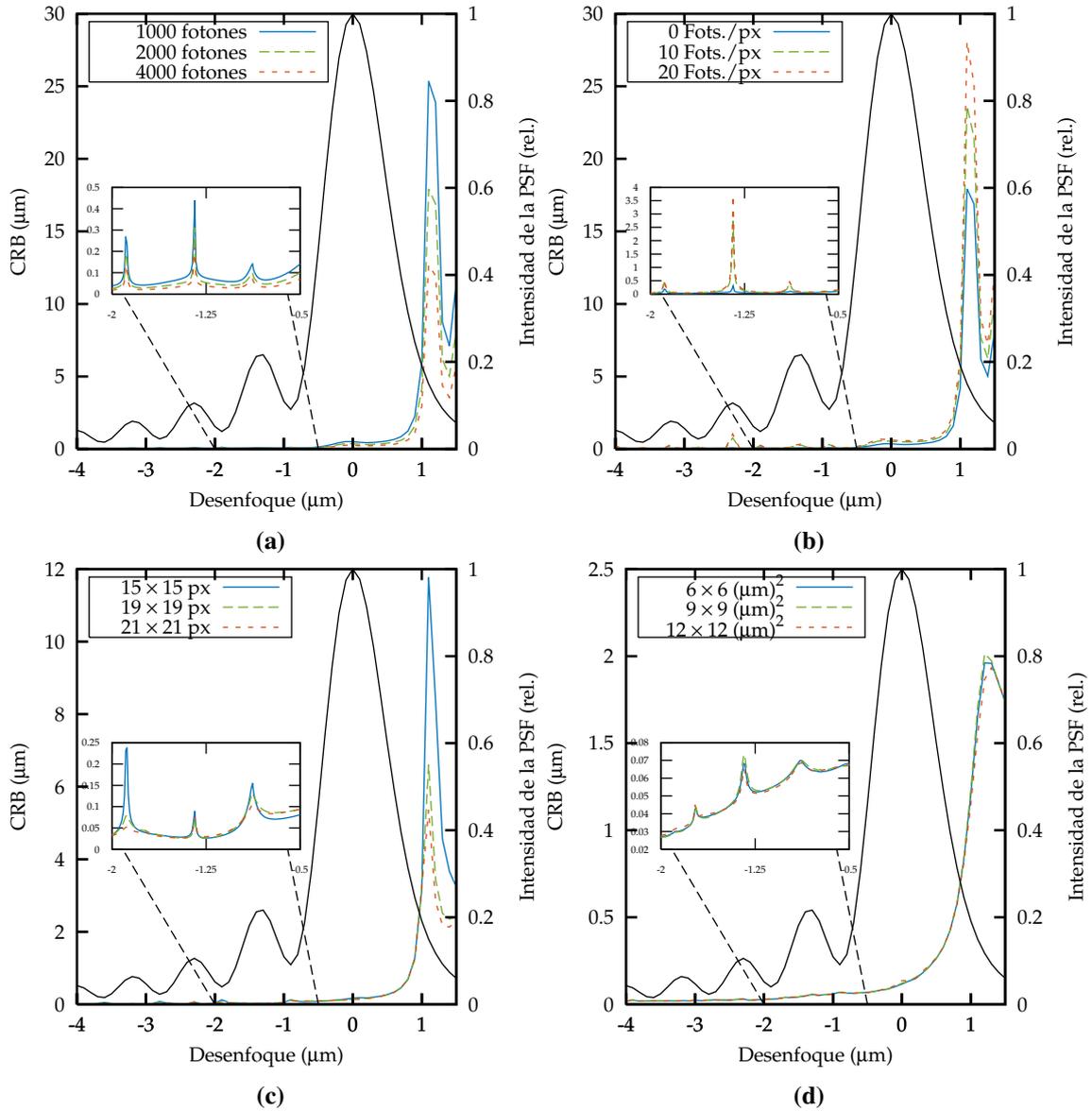


Figura 3.1: Cota inferior de Cramér-Rao (desviación estándar) obtenida a partir de la ecuación (3.11) usando el modelo de formación de la imagen dado por ecuación (2.9) y calculada para varias condiciones de adquisición. En negro se muestra el perfil de intensidad axial de la PSF para referencia.

3.3.2. Pruebas de convergencia

La convergencia de los métodos fue evaluada con datos libres de ruido, utilizando la aproximación de la **tasa de convergencia (ROC, Rate of Convergence)** dada por:

$$\alpha_{\text{ROC}} \approx \frac{\log(e^{(m+1)}/e^{(m)})}{\log(e^{(m)}/e^{(m-1)})}, \quad (3.12)$$

donde $e^{(m)} = t_s^{(m)} - t_s^{(m-1)}$.

Los resultados mostraron que todos los métodos generan una secuencia de estimaciones logarítmicas lineales y con similar número de iteraciones (ver Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Resultados prueba de convergencia

Método	Iteraciones	α_{ROC}
MIDIV	9	1.0
ML	9	1.0
LSQR	10	1.0

3.3.3. Pruebas preliminares exploratorias

Antes de realizar una prueba exhaustiva de los métodos, se efectuó un análisis preliminar con el objetivo de saber cómo se distribuyen las estimaciones de los métodos, en relación al estimador inicial. Este análisis también permitió definir un rango de estimadores iniciales que producen una convergencia aceptable. Para lograr esto, se generaron estimaciones iniciales distribuidas uniformemente en un intervalo que contiene el valor exacto o *ground truth* $t_s = 5 \mu\text{m}$. Para cada ejecución, los métodos utilizaron los mismos estimadores iniciales de la mencionada aleatorización, máximo número de iteraciones y tolerancia. Los resultados para esta prueba se sintetizan en los *boxplots* de la Figura 3.2.

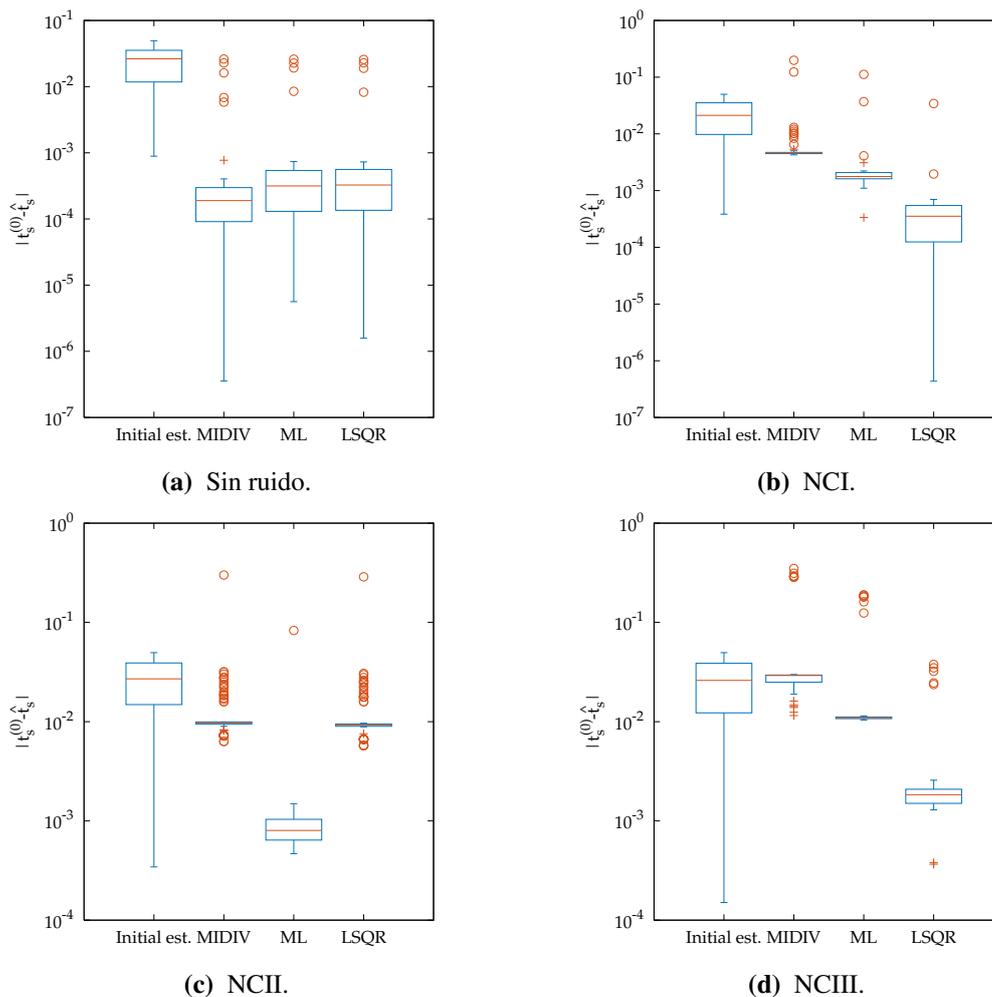


Figura 3.2: Estadística descriptiva de los residuos de las estimaciones iniciales y las obtenidas con los métodos. Los residuos fueron calculados como el valor absoluto de la diferencia entre las estimaciones y el valor exacto de prueba.

3.3.4. Evaluación exhaustiva de los métodos

En base a los resultados preliminares, y teniendo en cuenta las características del instrumento de referencia (ver [Apéndice C](#)), se generaron imágenes a partir del modelo de formación de la imagen de la ecuación [\(2.9\)](#) con un tamaño de 19×19 pxel y considerando una longitud de onda de emisión correspondiente al pico máximo de emisión del Cy3, 560 nm. La prueba de los métodos utilizando cortes axiales se realizó con el pico de la [PSF](#) centrado en la imagen y considerando 19 secciones ópticas. En la [Figura 3.3](#) se presentan muestras del conjunto de imágenes empleadas para el análisis.

Los métodos fueron comparados a partir de las estimaciones de la posición axial que devolvieron como resultado. Se utilizó un conjunto de 3000 realizaciones de [PSFs](#) para cada condición de ruido generada y en la profundidad $5 \mu\text{m}$ respecto del cubreobjetos (t_s). Las estimaciones iniciales fueron generadas aleatoriamente desde una distribución uniforme en el rango de $(5.000 \pm 0.500) \mu\text{m}$ para secciones ópticas, y en el rango $(5.000 \pm 0.250) \mu\text{m}$ para los cortes axiales. Como criterio general de comparación se utilizaron intervalos de confianza computados al 0.1 % para cada estadístico. Para lograr este objetivo se empleó la técnica no paramétrica *bootstrap* basada en percentiles [\[84, Capítulo 8\]](#)[\[50, Capítulo 13\]](#).

El primer criterio empleado para el análisis y comparación de los métodos de estimación fue el porcentaje de éxito. Este se obtuvo considerando aquellas estimaciones que no alcanzaron el máximo número de iteraciones y que fueron incluidas en el intervalo de estimaciones iniciales. Como criterio de comparación se tomó un 95 % de éxito (línea punteada en todas las subfiguras de la [Figura 3.4](#)). Una vez que se determinó el porcentaje de éxito, fueron computadas la totalidad de las restantes mediciones: tiempo, iteraciones, medias y desviaciones estándar. Para esto, se tuvo en cuenta solo aquellas estimaciones que lograron la convergencia de acuerdo al criterio de éxito de convergencia planteado. Estos resultados se muestran en las [Figuras 3.5](#) y [3.6](#).

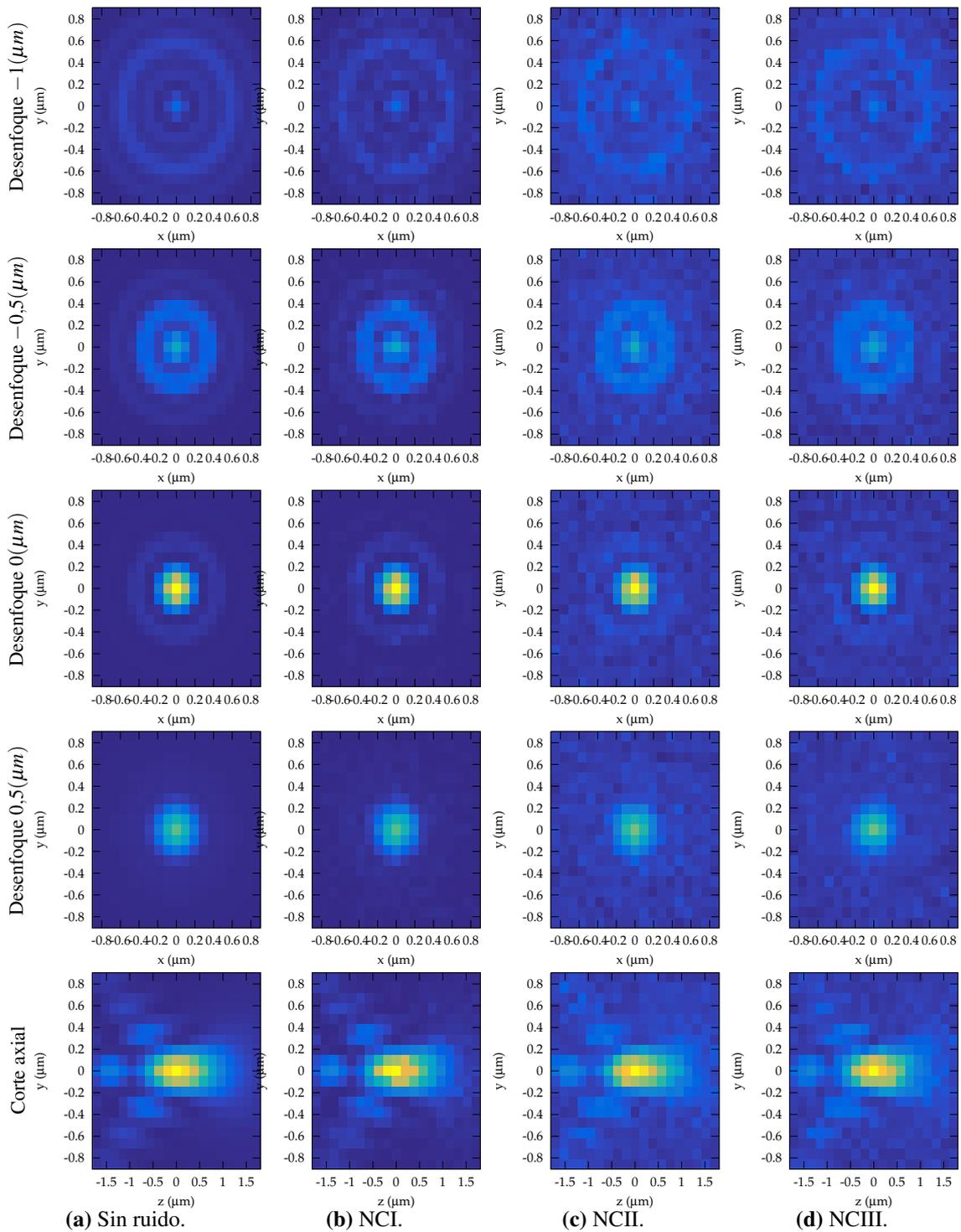


Figura 3.3: Muestras de imágenes de fuentes puntuales obtenidas con el modelo de Gibson y Lanni [54] en la columna (a). Las columnas (b) a (d) corresponden a las imágenes de la columna (a) degradadas por la acción de diferentes fuentes ruido. El último renglón corresponde a los cortes axiales.

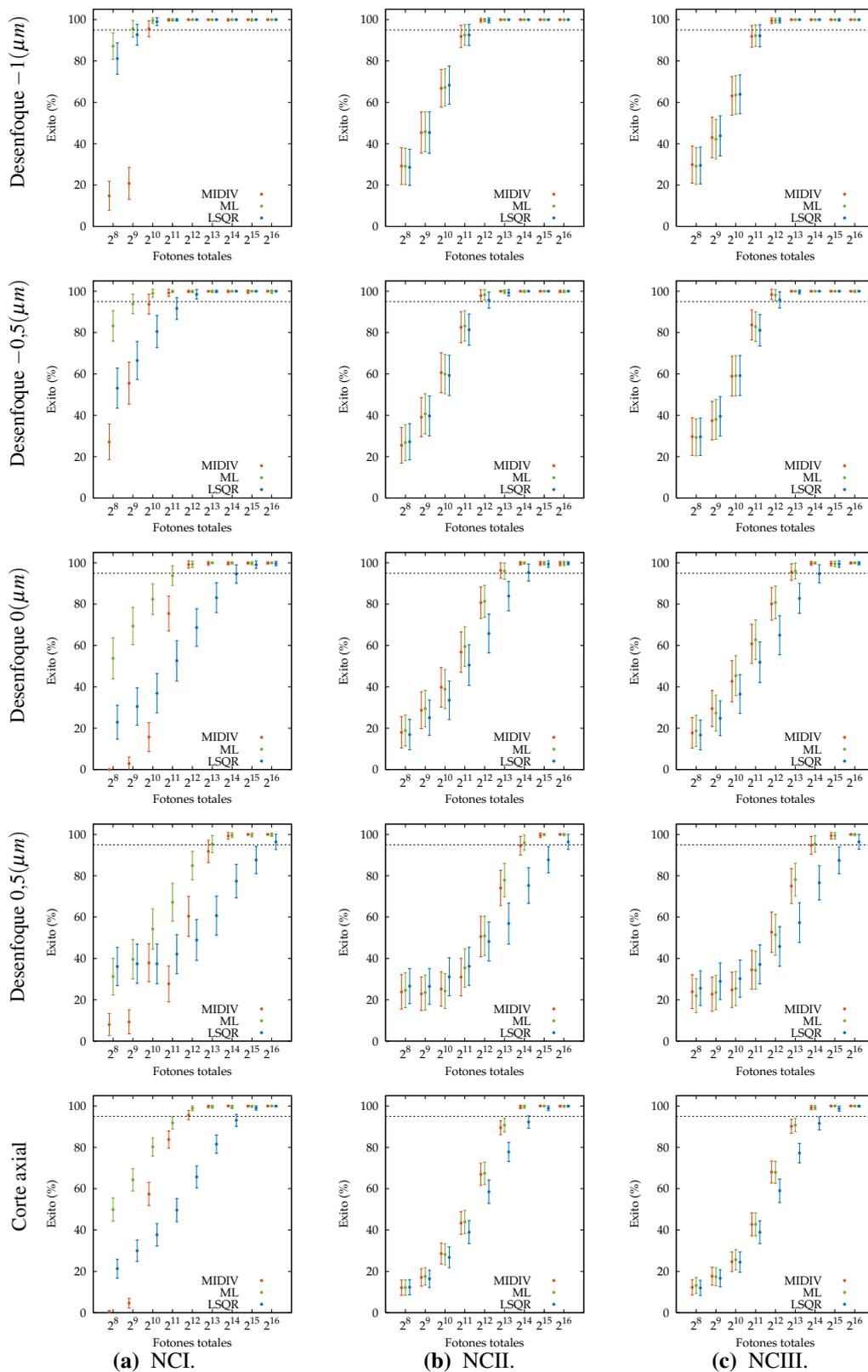


Figura 3.4: Porcentaje de éxito de los métodos en secciones ópticas. Como valor de referencia del éxito de los métodos se toman aquellos que superan el 95%. Los resultados se representan como estimaciones puntuales de la media de los porcentajes de éxito y sus intervalos de confianza.

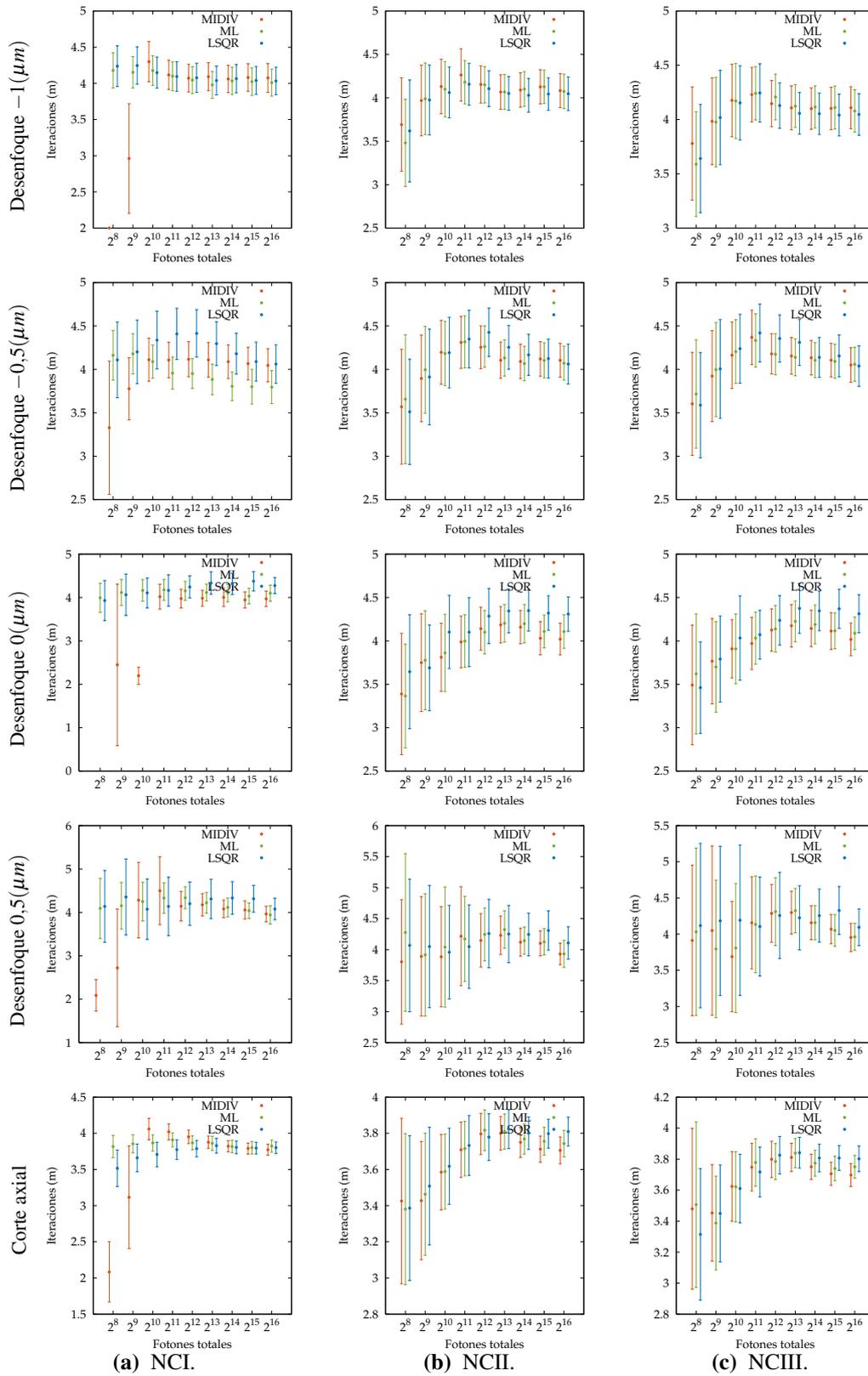


Figura 3.5: Resultados de las iteraciones de los métodos representadas como estimaciones puntuales de la media del número de iteraciones y sus intervalos de confianza.

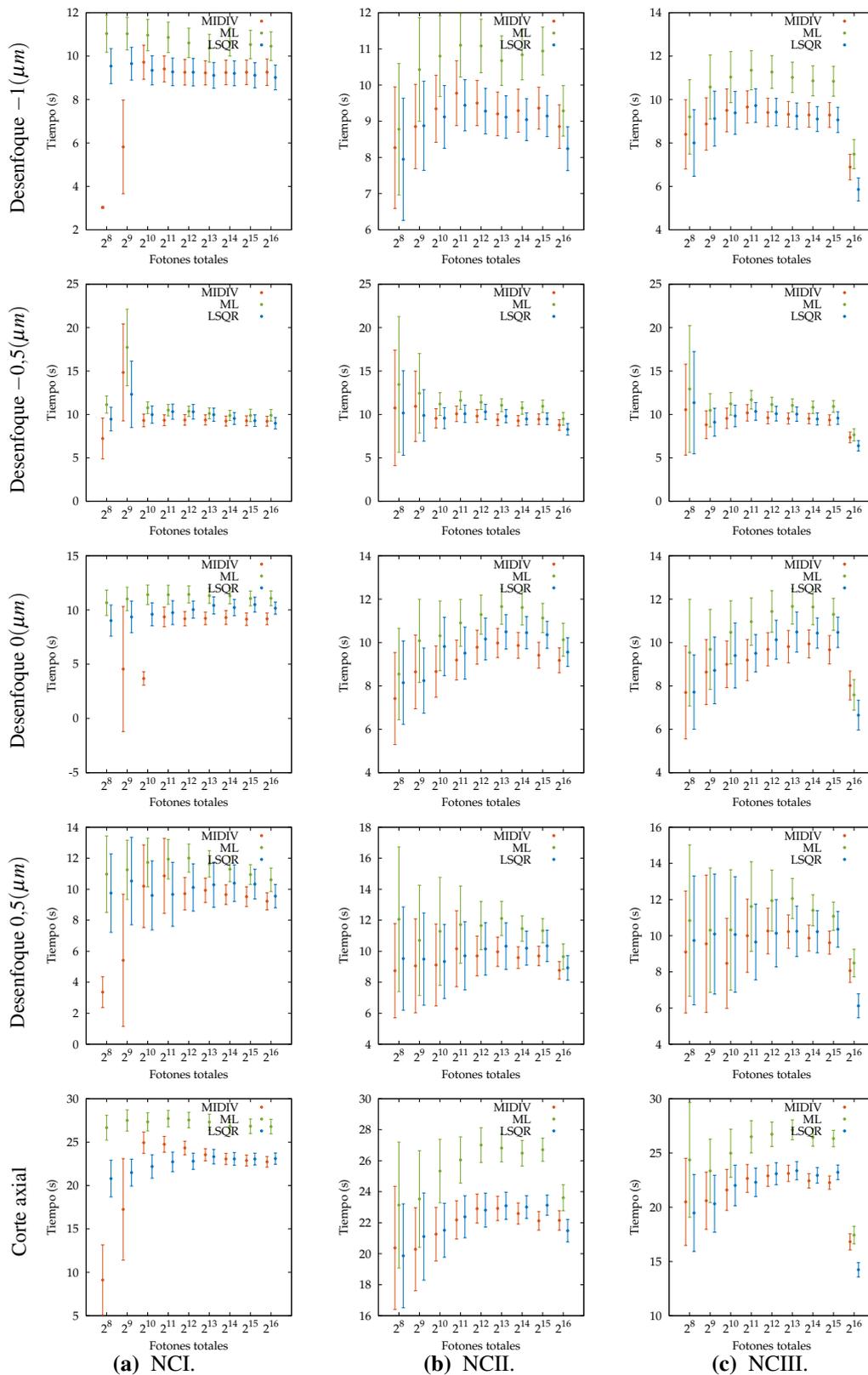


Figura 3.6: Los resultados de las mediciones de tiempo de los métodos se representan como estimaciones puntuales de la media del tiempo total de cómputo por cada estimación de parámetros y sus intervalos de confianza.

La exactitud y la precisión de cada método fue mensurada empleando las medias y las desviaciones

estándar de las estimaciones, respectivamente [31]. Las desviaciones estándar también fueron comparadas con la CRLB con el propósito de establecer si los métodos estudiados lograban alcanzar esta cota teórica y, en el caso de que fuese así, determinar bajo qué condiciones ocurre. Los resultados se muestran en las Figuras 3.7 y 3.8.

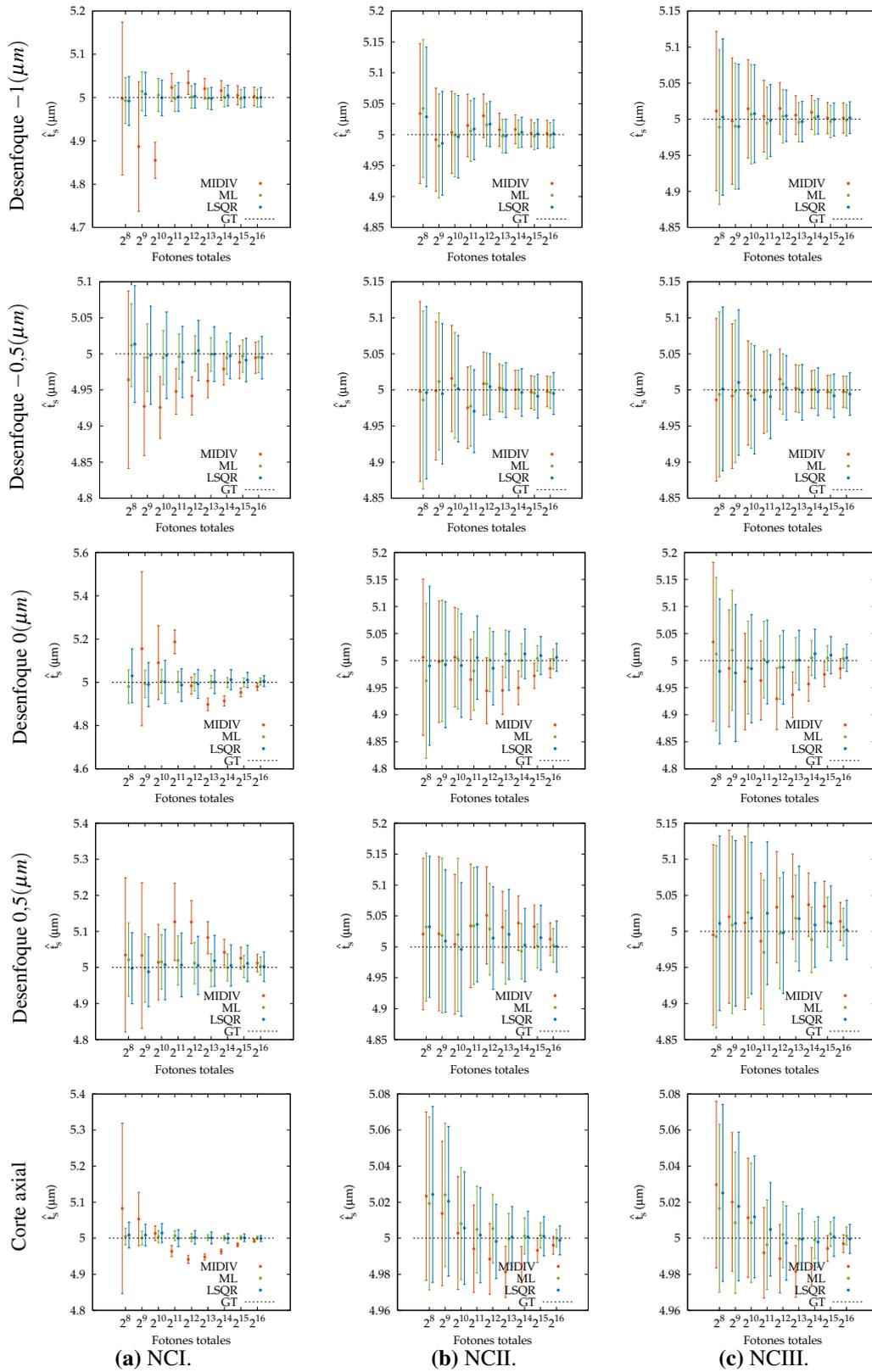


Figura 3.7: Exactitud de los métodos. La línea punteada ($5(\mu m)$) representa el valor exacto a partir del cual se generaron los datos. Los resultados de la exactitud se presentan como las estimaciones puntuales de la media del conjunto de estimaciones de t_s y sus intervalos de confianza.

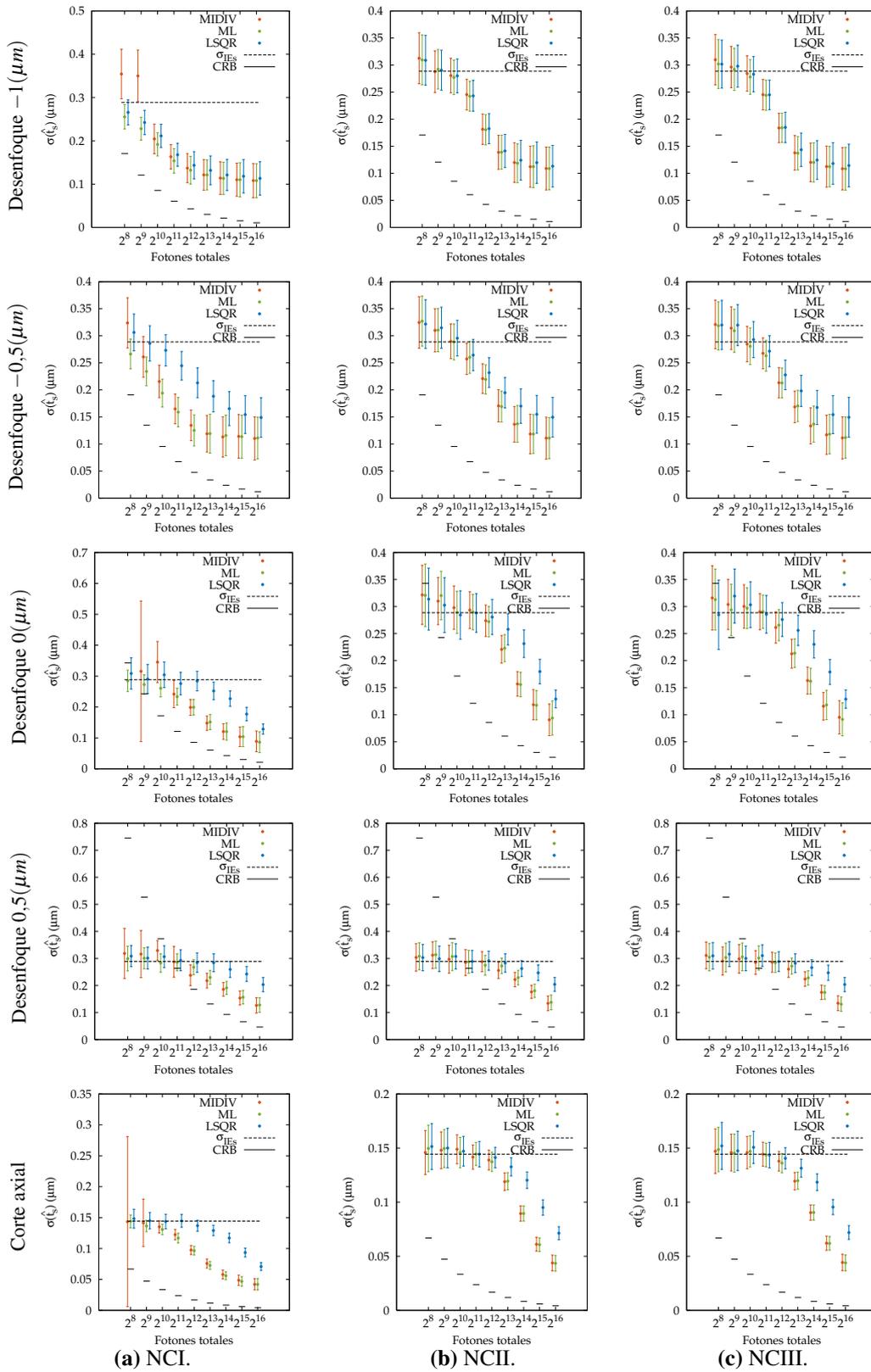


Figura 3.8: Precisión de los métodos. En línea de puntos se representa la desviación estándar teórica de las estimaciones iniciales (σ_{IEs}). En segmentos de línea sólida se representa la **CRLB** para cada valor de intensidad. Los resultados de la precisión se presentan como estimaciones puntuales de las desviaciones estándar de las estimaciones de t_s y sus intervalos de confianza.

Los análisis previos mostraron que, en términos de precisión, todos los métodos parecen poseer mejor capacidad de estimación cuando se utilizan secciones axiales. Esto sugiere que la información que hay del parámetro t_s es más rica en la dirección del eje óptico, como también lo sugiere la distribución teórica de intensidades que genera el modelo. Sin embargo, en la evaluación general, ningún método tuvo mayores porcentajes de éxito y exactitud con el empleo de secciones axiales. Por esta razón, se planteó una prueba de estimación utilizando sólo los datos que corresponden al eje óptico.

En esta prueba se incluyó un elevado número de fotones con el propósito de evidenciar si la precisión de los métodos alcanzaría la **CRLB**. Los resultados, representados en la Figura **3.9**, mostraron que los métodos tienen un comportamiento similar cuando se consideran los datos del eje óptico. Para los valores de **SNR** considerados, todos los métodos lograron un alto porcentaje de éxito, siendo MIDIV cualitativamente más rápido que ML y LSQR. En estas condiciones, los intervalos de confianza de las medias de los tres métodos incluyeron el valor exacto y, a medida que la cuenta de fotones aumenta, los intervalos de confianza se estrechan. En relación a la precisión, excepto para una baja **SNR** en las que los intervalos de confianza de las desviaciones estándar son muy grandes, sólo ML y MIDIV alcanzan la **CRLB**.

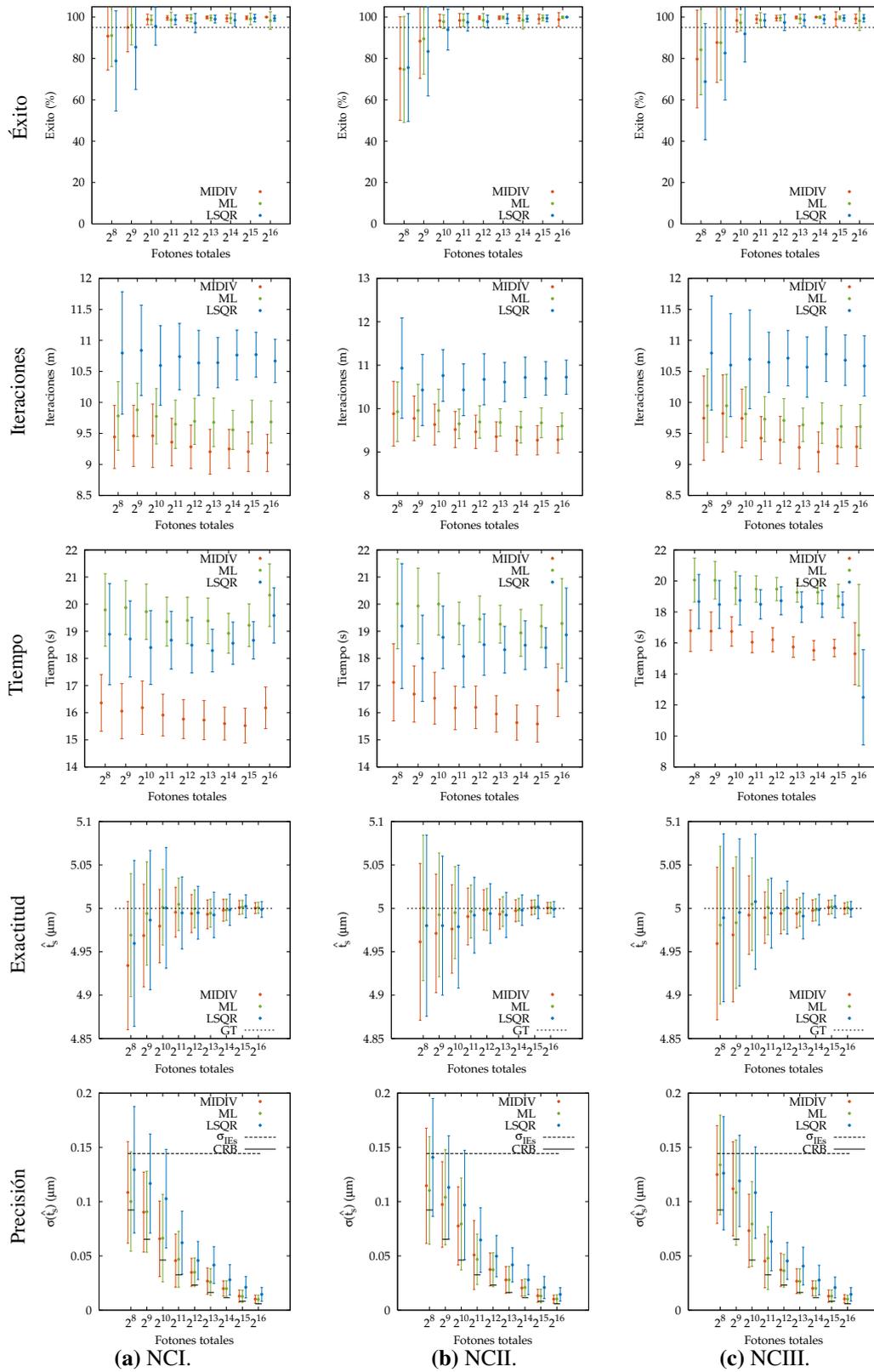


Figura 3.9: Resultados de las mediciones con datos tomados a lo largo del eje óptico.

3.3.5. Estimación de la posición axial utilizando datos reales de una PSF experimental

Para esta etapa se utilizó la configuración experimental propuesta por Aguet et al. [11, 10]. Se utilizaron microesferas fluorescentes de $(0.170 \pm 0.005) \mu\text{m}$ de diámetro obtenidas de una solución 3×10^9 beads/ml que fue diluida al 1 % en agua destilada siguiendo las instrucciones del fabricante (P7220, PS-Speck Microscope Point Source Kit, Molecular Probes, Inc.). Se depositaron delicadamente unas gotas de la solución preparada tanto en el cubreobjetos como en el portaobjetos y se dejaron secar en la oscuridad. Los vidrios fueron colocados superpuestos con una pequeña gota de solución antidecayente, de manera tal que esta permitió la formación de una fina capa entre las superficies de los vidrios. La adquisición de las imágenes por SO se realizó cada 180 nm en el instrumento de referencia (ver detalles en el Apéndice C).

La posición axial t_s de la PSF experimental fue estimada por los tres métodos. Los datos empleados corresponden a las secciones ópticas en las que se registraron esferas localizadas sobre el portaobjetos. Como primera aproximación, se realizó un cálculo directo de la *I-divergence*, log-verosimilitud y del error cuadrático en el intervalo de $65 \mu\text{m}$ a $90 \mu\text{m}$ de profundidad. Los resultados fueron analizados gráficamente para delimitar un intervalo más pequeño que contuviese el óptimo, y así ingresar una estimación inicial más precisa a los métodos. Una vez que la posición fue estimada por los tres métodos y dado que no es posible conocer su valor exacto, se utilizó el FWHM como criterio alternativo de comparación.

Los métodos de estimación dieron resultados cualitativos similares, tal como puede observarse en la Figura 3.10. De acuerdo a la comparación de las FWHMs lateral y axial, todos los métodos produjeron el mismo resultado hasta el tercer decimal, como se verifica en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Mediciones del FWHM en una PSF experimental y en el modelo de Gibson and Lanni luego de la estimación de t_s .

	Axial μm	Lateral μm
Exp. PSF	1.303	0.377
MIDIV	1.301	0.387
ML	1.301	0.387
LSQR	1.301	0.387

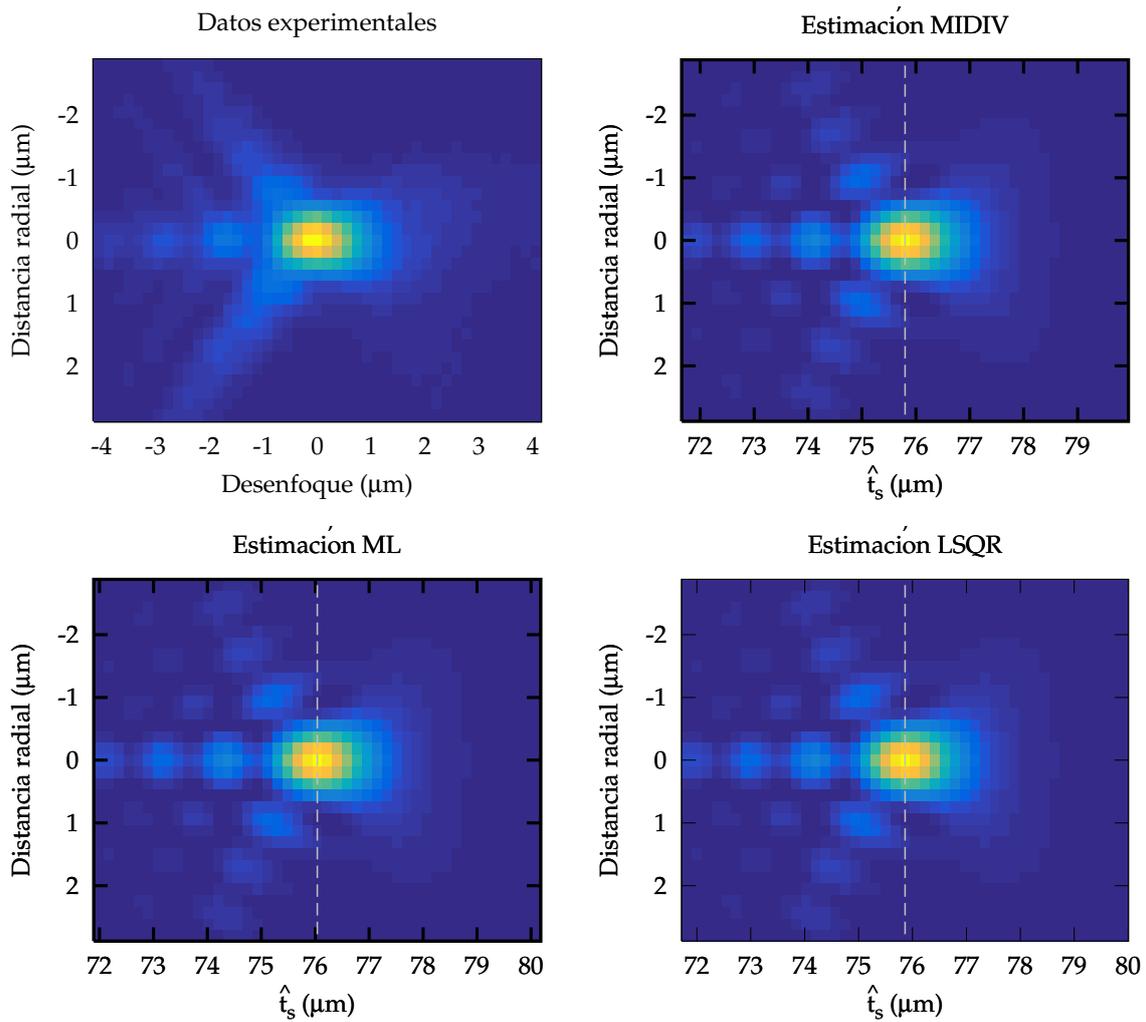


Figura 3.10: Imágenes pseudocoloreadas de 45×31 píxeles. En la izquierda superior, imagen de una microesfera fluorescente de $(0.170 \pm 0.005) \mu\text{m}$ de diámetro. En sentido de giro de las agujas del reloj, las PSFs sintéticas obtenidas luego de estimar la posición axial t_s por los métodos MIDIV, LSQR and ML, respectivamente.

3.4. Discusión y conclusiones

Para la determinación analítica de la **PSF** se analizaron tres técnicas de estimación de parámetros: minimización de la divergencia, máxima verosimilitud [11] y mínimos cuadrados [73]. Todas las expresiones a optimizar son de carácter no lineal y fueron aproximadas utilizando la misma representación numérica (ver **Apéndice D**), obteniendo tres algoritmos iterativos que difieren del criterio de comparación entre los datos y el modelo.

En relación al análisis de la **CRLB** se observó que esta exhibe importantes cambios en relación a la posición del pico de la **PSF**. Aquellos planos desenfocados que se encuentran entre la lente y el pico de la **PSF**, (desenfoque negativo (-DF)), generaron una **CRLB** significativamente menor que los que se ubican más allá del pico de la **PSF**, (desenfoque positivo (+DF)). Adicionalmente, la **CRLB** se tornó más pequeña conforme el -DF incrementó en magnitud (ver Figura 3.1a). Sin embargo, debe aclararse que la **CRLB** computada para cada plano posee el mismo conteo de fotones, algo

que usualmente no sucede en la práctica, debido a que el tiempo de exposición es, en general, fijo durante la adquisición del seccionamiento óptico.

Como era dable esperar, el incremento en el conteo de fotones produce una disminución de la cota de Cramér-Rao (ver Figura 3.1a). Por el contrario, los incrementos en el nivel de fondo, empeoran la mejor precisión alcanzable (ver Figura 3.1b). El error de estimación, para grandes desenfoques, se vuelve más pequeño si se utiliza mayor número de píxeles. Esta es la razón por la que es necesario considerar mayor número de píxeles para cubrir el gran esparcimiento que tiene la PSF a grandes desenfoques. No se verificaron cambios significativos de la CRLB en relación al tamaño de píxel para los valores probados (Figura 3.1d).

Respecto de la convergencia de los métodos, se sabe que la técnica de optimización numérica empleada tiene una convergencia teórica cuadrática. Sin embargo, en las pruebas realizadas en imágenes con y sin ruido, los métodos mostraron tener una convergencia logarítmica lineal. Esto puede atribuirse a que la determinación de la derivada del modelo fue aproximada por una diferencia finita. Esta convergencia podría mejorarse mediante la obtención de la derivada analítica del modelo respecto del parámetro, en aquellos casos que sea matemáticamente posible.

Una desventaja de la forma de optimización, también discutida por Aguet et al. [11], es que requiere una buena estimación inicial. La velocidad de los métodos de estimación podría mejorar incrementando los términos en la representación en serie de Taylor. Sin embargo, esto requiere una evaluación adicional del desempeño en estas condiciones, debido a que podría aumentarse el tiempo de cómputo al considerar las derivadas de mayor orden. En relación a los tiempos de cómputo, no debe soslayarse la cuestión práctica. Por ejemplo, si el caso es realizar estimaciones de parámetros para la calibración del instrumento, la incidencia de los tiempos de cómputo, que están por debajo de los treinta segundos, es insignificante para los tiempos que manejan los microscopistas. Estos factores, conjuntamente con el análisis del desempeño de la aproximación del modelo de Gibson y Lanni de Li et al. [76], constituyen interesantes desafíos para indagar en el futuro.

En relación con las pruebas de exploración, se puede decir que la distribución de los residuos de los métodos de estimación, se torna más angosta que la de los residuos de las estimaciones iniciales (ver Figura 3.2a). Sin embargo, este no es el caso para datos con ruido, dado que las estimaciones obtenidas con los métodos, cambian para cada realización de la PSF. Las Figuras 3.2b, 3.2c y 3.2d muestran el deterioro de la precisión en presencia de ruido. Esto condujo a la prueba exhaustiva con un gran número de realizaciones de la PSF con el propósito de evaluar el desempeño de los métodos con datos afectados por ruido.

Los resultados de las estimaciones en las pruebas exhaustivas, para todas las direcciones analizadas, mostraron que los métodos tienen un mayor porcentaje de éxito cuando se utilizan las secciones ópticas con un mayor -DF. Para todas las secciones ópticas y cortes axiales, cuando se añade una fuente extrínseca de ruido, el porcentaje de éxito de los métodos disminuye. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las fuentes de ruido aplicadas (obsérvese el mismo método en columnas (b) y (c) de la Figura 3.4). Para la condición NCI, el método ML mostró tener mayor porcentaje de éxito que los métodos MIDIV y LSQR, para la mayoría de las secciones ópticas y cortes axiales. Para las condiciones NCII y NCIII, los métodos ML y MIDIV mostraron el mismo comportamiento alcanzando porcentajes de éxito mayores que LSQR.

El número de iteraciones que les insumió a los métodos (resumidos en la Figura 3.5) fue prácticamente idéntico (4 iteraciones) para todas las direcciones espaciales y condiciones de ruido analizadas. El número medio de iteraciones no cambió con el número de fotones capturados. En relación a los tiempos de estimación, como puede observarse en la Figura 3.6, ML mostró ser, en promedio, más lento que LSQR y MIDIV en las secciones más -DF y en los cortes axiales. En el resto de los casos, el tiempo de cómputo fue prácticamente el mismo para todos los métodos.

Los resultados obtenidos indican que la estimación de la posición axial utilizando el modelo de Gibson y Lanni requiere una alta SNR para alcanzar un 95 % de éxito, y mucho más aún para estar cerca de la CRLB. De hecho, solamente los métodos ML y MIDIV (último renglón de la Figura 3.9) alcanzaron la precisión teórica dada por la CRLB cuando se consideraron datos coincidentes con el eje óptico. Las pruebas realizadas empleando secciones ópticas con un mayor -DF (resultados no mostrados), no proveyeron mejoras en la precisión exhibida en el primer renglón de la Figura 3.8. Sin embargo, para la correcta interpretación de los resultados y cuando se desea extrapolarlos a situaciones reales, debe aclararse que en general, en la práctica, el tiempo de exposición del CCD es fijo durante un SO por lo tanto, cuanto más alejada esté la sección óptica, la intensidad registrada será menor, ya que disminuye el ingreso de luz en la lente.

La incidencia de las fuentes extrínsecas de ruido (NCII o NCIII) mostraron empeoramiento del porcentaje de éxito de los métodos, aunque no se hallaron diferencias entre las fuentes de ruido. De hecho, si se comparan las columnas NCII y NCIII de las Figuras 3.4 a 3.8, el resultado cualitativo guarda un alto grado de similitud. En otras palabras, los métodos de estimación pueden converger en casos de errores de especificación de los modelos fuente extrínsecas aditivas de ruido.

Los resultados, que se resumen en la Figura 3.7 muestran que los intervalos de confianza de las medias de las estimaciones de los tres métodos contienen el valor exacto en la mayoría de los casos. Particularmente, MIDIV exhibe diferencias significativas en algunos niveles de intensidad, tanto en secciones ópticas como en el corte axial. Adicionalmente, se observa que las medias de las estimaciones tienden asintóticamente hacia el valor exacto, conforme se incrementa el número de fotones. Asimismo, los intervalos de confianza de las estimaciones medias se estrechan en los planos más desenfocados en la dirección de -DF comparados con aquellos en la dirección de +DF. Para un mismo desenfoque, cuando se añade una fuente extrínseca (NCII o NCIII), los intervalos de confianza de las medias se ensanchan respecto de NCI, pero no se verifican diferencias entre métodos, ni tampoco entre las fuentes de ruido extrínsecas.

Los resultados relacionados con la precisión se representan en la Figura 3.8. Se puede observar que la precisión de los tres métodos es prácticamente la misma cuando se utilizan secciones ópticas muy desenfocadas en la dirección de -DF, para todos los casos de ruido. LSQR, mostró ser menos preciso que ML y MIDIV para el caso NCI cuando se utilizaron secciones ópticas desenfocadas cercanas al pico de la PSF. Para las condiciones NCII y NCIII, todos los métodos alcanzaron la misma precisión, la que mejoró con las secciones ópticas más desenfocadas en la dirección del -DF.

Para el caso NCI y en todas las direcciones analizadas, a medida que aumenta el conteo de fotones, la CRLB disminuye (ver Figura 3.8). Resultados similares se obtuvieron para las condiciones NCII y NCIII, sin embargo, como es dable esperar, los métodos requieren mayor número de fotones para lograr una mejor precisión que la de los estimadores iniciales. No se encontraron diferencias

intramétodo para los casos de ruido NCII y NCIII en las secciones ópticas. La aplicación sobre el corte axial de los métodos de estimación ML y MIDIV, no mostraron diferencias significativas entre sí, pero sí con el método LSQR .

Para las secciones ópticas ubicadas en los puntos de desenfoque $0 \mu\text{m}$ y $0.5 \mu\text{m}$ para una **SNR** baja, la precisión lograda parece estar más allá de la cota teórica, pero esto debe ser considerado cuidadosamente debido a que, en estos casos, la **CRLB** es mayor que la desviación estándar de las estimaciones iniciales que está alrededor de 280 nm. Por ejemplo (ver Figura **3.8**), para la sección óptica ubicada a $-0.5 \mu\text{m}$ caso NCI, la **CRLB** está alrededor de los 200 nm. Por el contrario, la **CRLB** de la sección óptica a $0.5 \mu\text{m}$ está en 750 nm.

En los cortes axiales, los métodos mejoraron la precisión conforme se incremento el número de fotones, y la precisión alcanzada fue mejor que la obtenida empleando secciones ópticas. Sin embargo, debe puntualizarse que el rango de estimaciones iniciales debió hacerse más pequeño, ya que con el mismo rango empleado para las secciones ópticas, se obtuvieron valores de porcentaje de éxito muy bajos.

Finalmente, debe efectuarse una referencia al método MIDIV. En esta aproximación no se realizaron suposiciones sobre el ruido, lo cual constituye una ventaja frente a los métodos ML y LSQR. El método MIDIV alcanzó la **CRLB** en condiciones similares a las del método ML. Sin embargo, se realizó una potente hipótesis sobre la **PSF** experimental: esta representa una densidad de probabilidad concordante con la ley de grandes números. Esta suposición es válida cuando el número de fotones tiende a infinito, lo cual no se cumple en la práctica. En circunstancias reales, el número de fotones es finito y la variabilidad de intensidad en cada píxel es diferente, debido al ruido basal intrínseco en la señal.

La estimación de la posición t_s , mediante los tres métodos analizados, para una determinación de la **PSF** experimental, arrojó resultados similares. Los **FWHMs** tanto en las direcciones axial como lateral fueron evaluados y todos los métodos mostraron el mismo resultado hasta el tercer decimal. Sin embargo, para obtener una conclusión más sólida respecto de la aplicación de los métodos a datos de capturas reales, es necesario ejecutar experimentos más completos y controlados, los cuales actualmente están fuera del alcance de las capacidades del **LAMAE** y de otros laboratorios cercanos.

Capítulo 4

Restauración de imágenes

Por definición, restaurar es la acción de llevar algo que ha sufrido un deterioro a su estado original. Esto lleva implícita la idea de que quien ejecuta dicho procedimiento debe conocer dicha condición, o bien, saber las transformaciones sufridas para que estas puedan ser revertidas. En los procesos de restauración de imágenes de MFCA, el proceso consiste en reubicar la fluorescencia a sus posiciones originales. Esto requiere conocer cómo fue modificada en su trayecto por el camino óptico, esto es, desde el espécimen hasta el detector.

Como se mencionó en la Sección 1.4, la restauración de imágenes en la MFCA comenzó a ser utilizada tiempo después de haber sido aplicada en otras áreas de la ciencia e ingeniería y se basó principalmente en la aplicación de algoritmos de desconvolución. En los últimos años se ha desarrollado un conjunto de técnicas de desconvolución para ser aplicadas a la MFCA que consideran la variación de la PSF en la profundidad. Algunas de estas técnicas han utilizado el modelo de Gibson y Lanni, o bien versiones simplificadas o extendidas (p. ej. variación del índice de refracción en el espécimen), como modelo de formación de la imagen óptica. De acuerdo a la bibliografía revisada y en base a la reproducción de resultados, para el tratamiento de imágenes se consideró valioso formular una propuesta que tuviese en cuenta la variación de la PSF en la profundidad, utilizando técnicas no lineales de restauración.

Por lo tanto, para esta etapa se asume que el modelo de formación de la imagen está adecuadamente representado por la ecuación (2.8). A partir de este modelo de formación de la imagen, se analiza cuál es el desempeño de las técnicas de restauración cuando se asume que el modelo directo es invariante, invariante por capas o estratos (proponiéndose una forma alternativa a la de Preza et al. [93]), y completamente variante en la profundidad; siendo este último también una contribución original de esta tesis.

En el Capítulo 1 se mencionó que dentro del grupo de técnicas de desconvolución no lineal se pueden considerar varias formulaciones. Estas, en algunos casos, consisten en modificaciones de métodos lineales. Por ejemplo, en la formulación aditiva, la corrección aparece como un término que se suma al estimador actual, multiplicada por la función de relajación. El método de Jansson es una versión modificada de este método lineal, que asume una forma de función de relajación que conduce una solución no lineal. Otro caso, es el de la formulación multiplicativa, que logra la corrección multiplicando al estimador actual. En este grupo aparecen métodos como el Gold y el

de Richardson-Lucy, entre otros.

La formulación aditiva se basa en el método iterativo de relajación de punto simultáneo comentado en el [Capítulo 1](#). Es una formulación general que puede obtenerse reescribiendo la ecuación [\(1.8\)](#) con el parámetro de relajación, κ que depende de $\hat{\delta}^{(k)}$. Considerando que el modelo directo está adecuadamente representado con la operación de convolución, se tiene:

$$\hat{\delta}_n^{(k+1)} = \hat{\delta}_n^{(k)} + r \left[\hat{\delta}_n^{(k)} \right] \left(i_n - h_n * \hat{\delta}_n^{(k)} \right). \quad (4.1)$$

Este método iterativo se conoce como Jansson-Van Cittert, y el estimador inicial está dado por $\hat{\delta}_n^{(0)} = i_n$. Es conveniente aclarar que existen varias formas de funciones de relajación, siendo al menos tres las más conocidas. Estas se sintetizan en la [Tabla 4.1](#).

Tabla 4.1: Funciones de relajación utilizadas en el método Jansson-Van Cittert.

Autor	Función de relajación $r \left[\hat{\delta}_n^{(k)} \right]$
Van Cittert (1931)	r_0 si $\hat{\delta}_n^{(k)} \geq 0$ y 0 en otro caso
Jansson (1969)	$r_0(1 - 2 \hat{\delta}_n^{(k)} - \frac{1}{2})$
Agard (1984)	$1 - (\hat{\delta}_n^{(k)} - A)^2/A^2$

En los métodos de proporción se utiliza una corrección en forma multiplicativa para mejorar el estimador. Sibarita [\[103\]](#) propone la siguiente formulación general para los métodos de proporción:

$$\hat{\delta}_n^{(k+1)} = \hat{\delta}_n^{(k)} \left(\frac{i_n}{h_n * \hat{\delta}_n^{(k)}} \right)^p. \quad (4.2)$$

Si el exponente $p = 1$, entonces esta ecuación se corresponde con el método de Gold [\[103\]](#). Concordando con el método de Van Cittert y sus variantes, el estimador inicial está dado por $\hat{\delta}_n^{(0)} = i_n$. Debe notarse que si en la formulación aditiva de la ecuación [\(4.1\)](#), se elige $r \left[\hat{\delta}_n^{(k)} \right] = \frac{\hat{\delta}_n^{(k)}}{h_n * \hat{\delta}_n^{(k)}}$ se obtiene el método de Gold [\[125\]](#).

La maximización de la función de verosimilitud es también una estrategia utilizada para obtener estimadores de la distribución de la fluorescencia en especímenes bajo un modelo de formación imágenes dado. Al igual que en la estimación de parámetros analizada en el capítulo anterior, se supone que los datos de la imagen i_n están afectados por alguna fuente de ruido. Por lo tanto, la información estadística sobre el ruido presente en las imágenes es incorporada en esta familia de algoritmos. Estos algoritmos están basados en aproximaciones sucesivas, pero están contruidos de tal manera que estiman iterativamente la solución, teniendo en cuenta tanto degradación óptica como el ruido [\[103\]](#). Como se mencionó en el [Capítulo 1](#), Jansson [\[69\]](#) agrupó los métodos de maximización de la verosimilitud en la familia de los métodos de proporción, dado que el término de corrección aparece en forma multiplicativa. De acuerdo a Sibarita [\[103\]](#) la forma general está dada por:

$$\hat{\delta}_n^{(k+1)} = K \hat{\delta}_n^k \left(h_n * \frac{i_n}{h_n * \hat{\delta}_n^{(k)}} \right)^p, \quad (4.3)$$

donde h_n representa la **PSF** evaluada en la variable independiente invertida y K es una constante de normalización que asegura la conservación de la energía. En particular, si el exponente $p = 1$, el método es el que se conoce como Richardson-Lucy, siendo este método la base de la desconvolución ciega, cuya formulación está dada por:

$$\hat{o}_n^{(k+1)} = K \hat{o}_n^k \left(h_n^{(k)} * \frac{i_n}{\hat{h}_n^{(k)} * \hat{o}_n^{(k)}} \right) \text{ y} \quad (4.4)$$

$$\hat{h}_n^{(k+1)} = \frac{\hat{h}_n^{(k)}}{N} \left(\hat{o}_n^k * \frac{i_n}{\hat{o}_n^{(k)} * \hat{h}_n^{(k)}} \right). \quad (4.5)$$

En la ecuación (4.5) N es una constante de normalización relacionada a la unidad de volumen [103]. La inicialización del objeto se realiza haciendo $\hat{o}_n^{(0)} = i_n$ y el primer estimador de la **PSF** es calculado de forma teórica a partir de algún modelo de **PSF**. El par de ecuaciones (4.4) y (4.5), garantizan la no negatividad de la solución. Se pueden adicionar restricciones sobre la **PSF**, tales como simetría circular y limitación de banda de frecuencia, las cuales pueden emplearse para controlar la convergencia de h_n a una solución con sentido físico. Estas restricciones son agregadas en cada iteración, luego del cómputo de cada nuevo estimador. Por ejemplo, en el **SO** la simetría circular se logra plano por plano, promediando los valores equidistantes desde el centro de la imagen, sitio en el que debería ubicarse el eje óptico. La restricción de limitación de banda en frecuencia se impone fijando todos los valores de la transformada de Fourier de $h_n^{(k)}$ a cero por encima de la frecuencia de corte, que se supone conocida.

4.1. Técnicas de restauración aplicadas a MFCA

El interrogante que surge al tener un modelo de **PSF** que es variante en la profundidad es si la convolución es aún adecuada como modelo directo. A partir de los resultados presentados en los capítulos previos y en concordancia con lo señalado en la bibliografía revisada, es posible que las técnicas que tengan en cuenta esta varianza espacial produzcan mejores resultados que otras que asuman la convolución como modelo directo. Un aspecto que debe considerarse es si las técnicas que consideran la varianza, permiten obtener diferencias significativas en la restauración de imágenes y si estas conducen a una mejor estimación de la distribución de fluorescencia en el espécimen. Para lograr una aproximación a la respuesta que plantea este interrogante, en esta tesis además de la desconvolución se desarrollaron y analizaron dos estrategias, una que considera que la **PSF** es invariante por estratos o capas y otra en la que se considera la varianza completa en la profundidad.

La versión estratificada planteada en esta tesis procesa las capas separadamente, aplicando la técnica de ventaneo utilizada en el análisis y procesamiento de señales. Cada ventana es en realidad un bloque en el espacio del espécimen, formado por una serie de secciones ópticas, en el que se asume una **PSF** invariante. Para estas condiciones se requiere tener al menos una determinación de la **PSF** del sistema para establecer cómo se realizó la captura y la escala en el eje óptico que, como se vio

en el [Capítulo 2](#), se ve alterada por el [SO](#). Dado que cada bloque se asume invariante en el espacio, cualquier algoritmo de desconvolución podría ser aplicado para la restauración de cada bloque. En este sentido, se desarrolló un método que puede aplicar en forma estratificada cualquiera de los algoritmos de desconvolución mencionados previamente. Los resultados obtenidos en cada estrato son posteriormente solapados con los de los bloques anterior y posterior, para consolidar el resultado.

Las técnicas de restauración desarrolladas en esta tesis, constituyen adaptaciones de las formulaciones aditivas y multiplicativas. Estas representan la nueva situación del modelo directo, el cuál no responde a la operación de convolución, sino que se adaptaron para representar la integral general de las ecuaciones [\(1.6\)](#) o [\(1.7\)](#). Así, cada sección óptica se obtiene con la [PSF](#) correspondiente a la porción del espacio tridimensional que captura la lente objetiva.

En función de lo planteado precedentemente, para el caso de la formulación aditiva, se obtuvo la siguiente regla de iteración:

$$\hat{o}_n^{(k+1)} = \hat{o}_n^{(k)} + r \left[\hat{o}_n^{(k)} \right] \left(i_n - \text{FM}(h_n, \hat{o}_n^{(k)}) \right), \quad (4.6)$$

donde FM es la operación lineal que responde al modelo directo de formación de la imagen óptica. En esta situación simplificada, FM sólo depende de h_n y de $\hat{o}_n^{(k)}$, pero, como ya se mencionó en el [Capítulo 1](#), podría generalizarse representando una combinación lineal de funciones.

Asimismo, esta modificación puede ser aplicada en la formulación multiplicativa, en la cual se obtiene:

$$\hat{o}_n^{(k+1)} = \hat{o}_n^{(k)} \left(\frac{i_n}{\text{FM}(h_n, \hat{o}_n^{(k)})} \right)^p. \quad (4.7)$$

Tanto para la ecuación [\(4.6\)](#) como para la [\(4.7\)](#), el estimador inicial está dado por $\hat{o}_n^{(0)} = i_n$ y, además, está garantizada la positividad de la solución.

4.2. Error en métodos iterativos

Todos los métodos planteados y propuestos hasta aquí son iterativos, por lo tanto, la decisión de dar continuidad al proceso de aproximaciones sucesivas, generalmente, está basada en que se alcance una cota mínima de error. Retornando a la notación matricial de la ecuación [\(1.7\)](#), si se conociese el valor exacto de la distribución de fluorescencia \mathbf{o} , la decisión de continuar iterando debería basarse en la función error:

$$\mathbf{E} = \mathbf{o} - \hat{\mathbf{o}}, \quad (4.8)$$

sin embargo, en la mayoría de los casos prácticos, \mathbf{o} es desconocida y la forma alternativa, generalmente aceptada, es evaluar el residuo entre la imagen \mathbf{i} y la imagen estimada por $\hat{\mathbf{i}}$ dado por:

$$\mathbf{R} = \mathbf{i} - \mathbf{H}\hat{\mathbf{o}}, \quad (4.9)$$

donde \mathbf{R} contiene los efectos de los ruidos intrínseco y extrínseco de \mathbf{i} .

En 1993, Crilly [\[69\]](#), [Capítulo 5](#)] demostró que si la formación de la imagen está contaminada por

una fuente extrínseca de ruido, \mathbf{n}_{ext} , el error del estimador está dado por:

$$\mathbf{o} - \hat{\mathbf{o}} = \mathbf{H}^{-1} \mathbf{R} - \mathbf{H}^{-1} \mathbf{n}_{\text{ext}}. \quad (4.10)$$

Esta ecuación implica que, aun si se obtuviesen valores residuales pequeños \mathbf{R} y si \mathbf{H} es no singular, pero \mathbf{H}^{-1} está mal condicionada, entonces el valor de \mathbf{E} podría ser muy grande. Por lo tanto, un residuo \mathbf{R} pequeño no necesariamente conduce a una solución exacta. Este análisis preliminar lleva a plantear cuál sería el criterio a seguir para seleccionar el algoritmo que genere menor error \mathbf{E} . En este sentido, se consideró, como primera aproximación, la estrategia que explora por medio de las simulaciones qué condiciones y conjunto de parámetros en un algoritmo iterativo hacen que el error \mathbf{E} y el residuo \mathbf{R} disminuyan en conjunto y progresivamente en cada iteración.

4.3. Resultados

Se realizaron pruebas exploratorias que pueden agruparse en análisis de secciones ópticas y de cortes axiales. En el análisis de las técnicas aplicadas a secciones ópticas, se consideró que el espécimen es plano y posee una distribución de fluorescencia conocida (objeto de referencia). Este se convolucionó con una **PSF** bidimensional ubicada a $5 \mu\text{m}$ de profundidad obtenida con el modelo de Gibson y Lanni. La imagen resultante de esta operación fue degradada con las fuentes de ruido intrínsecas y extrínsecas, de acuerdo a las condiciones planteadas inicialmente (NCI, NCII y NCII). Las secciones ópticas obtenidas fueron procesadas con los distintos algoritmos descritos anteriormente, con el propósito de encontrar las condiciones en las cuales estos logran la mejor recuperación de los datos.

El análisis en cortes axiales se realizó empleando el mismo objeto de referencia, pero con orientación paralela al eje óptico. Este también fue degradado de acuerdo al modelo de formación de la imagen obtenido en el **Capítulo 2**, asumiendo una **PSF** diferente para cada profundidad, cubriéndose un espesor de aproximadamente $23 \mu\text{m}$. Las imágenes también se contaminaron con ruido, considerando las tres condiciones mencionadas previamente. A partir de estas imágenes se analizaron tres situaciones, la más clásica, que consiste en asumir una única **PSF** invariante y aplicar técnicas de desconvolución no lineal. La otra estrategia consistió en la aplicación de desconvolución por estratos, en la cual se asume un conjunto reducido de **PSF**s a lo largo del eje óptico. Finalmente, la restauración, en la que se considera la discretización completa de la **PSF** a lo largo del eje óptico, una por cada sección óptica.

Para todos los casos analizados se consideró que se dispone de buena estimación de al menos una **PSF** a partir de una determinación experimental. Esto permite definir la escala del eje óptico, y adecuar el modelo para ser utilizado como entrada para los métodos de desconvolución, de desconvolución por estratos y de restauración.

Las imágenes resultantes de cada técnica fueron analizadas comparativamente por examen visual, tomando en consideración los elementos patrón en el objeto de referencia (análisis morfométrico) y las intensidades (análisis fotométrico). Además, se evaluó cuantitativamente el error \mathbf{E} y el residuo

R. Para medir el error **E** se utilizó el **error cuadrático medio (MSE, Mean Square Error)** dado por:

$$\text{MSE}(o_n) = \frac{1}{N} \sum_N (o_n - \hat{o}_n^{(k)})^2, \quad (4.11)$$

donde o_n es la distribución de fluorescencia en el espécimen y $\hat{o}_n^{(k)}$ es el estimador k -ésimo del algoritmo que se considere. Por su parte, el residuo **R** se midió como:

$$\text{MSE}(i_n) = \frac{1}{N} \sum_N (i_n - \hat{i}_n^{(k)})^2, \quad (4.12)$$

donde i_n son los datos observados o medidos, y $\hat{i}_n^{(k)}$ es la estimación k -ésima de los datos para el modelo de formación directa que asuma el algoritmo.

En ciertas situaciones se tuvo en cuenta el **MSE** entre el objeto o_n e i_n dado por:

$$\text{MSE}(o_n - i_n) = \frac{1}{N} \sum_N (o_n - i_n)^2, \quad (4.13)$$

el cual se utilizó como referencia para los **MSEs** definidos en las ecuaciones (4.11) y (4.12), ya que, ante la falta de técnicas de restauración, el usuario generalmente ignora (correcta o incorrectamente) la distorsión que introduce el sistema y asume que la imagen i_n que observa es la verdadera distribución de fluorescencia o_n [69].

4.3.1. Análisis de aplicación de filtros

De acuerdo a la bibliografía revisada, se observa que tanto el filtrado Gaussiano como el de Wiener son los más utilizados para atenuar los efectos de amplificación de ruido en las técnicas iterativas [8, 69, 103]. En general, se aplican al estimador inicial y luego a cada número fijo de iteraciones. Esto se realiza en cada sección óptica, es decir, son filtrados bidimensionales. El filtrado Gaussiano básico posee dos parámetros: el tamaño de la ventana del filtrado y la dispersión de la Gaussiana. El filtro de Wiener, tiene como parámetro la **SNR**. Para identificar qué filtrado funciona mejor para las situaciones de ruido consideradas, se evaluaron ambos filtros variando sus parámetros en busca de encontrar un $\text{MSE}(o_n)$ mínimo que sirva de estimador inicial para las técnicas de iterativas de restauración.

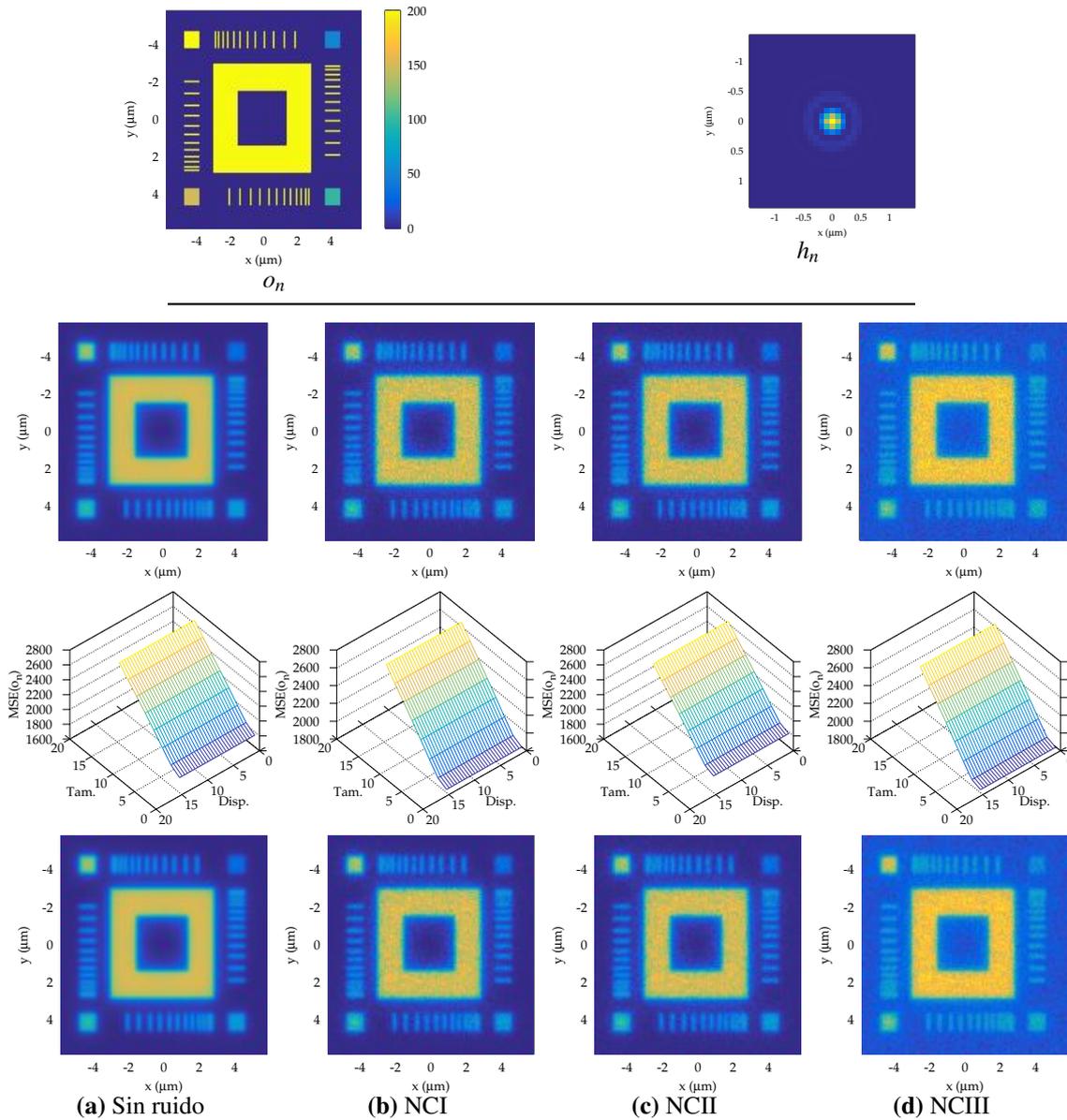


Figura 4.1: . Análisis del filtrado Gaussiano en secciones ópticas contaminadas con ruido. **Primer fila:** Datos originales y **PSF**. La escala de colores debe interpretarse en números de fotones por píxel. **Segunda fila:** Imágenes degradadas por la **PSF** y contaminadas por las fuentes de ruido. **Tercer fila:** $MSE(o_n)$ en función de la dispersión y tamaño de ventana para cada condición de ruido. **Cuarta fila:** Imágenes filtradas para cada condición de ruido.

En función de los resultados obtenidos con el filtrado Gaussiano, se determinó que un tamaño de ventana 3×3 y una dispersión de 0,45 proveyeron el menor error cuadrático medio entre los datos originales y los del filtrado.

Mediante el filtrado de Wiener, para el ruido NCI, se determinó que el mejor valor de SNR para el tratamiento de la imagen, se encuentra en el orden de aproximadamente 69, para NCII en 65 y para NCIII en 24.

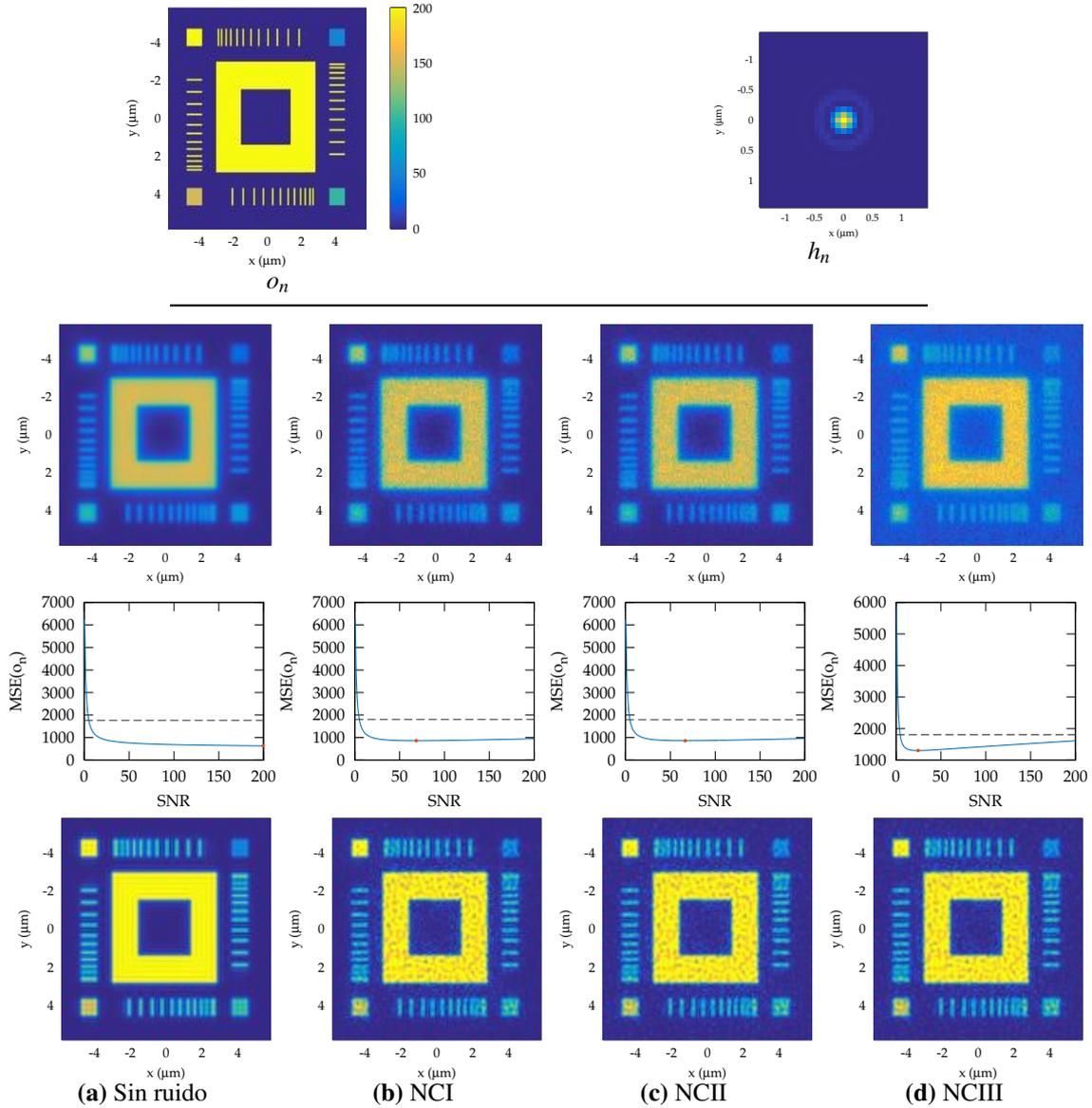


Figura 4.2: Análisis del filtrado de Wiener en secciones ópticas contaminadas con ruido. **Primer fila:** Datos originales y **PSF**, la cual se utiliza en el filtro de Wiener. La escala de colores debe interpretarse en números de fotones por píxel. **Segunda fila:** Imágenes degradadas por la **PSF** y contaminadas por las fuentes de ruido. **Tercer fila:** $MSE(o_n)$ en función de la **SNR** para cada condición de ruido. **Cuarta fila:** Imágenes filtradas para cada condición de ruido.

4.3.2. Análisis de métodos de desconvolución en secciones ópticas

Los resultados, en términos de la magnitud del $MSE(o_n)$, mostraron ser mayores para el filtrado Gaussiano, que para el filtro de Wiener, para todos los casos analizados. Sin embargo, esto generó el interrogante si esta situación se mantendría con la aplicación sucesiva de los filtros en las iteraciones de cada algoritmo, como atenuadores de la amplificación de ruido. Para responder esta incógnita, se planteó una serie de pruebas con el propósito de encontrar el filtro más adecuado para cada técnica de desconvolución considerada. Para lograr esto, en cada algoritmo se consideraron los parámetros susceptibles de ser modificados, generando variaciones en un rango, para evaluar el $MSE(o_n)$ y el $MSE(i_n)$ y analizar su evolución, en función de las iteraciones.

En la mayoría de los casos se encontró que la aplicación de filtrado genera menores **MSEs**, corroborándose que el filtrado Gaussiano resulta el de mejor rendimiento. La aplicación de este filtro, mostró que las curvas y superficies del $MSE(o_n)$ de la mayoría de los algoritmos se torna más suave y decreciente en función de las iteraciones y se mantiene así también para el $MSE(i_n)$. Sin embargo, como era de esperar, en las imágenes libres de ruido ninguno de los métodos mostró requerir filtrado para lograr un mejor MSE. Por su parte, en el algoritmo de RL ningún filtrado generó menores valores en el $MSE(o_n)$ mientras que el $MSE(i_n)$ se mantuvo cualitativamente invariable.

En la Tabla **4.2** se resumen, para cada algoritmo, las condiciones óptimas en relación al exponente y filtrado. En el **Apéndice E** se presentan como datos suplementarios, las curvas y superficies de la totalidad de los casos analizados.

Tabla 4.2: Valores de exponentes y filtros para la aplicación de los algoritmos de restauración.

Algoritmo	Sin Ruido	NCI	NCII	NCIII
JVC	Filtrado: No	Filtrado: G	Filtrado: G	Filtrado: G
Gold	Filtrado: No $p = 2$	Filtrado: G $p = 0,2$	Filtrado: G $p = 0,2$	Filtrado: G $p = 0,2$
ML	Filtrado: No $p = 2$	Filtrado: G $p = 2$	Filtrado: G $p = 2$	Filtrado: G $p = 2$
RL	Filtrado: No $p = 2$	Filtrado: No $p = 0,2$	Filtrado: No $p = 0,2$	Filtrado: No $p = 0,2$

Los resultados de los algoritmos aplicados con los valores dados en la Tabla **4.2** se muestran en las Figuras **4.3** y **4.4**.

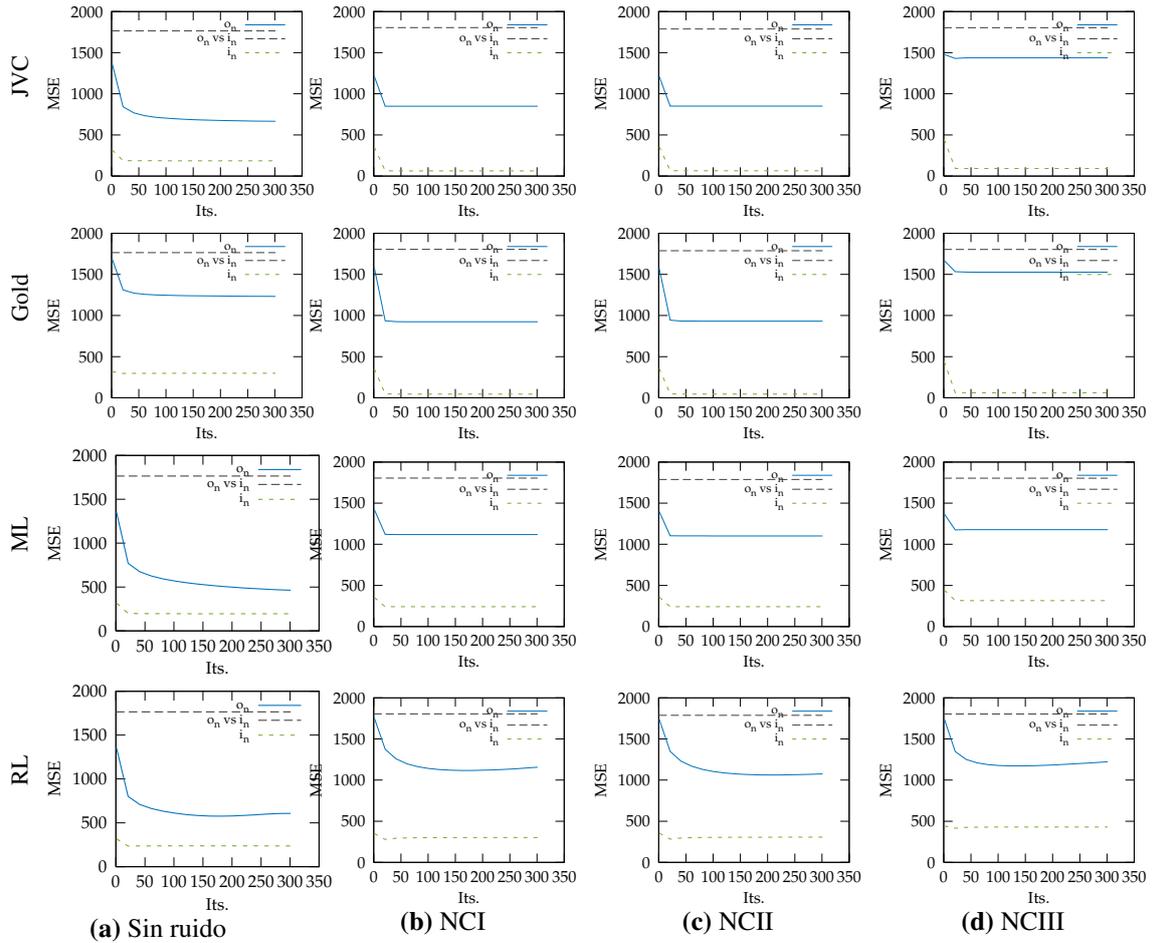


Figura 4.3: . Evolución del $MES(o_n)$ y del $MES(i_n)$ en función de las iteraciones. En línea de trazo largo se muestra el MSE de la diferencia $(o_n - i_n)$ como referencia.

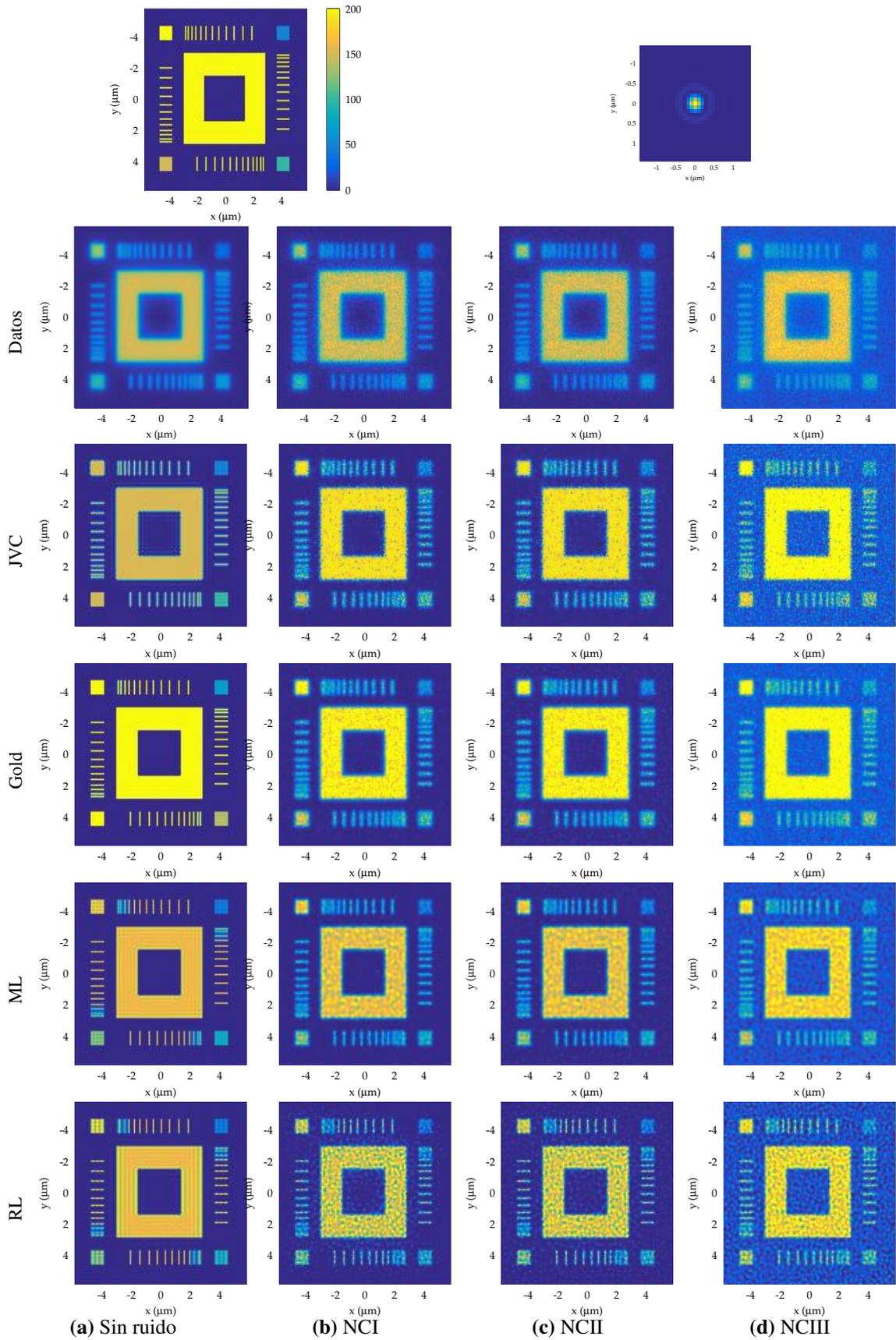


Figura 4.4: Resultados de la desconvolución en secciones ópticas mediante diferentes algoritmos para las distintas condiciones de ruido.

Es importante observar que el objeto de prueba posee un patrón de 12 líneas, localizadas alrededor del cuadrilátero hueco. En los casos en los que no se introduce ruido, los algoritmos ML y RL, son los que, en relación al $MSE(i_n)$ y al $MSE(o_n)$, exhiben menores valores, cuando se comparan con los algoritmos de Gold y JVC (ver Figura 4.3 columna (a)). Sin embargo, en el análisis visual (ver Figura 4.4 columna (a)), resultan más fáciles de identificar y cuantificar el número de líneas obtenidas luego de procesar con los algoritmos Gold y JVC, que las obtenidas con ML y RL. Otro elemento destacable, es la calidad fotométrica con que se recuperan las intensidades en el algoritmo de Gold.

En condiciones de ruido, JVC y Gold presentan menores $MSEs$, pero en el análisis visual de las imágenes ML y RL producen mejores resultados, porque exhiben un mayor nivel de detalle y definición, fundamentalmente en el caso del algoritmo RL. Debe notarse que, para los casos de los ruidos NCI y NCII, los patrones de línea resultán más definidos y su cuantificación es más sencilla en los resultados del algoritmo RL. En todos los casos de ruido y en todos los algoritmos es posible contar ocho líneas, excepto en JCV para el caso NCIII que cuentan siete líneas.

4.3.3. Análisis de planos axiales

Para el análisis en cortes axiales se consideraron tres situaciones, todas partiendo del mismo modelo directo dado por la ecuación (2.8). En primer lugar, la aplicación de desconvolución considerando una única PSF centrada en la mitad del eje óptico. En la segunda, se aplicó desconvolución por estratos empleando la técnica de ventaneo. Finalmente, fue analizada la restauración, aplicándose los métodos de Gold y Jansson-Van Citter, desarrollados a la fecha. El plano axial está formado por la misma estructura de referencia empleada para las secciones ópticas, aunque en este caso fue orientada paralela al eje óptico y luego degradada de acuerdo a la ecuación (2.8). Tanto los métodos de desconvolución, desconvolución por estratos y los de restauración fueron aplicados con los parámetros encontrados previamente y resumidos en la Tabla 4.2.

4.3.3.1. Desconvolución

Para la desconvolución se asume una única PSF localizada a una profundidad de $11 \mu\text{m}$. Los resultados de las pruebas para esta situación se muestran en la Figura 4.5 y la evolución de los $MSEs$ en la Figura 4.6.

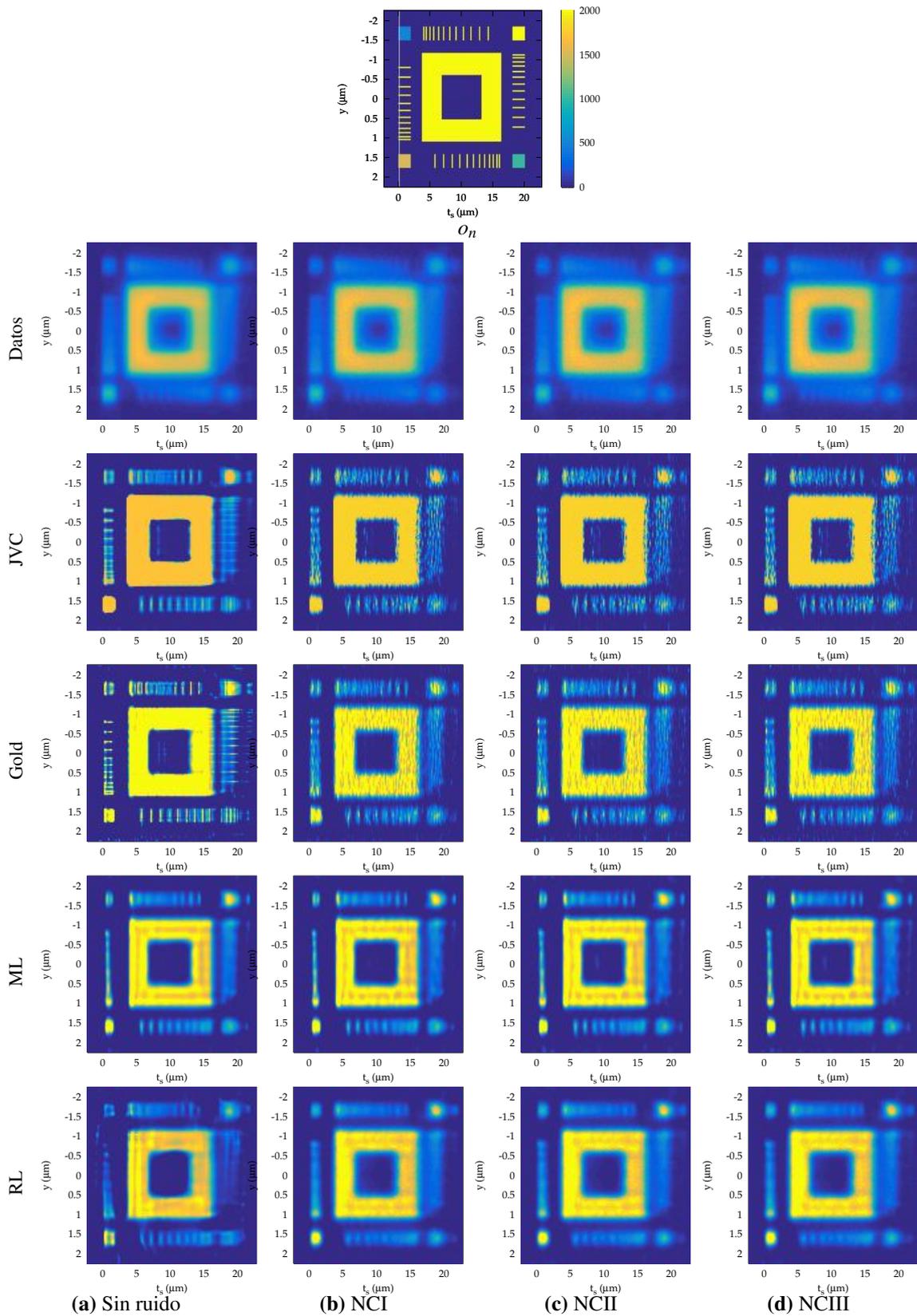


Figura 4.5: Imágenes resultantes de la desconvolución aplicada en cortes axiales para cada algoritmo y situación de ruido. La línea vertical $0 \mu\text{m}$ en la primera figura, corresponde a la cara interior del cubreobjetos.

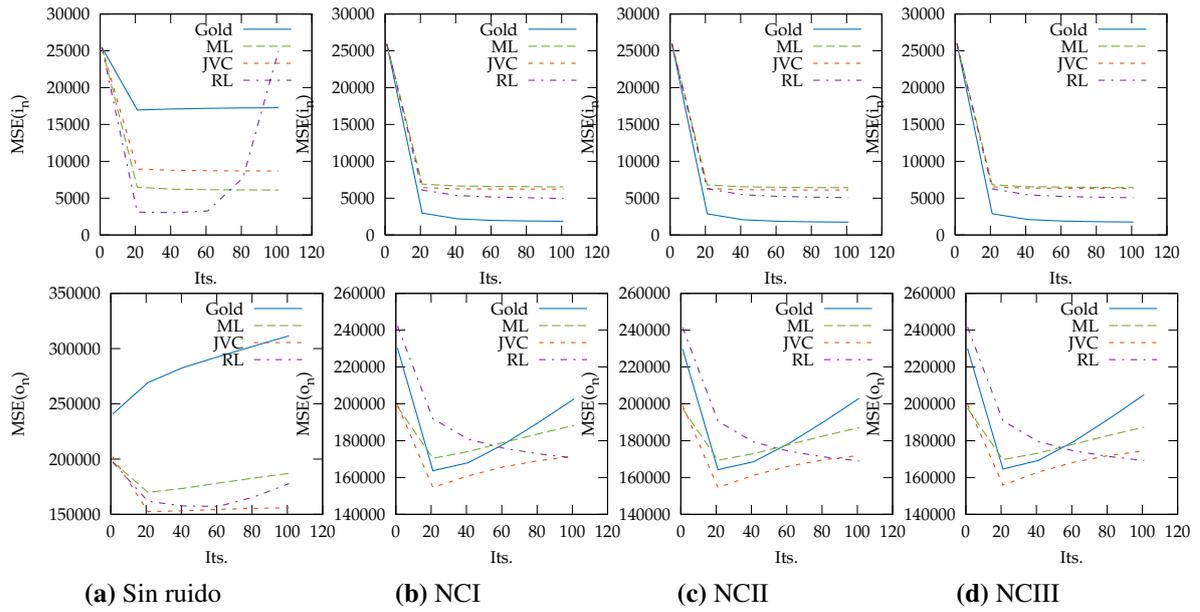


Figura 4.6: . Evolución del $MSE(i_n)$ (Primera fila) y del $MSE(o_p)$ (Segunda fila) en función del número de iteraciones para la desconvolución en corte axial.

4.3.3.2. Desconvolución por estratos

Para esta situación, se seleccionaron cuatro **PSFs** localizadas en las posiciones t_y : $0 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$, $11 \mu\text{m}$ y $20 \mu\text{m}$. Los resultados de los algoritmos se muestran en la Figura 4.7 y la evolución de los **MSEs** en función de las iteraciones en la Figura 4.8.

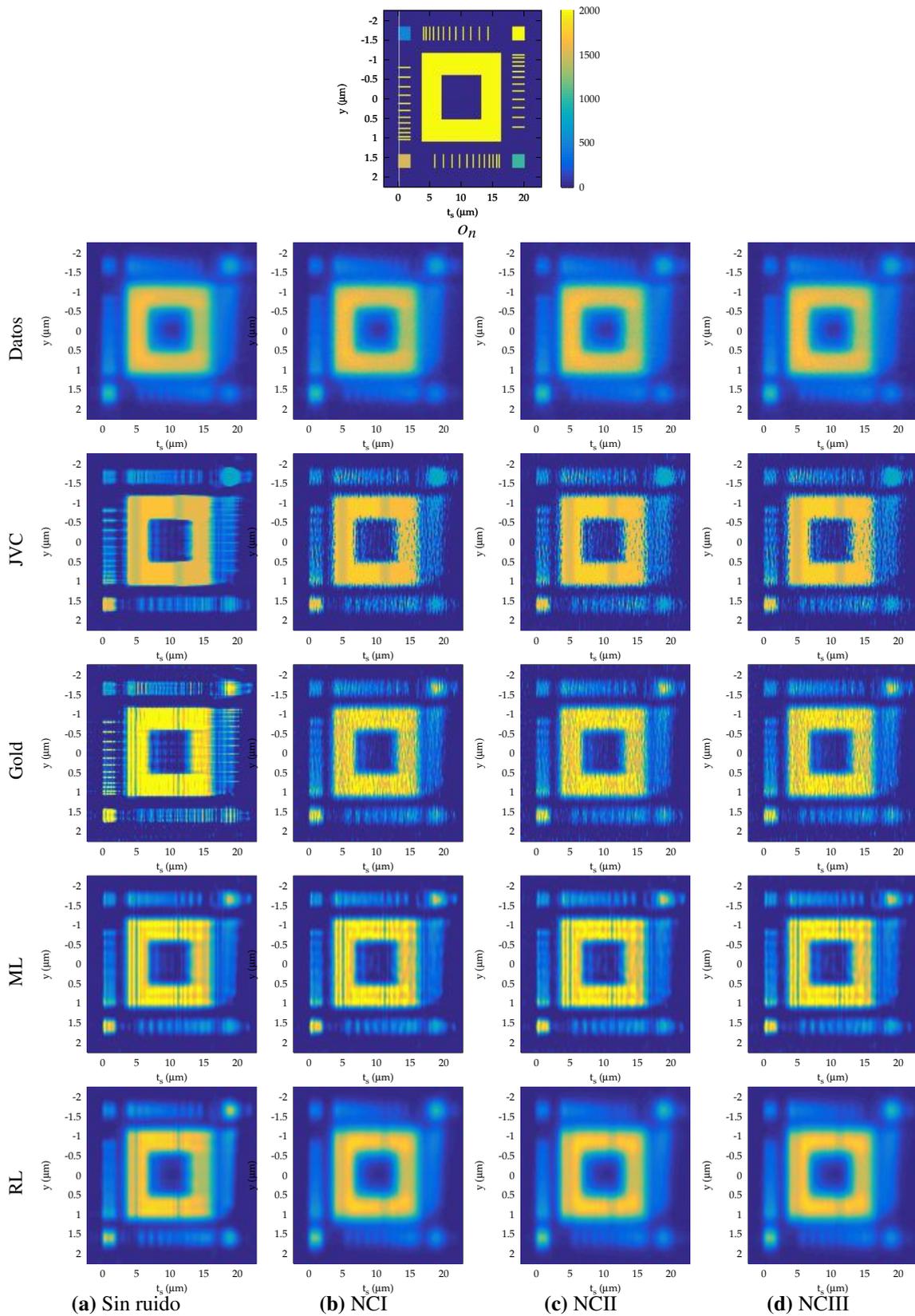


Figura 4.7: . Imágenes resultantes de la desconvolución por estratos aplicadas en cortes axiales para cada método de desconvolución y para cada situación de ruido. La línea vertical en $0 \mu\text{m}$ en la primer figura, corresponde a la cara interior del cubreobjetos.

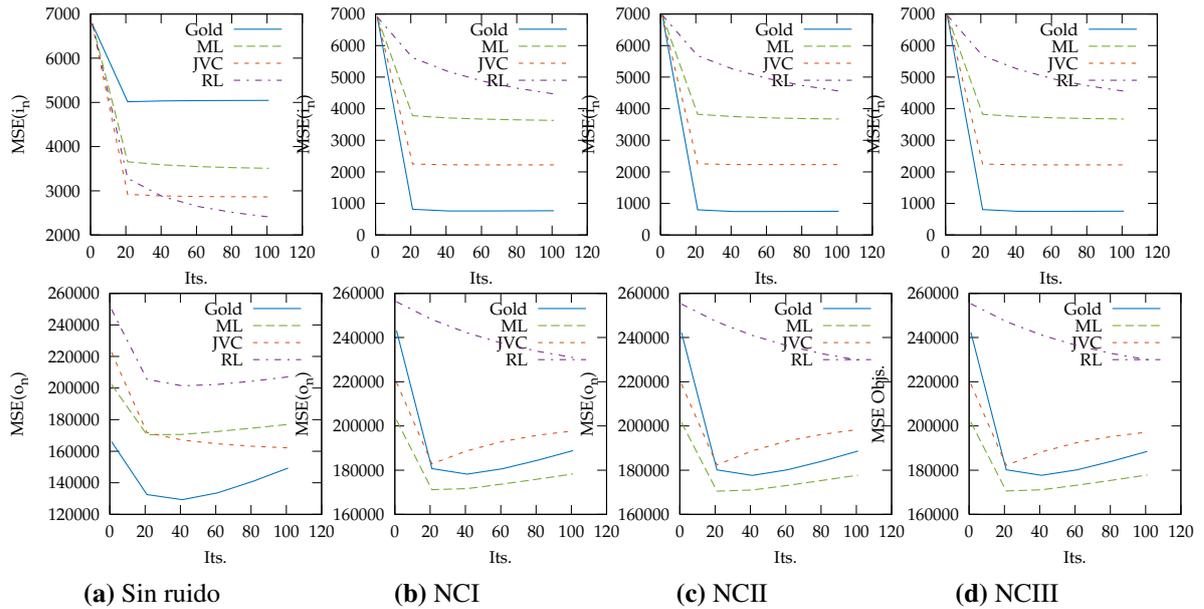


Figura 4.8: Evolución del $MSE(o_n)$ y del $MSE(i_n)$ en función de las iteraciones cuando se asume convolución invariante por estratos.

4.3.3.3. Restauración

En este contexto, se consideró la discretización completa de la **PSF** en la dirección del eje óptico. Los resultados se muestran en la Figura **4.9** y la evolución de los **MSEs** en función de las iteraciones, en la Figura **4.10**.

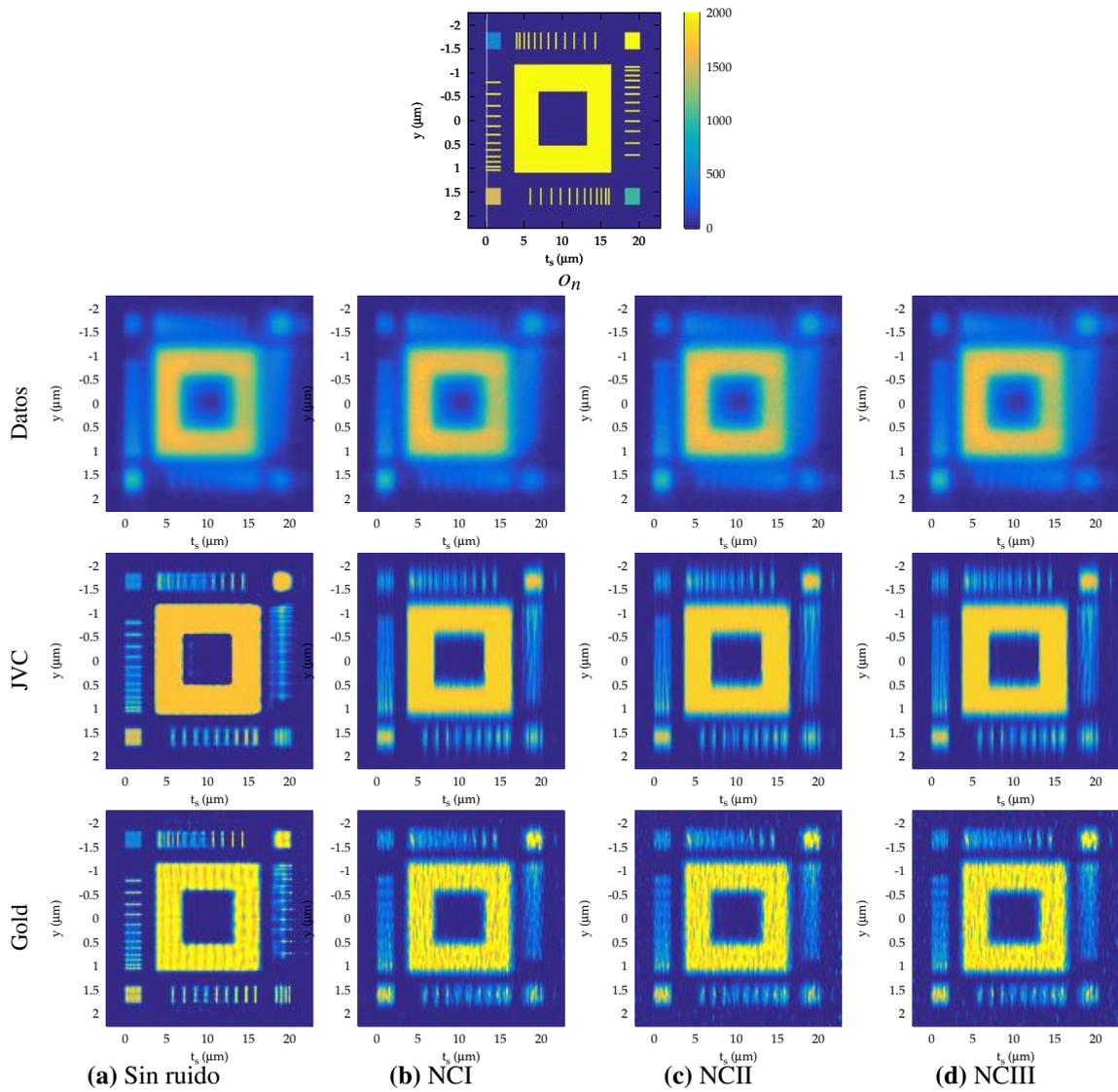


Figura 4.9: Imágenes resultantes de la restauración aplicadas en cortes axiales para los métodos JVC y Gold, y para cada situación de ruido. La línea vertical en $0 \mu\text{m}$ en la primera figura, corresponde a la cara interior del cubreobjetos.

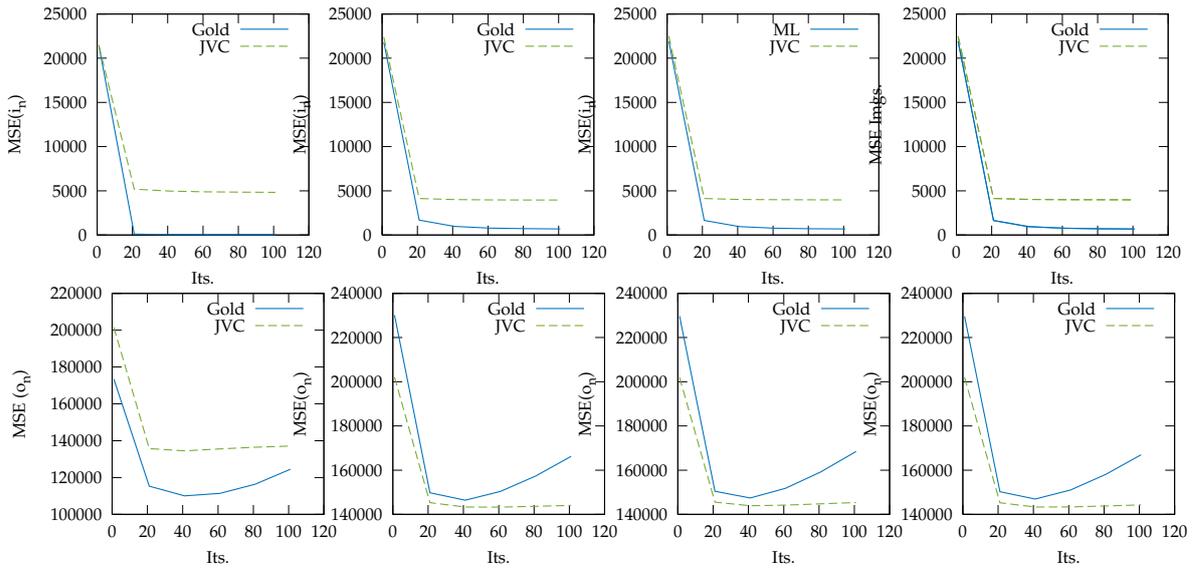


Figura 4.10: Evolución del $MSE(o_n)$ y del $MSE(i_n)$ en función de las iteraciones cuando se un modelo variante en el espacio.

Para simplificar el análisis, en las Figuras [4.11](#) y [4.12](#) se agrupan los resultados de la aplicación de las estrategias de Jansson-Van Citter y Gold, respectivamente.

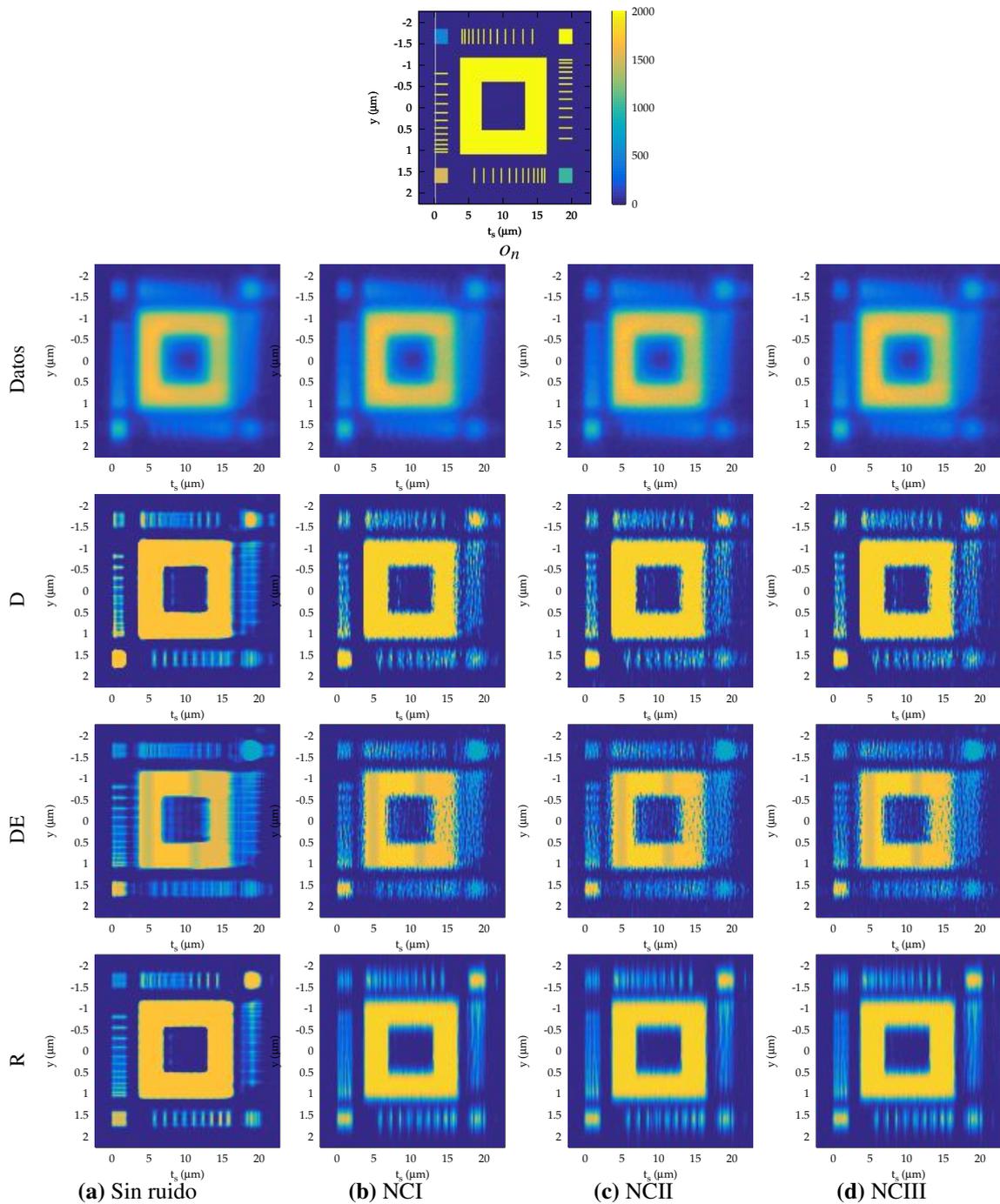


Figura 4.11: Resultados del método de Jansson-Van Cittert para los casos de desconvolución (D), desconvolución por estratos (DE) y restauración (R). La línea vertical en $0 \mu\text{m}$ en la primera figura, corresponde a la cara interior del cubreobjetos.

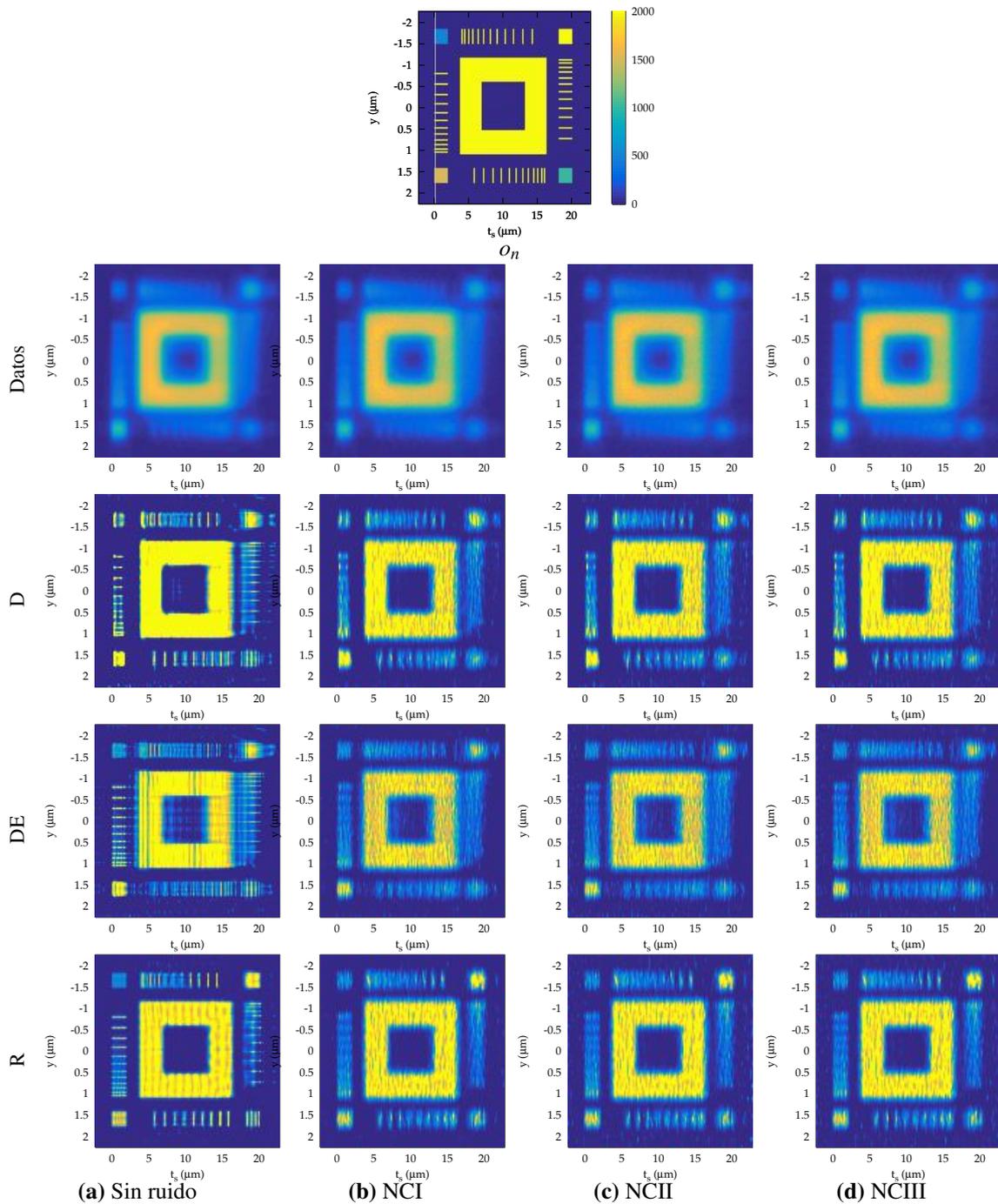


Figura 4.12: Resultados del método de Gold para los casos aplicando desconvolución (D), desconvolución por estratos (DE) y restauración (R). La línea vertical en $0 \mu\text{m}$ en la primera figura, corresponde a la cara interior del cubreobjetos.

4.4. Discusión y conclusiones

En el [Capítulo 2](#) se determinó que el muestreo por [SO](#) introduce aberraciones esféricas en las secciones ópticas. Estas aberraciones, aun en seccionamientos ópticos de espesores pequeños (menores a $20 \mu\text{m}$), introducen una importante varianza espacial, provocando que las técnicas que comúnmente se utilizan para desconvolución generen artefactos. A esto se le suman las

degradaciones que introduce el ruido, que ineludiblemente contamina las imágenes. Por lo tanto, en este capítulo se ha planteado una exploración del comportamiento de las distintas técnicas empleadas en restauración de imágenes en MFCA, con la propuesta de modificaciones en forma general a técnicas que históricamente han sido utilizadas en la forma de desconvolución.

Entre los primeros resultados, se cuenta con los obtenidos en relación a los filtrados de Wiener y Gaussiano. Estas pruebas, conjuntamente con el análisis de métodos de desconvolución en secciones ópticas, tuvieron el objetivo de analizar el impacto de la atenuación del ruido por medio del filtrado en los métodos iterativos. De acuerdo a Sibarita [103], el uso de las técnicas de filtrado proporciona mejores resultados en los algoritmos JVC y Gold, dejando fuera el resto. En esta tesis, el filtrado fue aplicado a todas las técnicas implementadas. El propósito fue verificar si los algoritmos, incluidos ML y RL, producen un mejor estimador aplicando un filtrado en la sucesivas iteraciones. Los resultados mostraron que el filtro de Wiener produce un primer estimador que, en términos del $MSE(o_n)$, resulta superior que el Gaussiano (ver Figuras 4.1 y 4.2). Sin embargo, cuando fueron aplicados en los ciclos iterativos de los métodos para evitar la amplificación del ruido, esta situación no se correspondió y el filtrado Gaussiano generó un mejor estimador en base a la misma métrica de comparación. Sin embargo, esto no se cumplió para todos los métodos, ya que el método RL presentó mejores resultados en relación al $MSE(o_n)$ cuando fue aplicado sin técnica de filtrado alguna.

En el análisis visual de las secciones ópticas sin ruido, los algoritmos clásicos de desconvolución JVC y Gold reproducen una mejor estimación del objeto que los métodos ML y RL. Sin embargo, esto no se relaciona con los resultados desde el análisis del $MSE(i_n)$ y del $MSE(o_n)$ que mostraron ser menores en ML Y RL. Por su parte, en los tres casos de ruido considerados, el algoritmo RL fue el que mejor reprodujo los detalles del objeto de referencia desde un análisis visual.

El análisis visual de la restauración mostró que, (ver Figura 4.9) sólo en el caso de imágenes libres de ruido, las dos formas de restauración implementadas permiten una buena estimación del objeto. En las restauraciones, se pueden encontrar los detalles del objeto original, aunque se debe diferenciar la resolución que se logra en la direcciones lateral y axial. En la primera, las restauraciones con ambos métodos son fácilmente identificables las barras del objeto de referencia orientadas perpendicularmente al eje óptico, mientras que las que están orientadas de forma paralela presentan claramente menor resolución. En los casos con ruido, los resultados no fueron tan contundentes, dado que las barras del objeto de referencia se pierden casi por completo en las degradaciones.

Preza et al. [93] plantean que la exactitud de la desconvolución por estratos mejora con la incorporación de capas adicionales, y que la restauración exacta de la distribución original de fluorescencia puede obtenerse considerando que cada plano es un estrato. Según estos autores, como el modelo directo que plantean es invariante por estratos y la restauración está basada en este modelo directo, nada se puede decir del comportamiento que tendrá una técnica que asume invarianza en todo el espacio, porque no responde al modelo directo. Sin embargo, debería considerarse la posibilidad de analizar bajo qué condiciones la desconvolución puede proveer resultados comparables a la restauración.

Para probar su algoritmo, Preza et al. [93] utilizaron tanto imágenes simuladas como reales. El

objeto de prueba era una esfera de $4\ \mu\text{m}$ sobre la que realizaron la medición del **FWHM** y la *I-divergence* de Csiszár. Sin embargo, en las pruebas realizadas en esta tesis la respuesta de esta métrica ha sido similar a la del **MSE** (resultados no mostrados). No obstante, futuros estudios y análisis de otras métricas de desempeño de algoritmos, como por ejemplo el índice de similitud estructural **[18]** permitirán profundizar los resultados aquí presentados.

En relación con la temática de restauración en **MFCA**, las publicaciones más recientes están fuertemente orientadas al uso de modelos de formación de imágenes ópticas variantes en el espacio **[72, 52, 89, 70, 71]**, y se proponen, principalmente, técnicas de desconvolución para aproximar la restauración. En general, las pruebas se realizan con imágenes de distribución de fluorescencia de patrones y especímenes reales y, en particular, son pocas las publicaciones que tienen en cuenta otros algoritmos de forma comparativa. También son escasos los trabajos en que los que se realizan pruebas a partir de imágenes (patrón) artificiales y su comparativa con imágenes de patrones reales.

Con lo discutido hasta aquí se intenta demostrar la actualidad e importancia del tema objeto de estudio tratado en este capítulo. Las reflexiones realizadas aquí, en función de los resultados y la bibliografía revisada, habilitan el diseño de posibles pruebas que tengan en cuenta aspectos complementarios en los análisis y que pueden proveer una contribución al conocimiento en la temática. El desarrollo de los métodos de restauración basados en las formulaciones aditiva y multiplicativa, se erigen en otra de las contribuciones de esta tesis. Quedan planteados hacia el futuro próximo, el desarrollo de otros métodos y pruebas que permitan consolidar metodologías robustas de restauración para la formación de la imagen computacional en **MFCA**.

Capítulo 5

Conclusión

Uno de los primeros interrogantes, planteado inicialmente en esta tesis, fue comprender cuáles son los principales factores que inciden en la técnica de **SO** aplicado a **MFCA**. Las primeras pruebas realizadas, previas al trabajo con el que se desarrolló esta tesis, estuvieron relacionados con técnicas de desconvolución de imágenes tridimensionales, asumiendo diversos modelos teóricos y también determinaciones empíricas para representar la **PSF**. Sin embargo, no existían fundamentos claros para seleccionar un perfil de intensidad sobre otro. En la mayor parte de la literatura revisada, se realiza una simplificación de la **PSF** a modelos puramente matemáticos, y la desconvolución parecía ser el único paradigma en los procesos de restauración de imágenes.

Las pruebas se realizaban en el instrumento de referencia, un **MFCA** adaptado para **SO**, y, frecuentemente, aparecían problemas relacionados con variaciones en la intensidad de la fuente de excitación, fotoblanqueo y autofluorescencia. Estos problemas incidían en los resultados de la desconvolución, pero no estaba claro cómo ni en qué medida. Esto condujo a una propuesta de tesis focalizada en el estudio e investigación de este conjunto de problemas, que se entendían como principales fuentes de aberración y artefactos en la **MFCA**. El propósito fue plantear soluciones metodológicas, orientadas a mejorar las capacidades morfométricas y fotométricas del mencionado instrumento.

Conforme se avanzó con el estudio y las pruebas, se logró acotar lo que conformó el principal eje de investigación de esta tesis. Así, manteniendo el objetivo general de investigación de la propuesta original, la estrategia consistió en profundizar el análisis de las principales fuentes de aberración que inciden en la calidad de la imagen, enfocando el estudio en aquellas que dependen de la ingeniería del instrumento. Se consideró que las fuentes de aberración seleccionadas debían tener un impacto significativo en las imágenes finales, y, adicionalmente, ser parte de los problemas en los que realmente se podría contribuir con propuestas de soluciones desde la ingeniería. Así, por ejemplo, se descartaron el fotoblanqueo y la autofluorescencia por ser fenómenos que dependen más del comportamiento de las moléculas, más que del instrumento. Por su parte, las modificaciones en el diseño de ópticas que permitirían mejorar la calidad de las imágenes, forman parte de la ingeniería del microscopio, pero están alejadas de las capacidades de intervención con las que cuenta el grupo donde se realizó esta tesis.

De la búsqueda y revisión bibliográfica continua se llegó al modelo de Gibson y Lanni. En función

de su análisis, resultó claro que el **SO** introducía importantes aberraciones en las imágenes. Por lo tanto, se procedió a su implementación en software, para analizar el grado de ajuste de los datos del instrumento de referencia al mencionado modelo. Se realizaron varias aproximaciones experimentales, concluyéndose que la tecnología del instrumento de referencia disponible era insuficiente para el nivel de exactitud y precisión requeridas para las pruebas con el modelo. De esta manera, surgió la necesidad de continuar con la experimentación por medio de simulaciones y procesamiento con imágenes patrón artificiales.

Entre los resultados obtenidos de las pruebas realizadas en el modelo, y al que más relevancia debería darse, es el del corrimiento focal. El análisis hecho en esta medida, mostró que en el **SO** cualquier procesamiento o análisis que requiera exactitud y precisión en la localización axial debe ser cuidadosamente considerado. Esto es importante, especialmente en operadores, que realizan mediciones relativas del desplazamiento focal, a partir del tornillo micrométrico del microscopio, o bien, del software que lo controla. Fijar microesferas fluorescentes en las caras interiores del cubreobjetos y del portaobjetos, y realizar estimaciones de las posiciones axiales sería una mejor aproximación a la escala del espacio del espécimen, que las obtenidas por el desplazamiento del micrométrico. Por esta razón, resulta conveniente señalar que las condiciones de captura deben ser cuidadosamente estudiadas. En particular, para condiciones de instrumental y captura similares a las planteada en esta tesis, los modelos simplificados basados en perfiles Gaussianos y de Airy deberían ser descartados.

Más allá de los resultados cuantitativos, las pruebas realizadas en el modelo mostraron adicionalmente que resulta posible caracterizar la varianza espacial, a partir de medidas que se realicen sobre los perfiles de intensidad del modelo. Una propuesta para esta caracterización consiste en una aproximación práctica que comprende el cálculo del error relativo que se da entre el patrón de difracción tridimensional de una sección óptica y las que se tienen por encima y por debajo de esta. Este error relativo podría estar compuesto por términos que midan el error relativo del cambio en los picos de los perfiles de intensidad, de los **FWHMs** axial y lateral, como así también del desplazamiento del foco. Esta operación resulta sencilla y fácilmente extrapolable a determinaciones experimentales, que es la forma más frecuente de calibración.

En relación a la determinación de la **PSF** en el **SO**, y de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis del modelo de la formación de la imagen óptica, se observa que para una adecuada calibración, resulta necesario el uso de técnicas de estimación de parámetros. Las primeras pruebas se relacionaron con la determinación de la **PSF**, surgiendo así el análisis de métodos de estimación descritos en el **Capítulo 3**. Los resultados obtenidos en esta etapa indican que para estimar la posición axial utilizando el modelo de Gibson y Lanni se requiere de una alta **SNR**. Se estimó que en el mejor de los casos se deben capturar más de 2^9 fotones totales para asegurar la convergencia de los métodos. Además, se requiere de buena exactitud y una alta precisión en la estimación inicial. En el mejor de los casos, para las condiciones evaluadas, el error relativo de la estimación inicial estuvo por debajo del 10 %. El logro de la mejor precisión posible, que se encuentra acotada por la **CRLB**, requiere que la solución, no solo esté finamente cercada, sino un nivel de **SNR** mucho mayor. Para las pruebas realizadas, tanto el método MIDIV como ML requirieron que el pico de la **PSF** sea capturado (en un pixel) con un nivel de intensidad mayor a 2^9 fotones.

El análisis del porcentaje de éxito en las técnicas de estimación ha demostrado ser una herramienta muy útil para el análisis comparativo de los métodos de estimación, pero también puede cobrar una gran utilidad en aplicaciones prácticas concretas. Así, los operadores podrían confiar que los métodos de estimación logran una buena precisión y exactitud, pero esto podría carecer de valor estadístico, debido a que la probabilidad de éxito es baja. Esta situación se tornó evidente con el análisis de los resultados obtenidos utilizando cortes axiales. En dichos cortes, tanto la **CRLBs** como las estimaciones obtenidas con los métodos mostraron ser mejores que aquellas obtenidas con secciones ópticas, para un mismo conteo de fotones (comparar subfiguras de la primera y última fila de la Figura **3.8**). Sin embargo, utilizando cortes axiales se requirió mayor conteo de fotones para obtener un porcentaje de éxito razonable (comparar subfiguras de la primera y última fila de la Figura **3.4**).

En relación al desarrollo del nuevo método de estimación MIDIV es importante destacar que sobre este no se realizaron suposiciones sobre el ruido, lo cual constituye una ventaja frente a los métodos ML y LSQR. Además, también muy importante de resaltar, el método MIDIV alcanza la **CRLB** en condiciones similares a las del método ML. Con los resultados obtenidos en esta tesis surgen nuevos interrogantes. Desde el punto de vista de la aplicación, una cuestión a analizar y probar de forma más exhaustiva, es si el método MIDIV podría ser un reemplazo para la técnica de ajuste de mínimos cuadrados. Desde un punto de vista de carácter más teórico, sería interesante poder responder la razón o razones por las que en las pruebas realizadas en esta tesis el método MIDIV alcanza la **CRLB**. Sería valioso poder determinar si el método de estimación es de mínima varianza.

En relación a la formación de la imagen computacional, las pruebas realizadas en el **Capítulo 4** mostraron la importancia del análisis y el contraste de las técnicas que actualmente se utilizan para restaurar imágenes de **MFCA**, considerando la totalidad de sus aspectos, a saber: filtrado, modelo directo asumido y ruido. Los resultados obtenidos, muestran claramente las diferencias entre la aplicación de la desconvolución, la desconvolución por estratos y la restauración en su forma general. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos, las pruebas y la aplicación de estos algoritmos basados en modelos se plantean varios problemas y desafíos, de los cuales algunos se resumen a continuación.

En primer lugar, el hecho de que la **PSF** sea variante implica que el modelo directo ya no puede ser planteado como convolución, y por lo tanto, ya no puede emplearse la **FFT**. Esto lleva a que las técnicas tengan un gran incremento en el costo computacional. Esto es importante mencionarlo, porque del conjunto de técnicas de restauración desarrolladas, tal vez las más extendidas en el procesamiento de imágenes de **MFCA** son las de desconvolución, y, de acuerdo a los resultados obtenidos, es importante analizar la posibilidad de que a partir de cierto espesor y nivel de **SNR** en un **SO** deba considerarse esta varianza espacial. Un desafío sería encontrar formas que permitan reducir el tiempo de cómputo. Esto puede darse computacionalmente, a través de la paralelización de las operaciones, utilización de redes de cómputo, etc., o bien desde otras disciplinas científicas, donde, por ejemplo, se aporten nuevas formulaciones de los modelos, o bien nuevos modelos, que permitan una implementación más eficiente en software de la formación computacional de la imagen.

Otra cuestión a considerar en la restauración, es qué **PSF** variante emplear. De acuerdo al análisis

del modelo y las técnicas de estimación realizadas, en el [SO](#) la [PSF](#) y sus parámetros deben ser inferidos, y el modelo de Gibson y Lanni es un buen estimador inicial para aquellos casos en los que la [PSF](#) deba ser estimada en la restauración. Sin embargo, como es bien sabido por los microscopistas, esta no es la situación más frecuente en la práctica. En situaciones reales, en general, el índice de refracción del espécimen exhibe altos grados de variabilidad lo cual complejiza aún más el problema. Una posible respuesta a esto es el desarrollo y prueba de algoritmos de restauración ciega que implementen técnicas robustas de estimación de parámetros de la [PSF](#) en los ciclos iterativos. En este sentido, una contribución interesante, desde el paradigma de la desconvolución, es el trabajo de Kim et al. [\[71\]](#).

El análisis comparativo de técnicas de restauración en general, plantea otro problema interesante: ¿qué métrica utilizar para comparar los resultados de las técnicas? En esta tesis se utilizó el [MSE](#), un estándar ampliamente aceptado como métrica del desempeño de algoritmos en el campo del procesamiento de señales. Sin embargo, es posible que otras métricas muestren mayor eficiencia en registros de imágenes ópticas. Surgen de las pruebas y la bibliografía la (I) -divergencia de Csiszár y el índice de similitud estructural como posibles instrumentos para el análisis del desempeño de las técnicas de restauración. En particular, el índice de similitud estructural [\[18\]](#) ha sido utilizado para evaluar la calidad de algoritmos de procesamiento en general. Este índice mostró poseer cierta correlación con resultados de percepción de calidad.

Apéndice A

Detalles técnicos del modelo de Gibson y Lanni

A.1. Implementación de la función OPD

En la aproximación de la OPD (2.4) hay términos que se cancelan si los parámetros de diseño y los reales son iguales. La codificación en GNU Octave [49] realizada en esta tesis tiene en cuenta todos los parámetros dados en la fórmula. Para utilizarla en las pruebas realizadas en esta tesis se construyeron funciones anónimas con los parámetros previamente cargados, liberando aquellos que se quisieran variar (p. ej. t_s). Esto redujo los tiempos de cómputo, especialmente en las pruebas en las que los parámetros de diseño y los reales fueron iguales.

A.2. Integración numérica del modelo

La integral de la ecuación (2.1) fue probada con varios métodos de integración numérica disponibles en GNU Octave [49]. Todos devolvieron resultados cualitativamente similares. Sin embargo, en términos de velocidad de cómputo, la cuadratura de Gauss-Kronrod [101] resolvió la integral en menor tiempo que los otros métodos y, por esta razón, fue seleccionada para evaluar la integral de la ecuación (2.1). Se observó que en ciertas condiciones este método no convergía, principalmente por sobrecarga de la pila recursiva. En esta situación se evaluó, alternativamente, utilizando la regla adaptativa de Simpson. Otro detalle de implementación del modelo de Gibson y Lanni es que agrega una lógica de control adicional que determina, en función de los valores de índice de refracción del espécimen n_s y apertura numérica NA, un límite superior para el radio normalizado de integración, ρ . Esto evita que la expresión dentro de las raíces cuadradas de ecuación (2.4) se tornen negativas.

A.3. Función que genera la PSF 3D

Se codificó una función en GNU Octave [49] para generar la [PSF]. Esta función toma como entrada el modelo de difracción como un parámetro de función, el tamaño de píxeles, separación entre planos de [SO], número de renglones, número de columnas, número de planos, normalización de intensidades y corrimiento del foco. El parámetro de normalización admite dos formas. La que se aplicó en esta tesis, normaliza las intensidades de cada plano a la suma total de intensidades del correspondiente plano y relativo al plano que mayor intensidad acumula. Esta forma de normalización simula la distribución de intensidades que se obtiene en el [SO] para una fuente estable y un tiempo de exposición fijo. El parámetro del corrimiento del foco permite centrar el pico de la [PSF] en un plano específico.

Apéndice B

Valores por defecto utilizados en modelos de formación de imagen

Tabla B.1: Valores por defecto del modelo de Gibson y Lanni utilizados en las distintas pruebas.

Parámetro	Valor
Lambda	560 nm
NA	1.35
M	100 \times
n_{oil^*}	1.515
t_{oil^*}	100 μm
n_{oil}	1.515
n_g^*	1.52
t_g^*	0.170 μm
n_g	1.52
t_g	0.170 μm
n_s	1.33
t_s	5 μm
z_d^*	220 mm
z_d	220 mm
Δz	0.09 μm
Tolerancia integración	1×10^{-5}

Tabla B.2: Valores por defecto del modelo directo obtenido en el [Capítulo 2](#).

Parámetro	Valor
Tamaño de píxel	9 μm
Número de filas	31
Número de columnas	31
Número de planos	31

Apéndice C

Datos del instrumento de referencia e insumos

C.1. Microscopio

Microscopio de fluorescencia de campo amplio Olympus BX50 modificado para adquisición de imágenes por seccionamiento óptico [38, 4]. Lámpara de mercurio de alta presión USH102. Lente objetiva UPLAN-APO Universal 100×, NA 1.35, espesor cubreobjetos 0.17 mm, resolución 0.25 μm . Software SUMDD [38] en repositorio <http://deptoinformatica.fi.uner.edu.ar/redmine/projects/sumdd>.

C.1.1. Espectros de los cubos de filtros

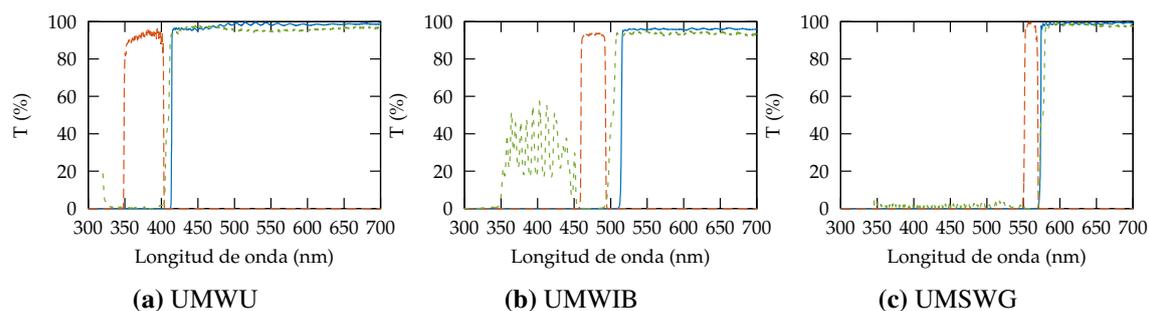


Figura C.1: Espectros de cubos de filtros de interferencia del instrumento de referencia.

C.2. Dispositivo de captura

Tabla C.1: Datos del dispositivo de captura.

Parámetro	Valor
Interface	ISA
Rango dinámico	14 bit
Sensor	CCD
Columnas	792
Filas	521
Columnas de imagen	768
Filas de imagen	512
Temperatura blanco	-10 °C
Sensor	KAF0400-1
Noise (electrones)	10
Gain	5.0
Tamaño píxel (x)	9 μm
Tamaño píxel (y)	9 μm

C.3. Datos técnicos de insumos

C.3.1. Cubreobjetos

Tabla C.2: Datos de cubreobjetos.

Parámetro	Descripción
Marca	TedPella 260406
Índice Refracción	1.5255 ± 0.0015
Espesor	(0.17 ± 0.01) mm

C.3.2. Espectros de fluoróforos

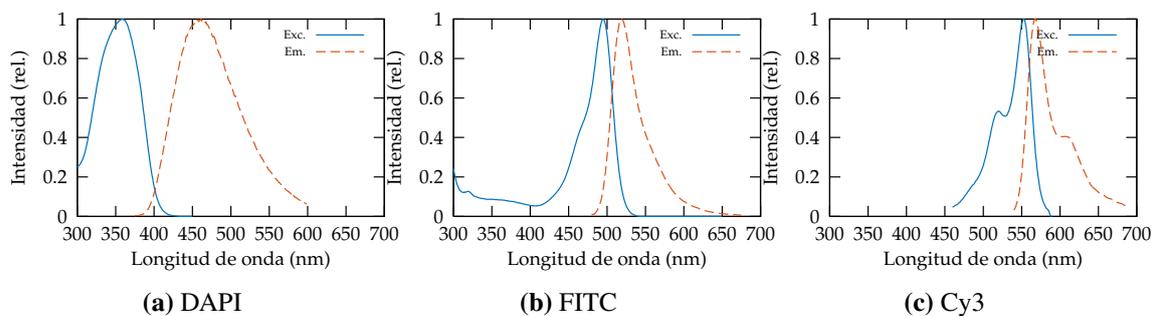


Figura C.2: Espectro de fluorescencia de excitación y emisión de fluorocromos comúnmente utilizados en microscopia de fluorescencia.

Apéndice D

Estrategia numérica para optimización en estimación de parámetros

Todas las funciones objetivo presentadas en el [Capítulo 3](#) conducen a optimizaciones de funciones no lineales, y dado que el propósito era realizar una comparación entre los métodos, todos son aproximados al término de primer orden de sus representaciones en serie de Taylor, obteniendo como resultado estimadores iterativos. En otras palabras, asumiendo que la función objetivo está dada por $OF(\theta)$ el problema es encontrar cual θ hace $OF(\theta)$ óptimo. Esto es,

$$\frac{\partial OF(\theta_l)}{\partial \theta_l} = f(\theta_l) \equiv 0. \quad (D.1)$$

La expansión en serie de Taylor de la función no lineal $f(\theta_l)$ esta dada por,

$$f(\theta_l) = f(\theta_l^{(0)}) + f'(\theta_l^{(0)})(\theta_l - \theta_l^{(0)}) + \frac{f''(\theta_l^{(0)})(\theta_l - \theta_l^{(0)})^2}{2!} + \dots, \quad (D.2)$$

donde $\theta_l^{(0)}$ es un punto arbitrario cercano a θ_l alrededor del cual $f(\theta_l)$ es evaluada. Por lo tanto, si $\hat{\theta}_l$ es una raíz de $f(\theta_l)$, entonces el lado izquierdo de la ecuación [\(D.2\)](#) es cero y el lado derecho de la ecuación [\(D.2\)](#) puede ser truncado al término de primer orden de la serie para tener una aproximación lineal de la raíz. Esto es,

$$\hat{\theta}_l \approx \theta_l^{(1)} = \theta_l^{(0)} - \frac{f(\theta_l^{(0)})}{f'(\theta_l^{(0)})}. \quad (D.3)$$

Esta aproximación puede ser mejorada por medio de iteraciones. El método obtenido se conoce como método de Newton-Raphson [[48](#), Capítulo 5, pp. 127-129]. Este puede ser escrito como,

$$\theta_l^{(m+1)} = \theta_l^{(m)} - \frac{f(\theta_l^{(m)})}{f'(\theta_l^{(m)})}, \quad (D.4)$$

donde el supraíndice (m) indica la iteración. El estimador inicial, (es decir, $m = 0$) debe estar cerca de la raíz para asegurar la convergencia del método.

Apéndice E

Filtrado en métodos de desconvolución

E.1. Gold: MSEs versus exponente e iteraciones

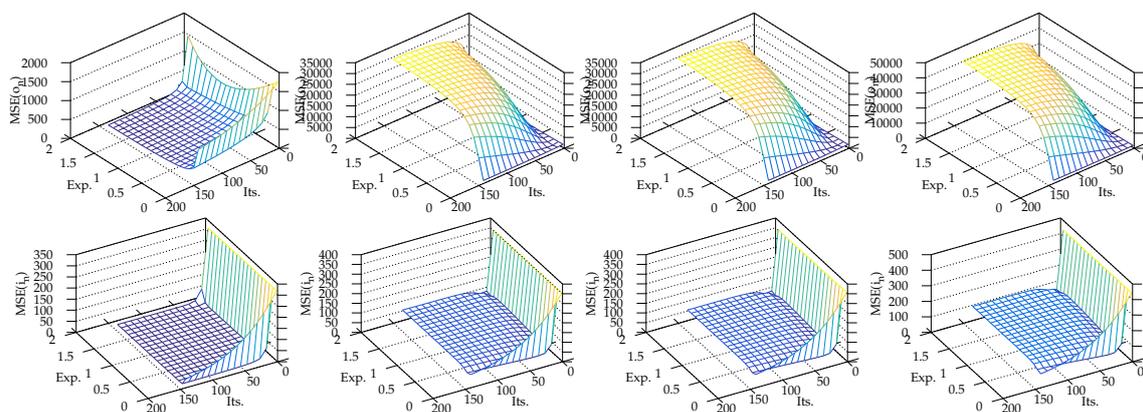


Figura E.1: MSEs para el método de Gold sin filtrado

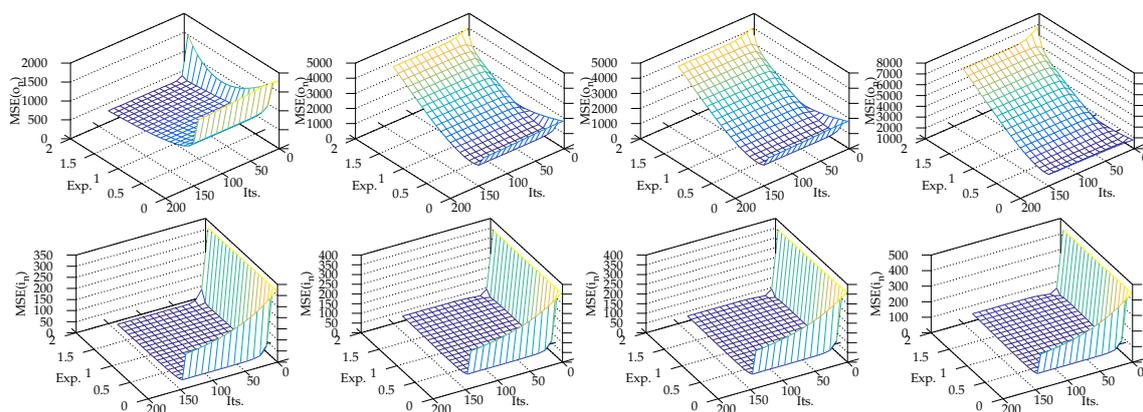


Figura E.2: Análisis de los MSEs para el método de Gold con aplicación de filtrado Gaussiano

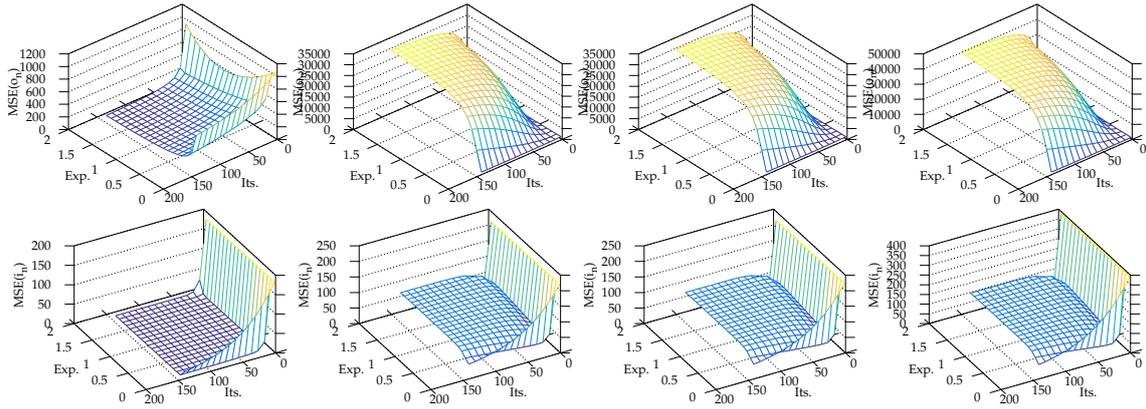


Figura E.3: MSEs para el método de Gold filtrado de Wiener

E.2. JVC: MSEs versus iteraciones

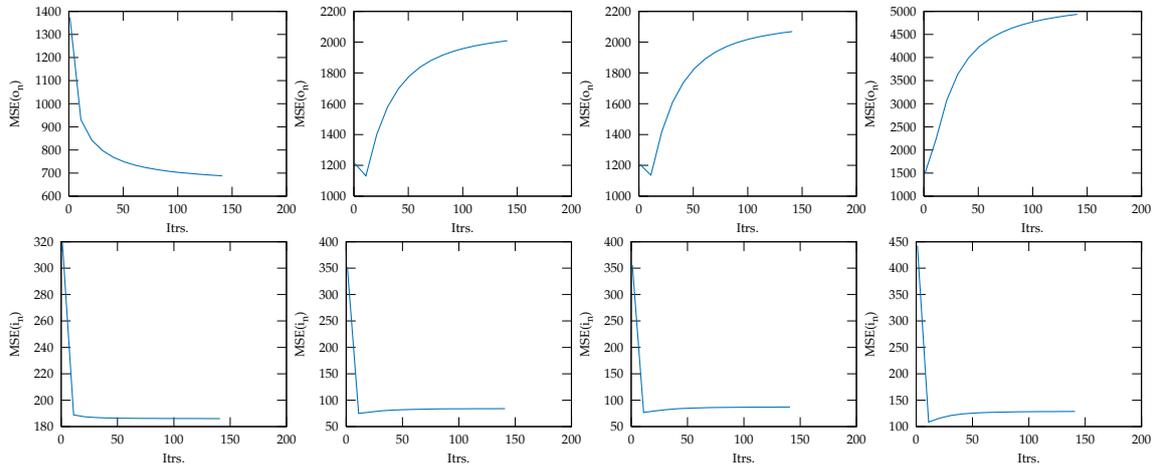


Figura E.4: MSEs para el método JVC sin filtrado

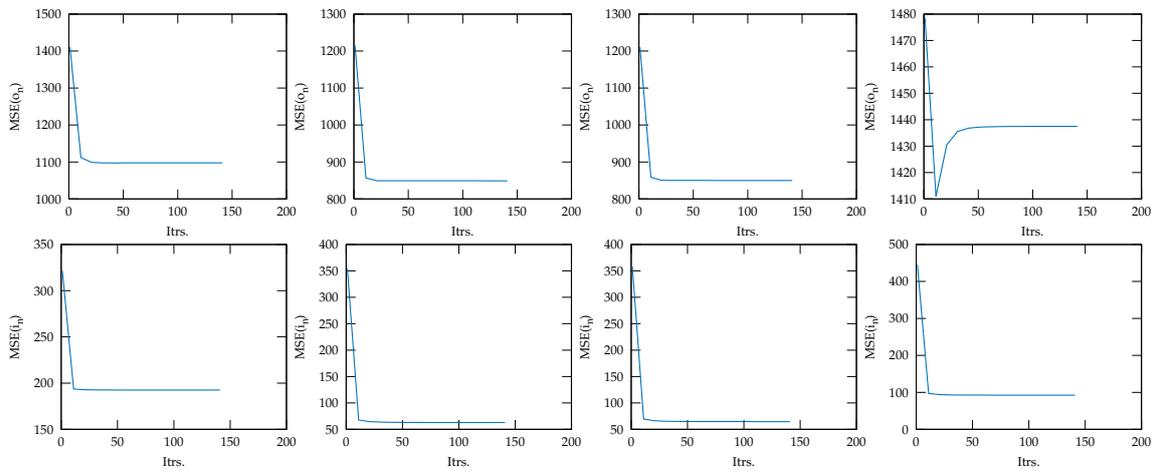


Figura E.5: MSEs para el método JVC con filtrado Gaussiano

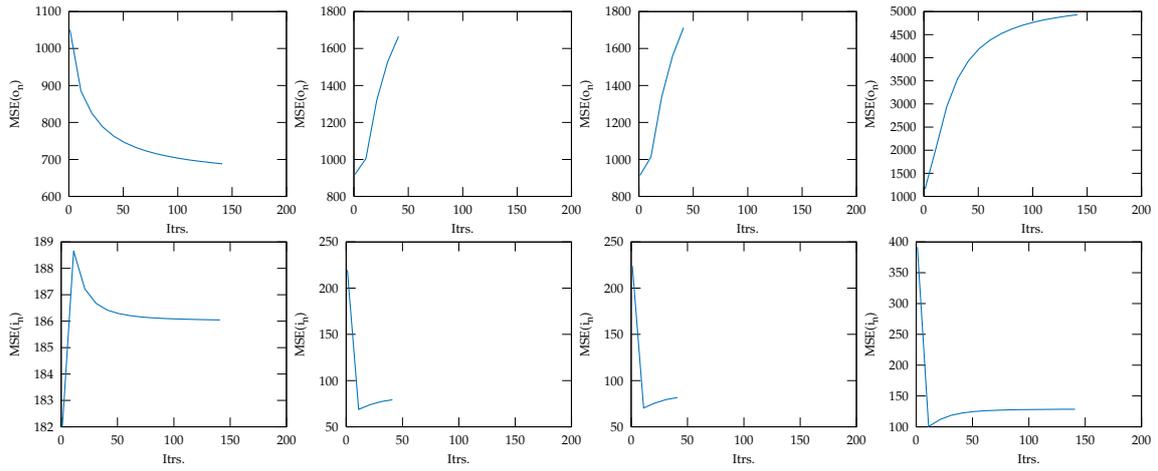


Figura E.6: MSEs para el método JVC con filtrado de Wiener

E.3. ML: MSEs versus exponente e iteraciones

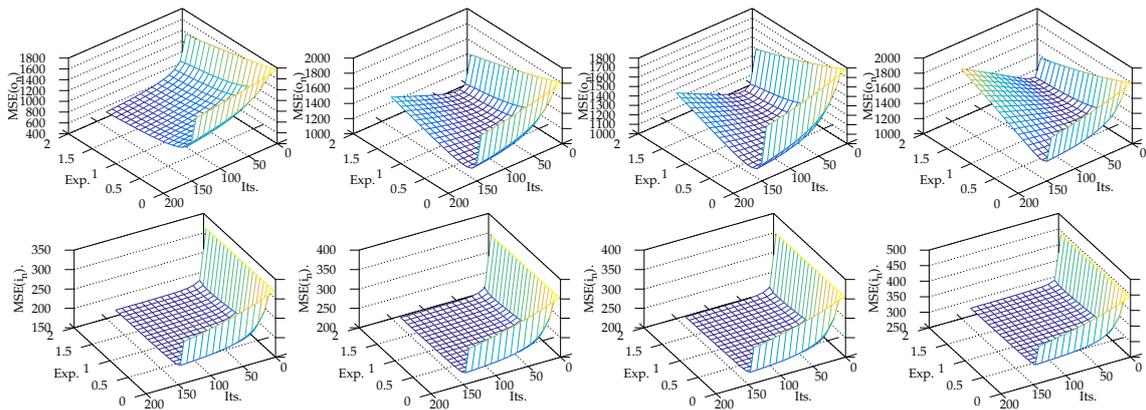


Figura E.7: MSEs para el método ML sin filtrado

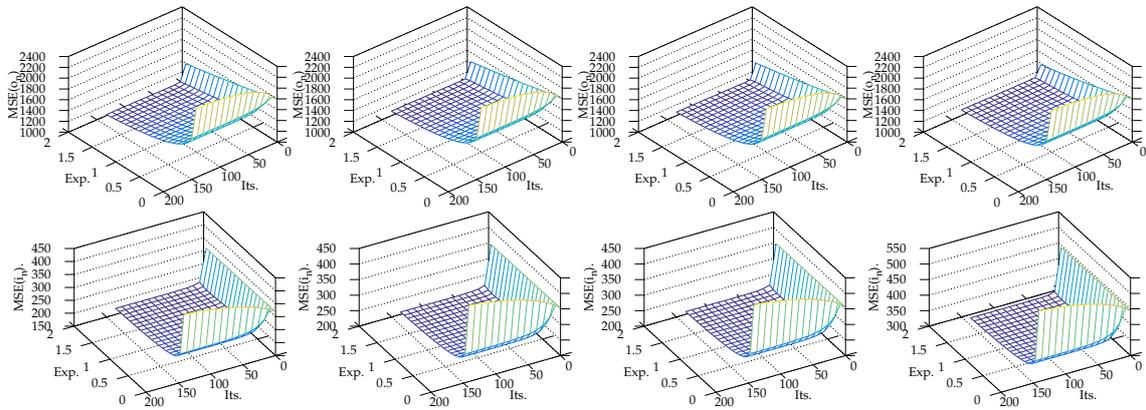


Figura E.8: MSEs para el método ML con filtrado Gaussiano

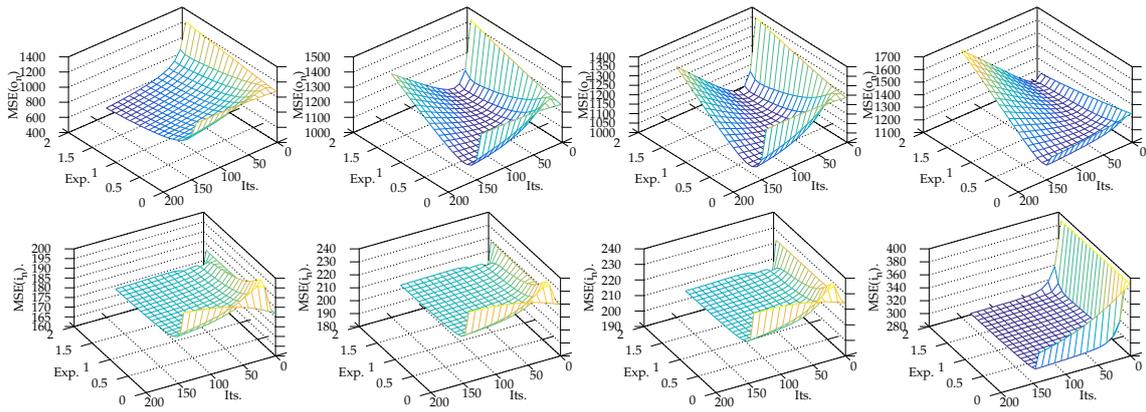


Figura E.9: MSEs para el método ML con filtrado de Wiener

E.4. RL: MSEs versus exponente e iteraciones

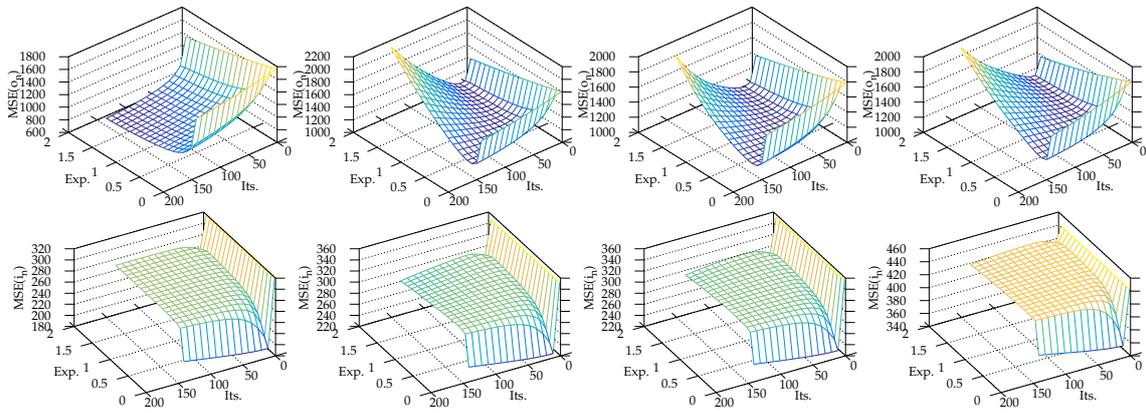


Figura E.10: MSEs para el método RL sin filtrado

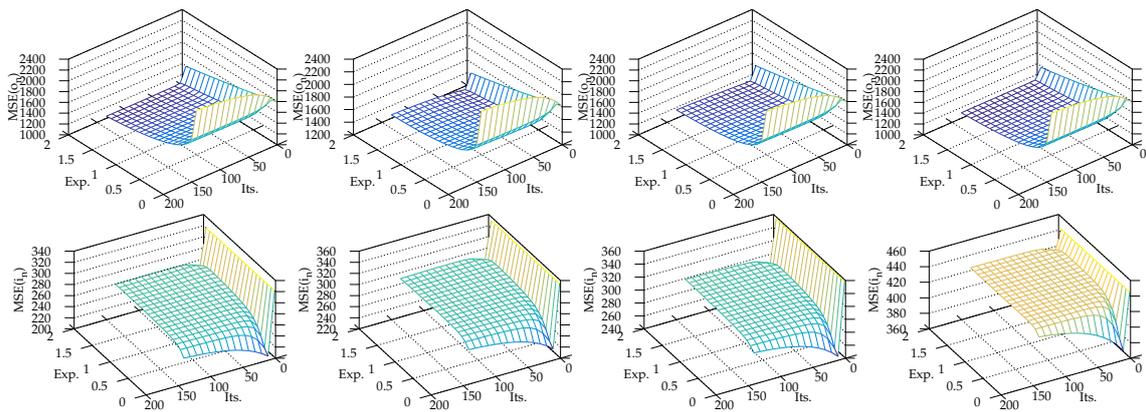


Figura E.11: MSEs para el método RL con filtrado Gaussiano

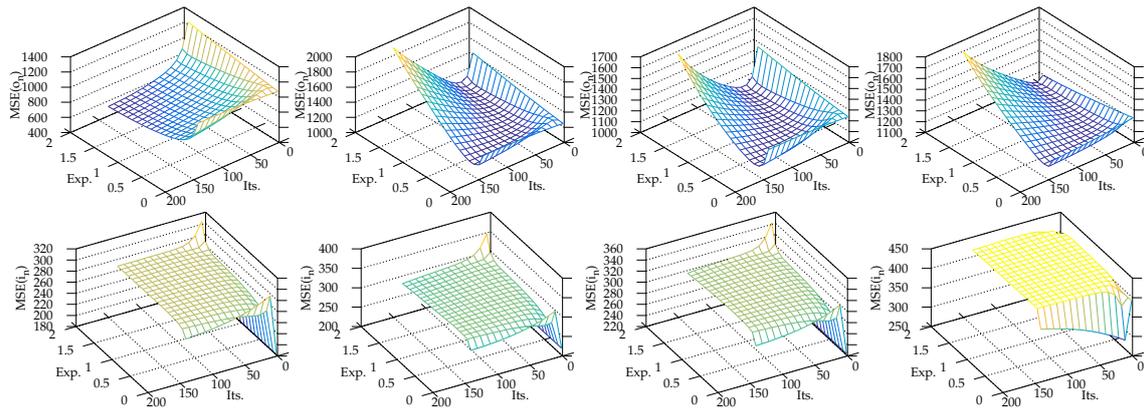


Figura E.12: MSEs para el método RL filtrado de Wiener

Presentaciones en congresos y artículos

- Diaz Zamboni, J. E. y Casco, V. H. [“Estimation Methods of the Point Spread Function Axial Position: A Comparative Computational Study”](#). En: *Journal of Imaging* 3 (1), (2017), pág. 7
- Tanus Mafud, M. A., Diaz Zamboni, J. E. y Casco, V. H. [“Estimación del índice de refracción de especímenes en microscopia de fluorescencia”](#). En: *Proceedings del 4to. Congreso de la Asociación Argentina de Microscopía*. 2016
- Diaz Zamboni, J. E. y Casco, V. H. [“Desarrollo de un método de ajuste de parámetros de un modelo de PSF 3D de microscopia de fluorescencia”](#). En: 3er. Congreso Argentino de Microscopia. Acta Microscopica, 2014
- Diaz Zamboni, J. E. y Casco, V. H. [“Selection of a photobleaching model using nonlinear regression analysis for applications in quantitative fluorescence microscopy imaging”](#). En: *Acta Microscopica* 22 (3), (2013), págs. 248-255
- Bugnon, L., Diaz Zamboni, J. E., Casco, V. H. e Izaguirre, M. F. [“Signal-Independent noise estimation in CCD cameras”](#). En: *2do Congreso Argentino de Microscopia*. 2012
- Diaz Zamboni, J. E., Bugnon, L. y Casco, V. H. [“Valoración objetiva de la calidad de imágenes en microscopia de fluorescencia”](#). En: *2do Congreso Argentino de Microscopia*. 2012
- Diaz Zamboni, J. E., Bugnon, L., Paravani, E. V., Galetto, C. D., Adur, J. F., Bessone, V., Bianchi, M., Acosta, M. G., Laugero, S. J., Casco, V. H. y F., I. M. [“Software integration to bioimages management, processing and analysis”](#). En: *Proceedings of the 3er Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional*. 2012
- Diaz Zamboni, J. E. y Casco, V. H. [“Aportes al desarrollo de la microscopia de fluorescencia multidimensional cuantitativa”](#). En: *Proceedings of the Escuela y Workshop Argentino en Ciencias de las Imágenes (ECImag 2012)*. 2012
- Diaz Zamboni, J. E. [“Análisis de modelos de fotodecaimiento en imágenes de microscopia de fluorescencia utilizando regresión no lineal”](#). En: *Proceedings of the XX Jornadas de Jovenes Pesquisadores da AUGM*. 2012
- Adur, J. F., Diaz Zamboni, J. E., Vicente, N. B., Izaguirre, M. F. y Casco, V. H. [“Microscopia de Desconvolución Digital: Desarrollo, Evaluación y Utilización en estudios cuantitativos tridimensionales”](#). En: *Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento 1* (2011), págs. 1-17

- Adur, J., Vicente, N., Diaz Zamboni, J. E., Izaguirre, M. F. y Casco, V. H. [“A Quantitative Study of the Quality of Deconvolved Wide-field Microscopy Images as Function of Empirical Three-dimensional Point Spread Functions”](#). En: *Journal of the Optical Society of Korea* 15 (3), (2011), págs. 252-263
- Diaz Zamboni, J. E. y Casco, V. H. [“Development and Testing of an Ultraviolet Light Monitor for Fluorescence Microscopy”](#). En: *In Focus* 21 (2011). Ed. por Kingsbury, L., págs. 32-42
- Vicente, N. B., Diaz Zamboni, J. E., Adur, J. F., Fernanda, I. M., Galetto, C. D. y Casco, V. H. [“Development of a semi-automatic algorithm for deconvolution and quantification of three-dimensional microscopy images”](#). En: *Acta Microscopica* 19 (3), (2010), págs. 328-336
- Diaz Zamboni, J. E., Adur, J. F., Vicente, N. B., Fiorucci, M. P., Izaguirre, M. F. y Casco, V. H. [“3D quantification applied to optically sectioned images for improving the automatic microscopy analyses”](#). En: *European Journal of Histochemistry* 52 (2008), págs. 115-125
- Diaz Zamboni, J. E., Paravani, E. V., Adur, J. F. y Casco, V. H. [“Implementation of an iterative deconvolution algorithm and its evaluation on three-dimensional images of fluorescence microscopy”](#). En: *Acta Microscopica* 16 (1-2), (2007), págs. 8-15
- Adur, J. F., Diaz Zamboni, J. E., Vicente, N. B., Izaguirre, M. F. y Casco, V. H. [“Digital Deconvolution Microscopy: Development, Evaluation and Utilization in 3D quantitative studies of E-cadherin expression in skin of Bufo arenarum tadpoles”](#). En: *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*. Ed. por Méndez-Vilas, A. y Díaz, J. 3rd. Vol. 2. Microscopy book series. Formatex, 2007. Cap. Techniques, págs. 906-916
- Vicente, N. B., Diaz Zamboni, J. E., Adur, J. F., Paravani, E. V. y Casco, V. H. [“Photobleaching correction in fluorescence microscopy images”](#). En: *J. Phys: Conf. Ser.* 90 (1), (2007), pág. 012068

Glosario

Aberración Falla en el diseño y construcción de lentes o sistemas de lentes que lo alejan de la condición ideal.

Autofluorescencia Fluorescencia intrínseca en especímenes biológicos.

Difracción Cualquier desviación de un rayo de luz desde su propagación rectilínea, que no es causada por reflexión o refracción.

Espectro de excitación Espectro de longitudes de onda capaz de excitar un átomo o una molécula.

Espectro de emisión Espectro de longitudes de onda emitidas por un átomo o molécula luego de ser excitado por otra fuente de radiación.

Estereología Conjunto de técnicas que permiten interpretar la estructura tridimensional de materiales o tejidos a partir de cortes físicos orientados.

Fluorocromo Sustancia empleada para tinciones o marcaciones.

Fluoróforo Sustancia que produce fluorescencia naturalmente.

Fotoblanqueo Destrucción irreversible de un fluoróforo que ocurre cuando este está en un estado excitado, el cual conduce a una reducción de la fluorescencia durante la observación.

Matriz singular Matriz que no tiene inversa.

Reconstrucción de imágenes Proceso de construcción de una imagen a partir de los datos de la interacción entre onda y la escena física que se registra.

Restauración de imágenes Cualquier proceso de recuperación de los datos originales de una imange revirtiendo los efectos de degradaciones previas.

Acrónimos

CCD *Charge-Coupled Device.*

CIBION Centro de Investigaciones en Bionanociencias.

CMOS *Complementary Metal-Oxide-Semiconductor.*

CONICET Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

CRLB *Cramer-Rao Lower Bound.*

DAPI 2-(4-amidinophenyl)-1H -indole-6-carboxamide.

DFT *Discrete Fourier Transform.*

DIN *Deutsches Institut für Normung.*

EIT *Electrical Impedance Tomography.*

FFT *Fast Fourier Transform.*

FICH Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas.

FISH *Fluorescence in situ Hybridization.*

FIUNER Facultad de Ingeniería.

FLIM *Fluorescence Lifetime Imaging.*

FRAP *Fluorescence Recovery After Photobleaching.*

FRET *Föster Resonance Energy Transfer.*

FWHM *Full Width at Half Maximum.*

GFP *Green Fluorescent Protein.*

JIS *Japanese Industrial Standards.*

LAMAE Laboratorio de Microscopia aplicada a Estudios Celulares y Moleculares.

MFCA microscopia de fluorescencia de campo amplio.

MSE *Mean Square Error.*

MTF *Modulation Transfer Function.*

OME *Open Microscopy Environment.*

OPD *Optical Path Difference.*

OTF *Optical Transfer Function.*

PSF *Point Spread Function.*

QY *Quantum Yield.*

ROC *Rate of Convergence.*

SNR *Signal-Noise Ratio.*

SO *seccionamiento óptico.*

SVD *Singular Value Decomposition.*

UNER *Universidad Nacional de Entre Ríos.*

UNL *Universidad Nacional del Litoral.*

Bibliografía

- [1] Abbe, E. "On the estimation of aperture in the microscope". En: *Journal of the Royal Microscopy Society* 2 (1) (1881).
- [2] Abraham, A. V., Ram, S., Chao, J., Ward, E. S. y Ober, R. J. "Quantitative study of single molecule location estimation techniques". En: *Optics Express* 17 (26), (2009).
- [3] Adur, J., Vicente, N., Diaz Zamboni, J. E., Izaguirre, M. F. y Casco, V. H. "A Quantitative Study of the Quality of Deconvolved Wide-field Microscopy Images as Function of Empirical Three-dimensional Point Spread Functions". En: *Journal of the Optical Society of Korea* 15 (3), (2011).
- [4] Adur, J. F., Diaz Zamboni, J. E., Vicente, N. B., Izaguirre, M. F. y Casco, V. H. "Digital Deconvolution Microscopy: Development, Evaluation and Utilization in 3D quantitative studies of E-cadherin expression in skin of Bufo arenarum tadpoles". En: *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*. Ed. por Méndez-Vilas, A. y Díaz, J. 3rd. Vol. 2. Microscopy book series. Formatex, 2007. Cap. Techniques.
- [5] Adur, J. F., Diaz Zamboni, J. E., Vicente, N. B., Izaguirre, M. F. y Casco, V. H. "Microscopia de Desconvolución Digital: Desarrollo, Evaluación y Utilización en estudios cuantitativos tridimensionales". En: *Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento* 1 (2011).
- [6] Adur, J. F. y Schlegel, J. O. "Diseño, desarrollo y construcción de un sistema de avance micrométrico para microscopios fotónicos". Proyecto final de carrera. Tesis de grado. Ruta 11 Km 10.5, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina: Facultad de Bioingeniería. Universidad Nacional de Entre Ríos, 1997.
- [7] Řeřábek, M. "Space Variant PSF – Deconvolution of Wide-Field Astronomical Images". En: *Acta Polytechnica* 48 (2008).
- [8] Agard, D. A. "Optical sectioning microscopy: Cellular architecture in three dimensions". En: *Ann. Rev. Biophys, Bioeng.* 13 (1984).
- [9] Agard, D. A., Hiraoka, Y., Shaw, P. y Sedat, J. W. "Fluorescence Microscopy in Three Dimensions". En: *Methods in Cell Biology*. Vol. 30. Academic Press, 1989. Cap. 13.
- [10] Aguet, F., Van De Ville, D. y Unser, M. "An accurate PSF model with few parameters for axially shift-variant deconvolution". En: *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2008. ISBI 2008. 5th IEEE International Symposium on.* 2008.
- [11] Aguet, F., Van De Ville, D. y Unser, M. "A maximum-likelihood formalism for sub-resolution axial localization of fluorescent nanoparticles". En: *Optics Express* 13 (26 2005).

- [12] Aliaga, S. A. Z. “Problemas Inversos y Controlabilidad en Modelos de la Mecánica de Fluidos”. Tesis doct. Universidad de Chile, 2016.
- [13] Ambartsumian, V. y Ambartsumian, R. V. “A Life in Astrophysics: Selected Papers of Viktor Ambartsumian”. Ed. por Ambartsumian, V. Allerton Pr, 1998.
- [14] Avinash, G. B., Quirk, W. S. y Nuttall, A. L. “Three-dimensional analysis of contrast-filled microvessel diameters”. En: *Microvascular Research* 45 (2), (1993).
- [15] Balzarotti, F., Eilers, Y., Gwosch, K. C., Gynnå, A. H., Westphal, V., Stefani, F. D., Elf, J. y Hell, S. W. “Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes”. En: *Science* (2017).
- [16] Barabas, F. M. “Nanoscopía de fluorescencia por localización estocástica de moléculas individuales”. Tesis doct. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, 272017.
- [17] Bocconi, M. “Logran la máxima resolución en microscopios de fluorescencia”. En: *CONICET. Divulgación científica*. (2016).
- [18] Brunet, D., Vrscay, E. R. y Wang, Z. “On the Mathematical Properties of the Structural Similarity Index”. En: *IEEE Transactions on Image Processing* 21 (4), (2012).
- [19] Bugnon, L., Diaz Zamboni, J. E., Casco, V. H. e Izaguirre, M. F. “Signal-Independent noise estimation in CCD cameras”. En: *2do Congreso Argentino de Microscopia*. 2012.
- [20] Calvo Padilla, M. L. “Óptica Avanzada”. Ed. por Calvo Padilla, M. L. Ariel Ciencia, 2002.
- [21] Casco, V. H., Adur, J. F., Balducci, F., García, J. C. e Izaguirre, M. F. *PID-UNER: Desarrollo de un microscopio de seccionamiento óptico*. 2001-2003.
- [22] Castleman, K. R. “Digital Image Processing”. New Jersey: Prentice Hall, 1996.
- [23] Chacko, N. y Liebling, M. “Fast spatially variant deconvolution for optical microscopy via iterative shrinkage thresholding”. En: *2014 IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICASSP)*. 2014.
- [24] Chapra, S. C. y Canale, R. P. “Métodos numéricos para ingenieros”. McGraw-Hill, 2006.
- [25] Cheezum, M. K., Walker, W. F. y Guilford, W. H. “Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles”. En: *Biophysical Journal* 81 (4), (2001).
- [26] Cherniz, A. S., Adur, J. F., Deluca, G. M. y Casco, V. H. “Informática Aplicada al Desarrollo de un Microscopio de Seccionamiento Óptico”. En: *Simpósio de Informática y Salud*. 2003.
- [27] Christ, M., Kenig, C. E. y Sadosky, C. “Harmonic analysis and partial differential equations: essays in honor of Alberto P. Calderón”. University of Chicago Press, 2001.
- [28] Conchello, J.-A. y Yu, Q. “Parametric blind deconvolution of fluorescence microscopy images: preliminary results”. En: *Proc. SPIE* 2655 (1996).
- [29] Csizsár, I. “Why Least Squares and Maximum Entropy? An Axiomatic Approach to Inference for Linear Inverse Problems”. En: *The Annals of Statistics* 19 (4), (1991).
- [30] Dempster, A. P., Laird, N. M. y Rubin, D. B. “Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm”. En: *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 39 (1), (1977).

- [31] Deschout, H., Znacchi, F. C., Mlodzianoski, M., Diaspro, A., Bewersdorf, J., Hess, S. T. y Braeckmans, K. [“Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy”](#). En: *Nature Methods* 11 (3), (2014).
- [32] Diaz Zamboni, J. E., Bugnon, L., Paravani, E. V., Galetto, C. D., Adur, J. F., Bessone, V., Bianchi, M., Acosta, M. G., Laugero, S. J., Casco, V. H. y F., I. M. [“Software integration to bioimages management, processing and analysis”](#). En: *Proceedings of the 3er Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional*. 2012.
- [33] Diaz Zamboni, J. E. *Software para usuarios de microscopios de desconvolución digital*. Tesis de grado. Ruta 11 Km 10.5, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina, 2004.
- [34] Diaz Zamboni, J. E. [“Análisis de modelos de fotodecaimiento en imágenes de microscopía de fluorescencia utilizando regresión no lineal”](#). En: *Proceedings of the XX Jornadas de Jovenes Pesquisadores da AUGM*. 2012.
- [35] Diaz Zamboni, J. E., Adur, J. F., Balducci, F., Cherniz, A. S., Fernanda, I. M. y Casco, V. H. “Evaluación de algoritmos de desconvolución aplicados a imágenes 3D en Microscopía de fluorescencia”. En: *XIV Congreso Argentino de Bioingeniería y III Jornadas de Ingeniería Clínica*. 2003.
- [36] Diaz Zamboni, J. E., Adur, J. F. y Casco, V. H. “Implementación de un algoritmo basado en el metodo de regulación lineal. Su aplicación en la reconstrucción tridimensional de secciones ópticas”. En: *Simulación numérica y modelado computacional*. Ed. por Rojo, J, Torres, M. J. y Cerrolaza, M. Sociedad Venezolana de Métodos Numéricos, 2004.
- [37] Diaz Zamboni, J. E., Adur, J. F., Fiorucci, M. P., Izaguirre, M. F. y Casco, V. H. [“Algoritmo de desconvolución iterativo con restricción de positividad para imágenes de microscopía de fluorescencia tridimensional”](#). En: *XV Congreso Argentino de Bioingeniería*. Sociedad Argentina de Bioingeniería. 2005.
- [38] Diaz Zamboni, J. E., Adur, J. F., Osella, D., Izaguirre, M. F. y Casco, V. H. [“Software para usuarios de microscopios de desconvolución digital”](#). En: *XV Congreso Argentino de Bioingeniería*. 2005.
- [39] Diaz Zamboni, J. E., Adur, J. F., Vicente, N. B., Fiorucci, M. P., Izaguirre, M. F. y Casco, V. H. [“3D quantification applied to optically sectioned images for improving the automatic microscopy analyses”](#). En: *European Journal of Histochemistry* 52 (2008).
- [40] Diaz Zamboni, J. E., Bugnon, L. y Casco, V. H. [“Valoración objetiva de la calidad de imágenes en microscopía de fluorescencia”](#). En: *2do Congreso Argentino de Microscopia*. 2012.
- [41] Diaz Zamboni, J. E. y Casco, V. H. [“Development and Testing of an Ultraviolet Light Monitor for Fluorescence Microscopy”](#). En: *In Focus* 21 (2011). Ed. por Kingsbury, L.
- [42] Diaz Zamboni, J. E. y Casco, V. H. [“Aportes al desarrollo de la microscopía de fluorescencia multidimensional cuantitativa”](#). En: *Proceedings of the Escuela y Workshop Argentino en Ciencias de las Imágenes (ECImag 2012)*. 2012.

- [43] Diaz Zamboni, J. E. y Casco, V. H. [“Selection of a photobleaching model using nonlinear regression analysis for applications in quantitative fluorescence microscopy imaging”](#). En: *Acta Microscopica* 22 (3), (2013).
- [44] Diaz Zamboni, J. E. y Casco, V. H. [“Desarrollo de un método de ajuste de parámetros de un modelo de PSF 3D de microscopia de fluorescencia”](#). En: 3er. Congreso Argentino de Microscopia. *Acta Microscopica*, 2014.
- [45] Diaz Zamboni, J. E. y Casco, V. H. [“Estimation Methods of the Point Spread Function Axial Position: A Comparative Computational Study”](#). En: *Journal of Imaging* 3 (1), (2017).
- [46] Diaz Zamboni, J. E., Paravani, E. V., Adur, J. F. y Casco, V. H. [“Implementation of an iterative deconvolution algorithm and its evaluation on three-dimensional images of fluorescence microscopy”](#). En: *Acta Microscopica* 16 (1-2), (2007).
- [47] Dominguez, A. [“A History of the Convolution Operation”](#). En: *IEEE Pulse Magazine* (2015).
- [48] Dunn, S. M., Constantinides, A. y Moghe, P. V. [“Numerical methods in biomedical engineering”](#). Academic Press, 2006.
- [49] Eaton, J. W., Bateman, D. y Hauberg, S. [“GNU Octave version 3.0.1 manual: a high-level interactive language for numerical computations”](#). Ed. por Eaton, J. W. CreateSpace Independent Publishing Platform, 2009.
- [50] Efron, B. y Tibshirani, R. J. [“An Introduction to the Bootstrap”](#). Monographs on Statistics and Applied Probability (57), Chapman & Hall/CRC, 1993.
- [51] Frieden, B. R. [“Probability, Statistical Optics, and Data Testing. A Problem Solving Approach”](#). Ed. por Frieden, B. R.
Nota: **Formación de la imagen desde un punto de vista estadístico. Técnicas de estimación de parámetros. Cota inferior de error de estimación.** Springer, 2001.
- [52] Ghosh, S. y Preza, C. [“Fluorescence microscopy point spread function model accounting for aberrations due to refractive index variability within a specimen”](#). En: *Journal of Biomedical Optics* 20 (7), (2015).
- [53] Gibson, S. F. y Lanni, F. [“Diffraction by a circular aperture as a model for three-dimensional optical microscopy”](#). En: *Journal of the Optical Society of America A, Optics and Image Science* 6 (9), (1989).
- [54] Gibson, S. F. y Lanni, F. [“Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy”](#). En: *Journal of the Optical Society of America A: Optics, Image Science, and Vision* 8 (10), (1991).
Nota: **Artículo fundamental para comprender aberración esférica en microscopios ópticos utilizados fuera de condiciones de diseño.**
- [55] Goldberg, I. G., Allan, C., Burel, J.-M., Creager, D., Falconi, A., Hochheiser, H., Johnston, J., Mellen, J., Sorger, P. K. y Swedlow, J. R. [“The Open Microscopy Environment \(OME\) Data Model and XML file: open tools for informatics and quantitative analysis in biological imaging”](#). En: *Genome Biology* 6 (5), (2005).

- [56] Gonzalez, R. y Woods, R. E. [“Digital Image Processing”](#). Ed. por Gonzalez, R. y Woods, R. E. Prentice Hall, 2002.
- [57] Goodman, J. W. [“Introduction to Fourier Optics”](#). 2nd Edition. Electrical and Computer Engineering. McGraw-Hill, 1996.
- [58] Gunturk, B. K. y Li, X. [“Image Restoration. Fundamentals and Advances”](#). Ed. por Gunturk, B. K. y Li, X. CRC Press, 2013.
- [59] Haeberlé, O., Bicha, F., Simler, C., Dieterlen, A., Xu, C., Colicchio, B., Jacquy, S. y Gramain, M. [“Identification of acquisition parameters from the pointspread function of a fluorescence microscope”](#). En: *Optics Communications* 196 (2001).
- [60] Haeberlé, O. [“Focusing of light through a stratified medium: a practical approach for computing microscope point spread functions. Part I: Conventional microscopy”](#). En: *Optics Communications* 216 (1–3), (2003).
- [61] Hansen, C. [“Rank-Deficient and Discrete Ill-Posed Problems. Numerical aspects of linear inversion”](#). Ed. por Flaherty, J. E. SIAM, 1998.
- [62] Hansen, P. C., Nagy, J. G. y O’Leary, D. P. [“Deblurring images matrices, spectra, and filtering”](#). Ed. por Highman, N. J. SIAM, 2006.
- [63] Hanser, B. M., Gustafsson, M. G. L., Agard, D. A. y Sedat, J. W. [“Phase-retrieved pupil functions in wide-field fluorescence microscopy”](#). En: *Journal of Microscopy* 216 (Pt 1), (2004).
- [64] Holmes, T. J. [“Maximum-likelihood image restoration adapted for noncoherent optical imaging”](#). En: *Journal of the Optical Society of America A, Optics and Image Science* 5 (5), (1988).
- [65] Hopkins, H. H. [“The frequency response of a defocused optical system”](#). En: *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 231 (1184), (1955).
- [66] Hopkins, H. H. [“The Numerical Evaluation of the Frequency Response of Optical Systems”](#). En: *Proceedings of the Physical Society. Section B* 70 (10), (1957).
- [67] Inoué, S. [“Video Microscopía”](#). Ed. por Inoué, S. 1st. Ituzaingo 3073, Mendoza, Argentina: Inca, 1993.
- [68] Izaguirre, M. F., Larrea, D., Adur, J. F., Diaz Zamboni, J. E., Vicente, N. B., Galetto, C. D. y Casco, V. H. [“Role of E-cadherin in epithelial architecture maintenance”](#). En: *Cell communication & adhesion* (2010).
- [69] Jansson, P., ed. [“Deconvolution of Images and Spectra”](#). 2.^a ed. 1300 Boylston Street, Chestnut Hill, MA 02167, USA: Academic Press, 1997.
- [70] Kim, B. y Naemura, T. [“Blind Depth-variant Deconvolution of 3D Data in Wide-field Fluorescence Microscopy”](#). En: *Scientific Reports* 5 (2015).
- [71] Kim, B. y Naemura, T. [“Blind deconvolution of 3D fluorescence microscopy using depth-variant asymmetric PSF”](#). En: *Microscopy Research and Technique* 79 (6), (2016).

- [72] Kim, J., An, S., Ahn, S. y Kim, B. “Depth-variant deconvolution of 3D widefield fluorescence microscopy using the penalized maximum likelihood estimation method”. En: *Optics Express* 21 (23), (2013).
- [73] Kirshner, H., Aguet, F., Sage, D. y Unser, M. “3-D PSF fitting for fluorescence microscopy: implementation and localization application”. En: *Journal of Microscopy* 249 (1), (2013).
- [74] Kozubek, M. “Theoretical versus experimental resolution in optical microscopy.” En: *Microscopy Research and Technique* 53 (2), (2001).
- [75] Kozubek, M., Kozubek, S., Lukášová, E., Bártová, E., Skalníková, M., Matula, P., Matula, P., Jirsová, P., Cafourková, A. y Koutná, I. “Combined confocal and wide-field high-resolution cytometry of fluorescent in situ hybridization-stained cells.” En: *Cytometry* 45 (1), (2001).
- [76] Li, J., Xue, F. y Blu, T. “Fast and accurate three-dimensional point spread function computation for fluorescence microscopy”. En: *Journal of the Optical Society of America A, Optics and Image Science* 34 (6), (2017).
- [77] Lucas, F. F. “The architecture of living cells-recent advances in methos of biological research-optical sectioning with the ultra-violet microscope”. En: *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* 16 (9), (1930).
- [78] Lucy, L. B. “An iterative technique for the rectification of observed distributions”. En: *The Astronomical Journal* 79 (1974).
- [79] Mahmoudi, A. “Zero Focal Shift in High Numerical Aperture Focusing of a Gaussian Laser Beam through Multiple Dielectric Interfaces”. En: *ArXiv e-prints* 1 (2014).
- [80] Markham, J. y Conchello, J.-A. “Parametric blind deconvolution: a robust method for the simultaneous estimation of image and blur”. En: *Journal of the Optical Society of America A, Optics and Image Science* 16 (10), (1999).
- [81] Masters, B. R. “The development of fluorescence microscopy”. En: *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley & Sons, 2010.
- [82] Minsky, M. “Microscopy apparatus”. Pat. 3013467. US Patent 3,013,467. 1961.
- [83] Minsky, M. “Memoir on inventing the Confocal Scanning Microscope”. En: *Scanning* 10 (1988).
- [84] Montgomery, D., Runger, G. y You, H. “Applied Statistics and Probability for Engineers, Student Workbook with Solutions”. John Wiley & Sons, 2003.
- [85] Mortensen, K. I., Churchman, L. S., Spudich, J. A. y Flyvbjerg, H. “Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy”. En: *Nature Methods* 7 (5), (2010).
- [86] Murphy, D. B. “Fundamentals in light microscopy and electronic imaging”. Ed. por Murphy, D. B. Wiley-Liss, 2001.
- [87] Novotny, L. y Hetch, B. “Principles of Nano-Optics”. Ed. por Novotny, L. y Hetch, B. Cambridge University Press, 2012.

- [88] Ober, R., Tahmasbi, A., Ram, S., Lin, Z. y Ward, E. [“Quantitative Aspects of Single-Molecule Microscopy: Information-theoretic analysis of single-molecule data”](#). En: *Signal Processing Magazine, IEEE* 32 (1), (2015).
- [89] Patwary, N. y Preza, C. [“Image restoration for three-dimensional fluorescence microscopy using an orthonormal basis for efficient representation of depth-variant point-spread functions”](#). En: *Biomedical Optics Express* 6 (10), (2015).
- [90] Pawley, J. B., ed. [“Handbook of biological confocal microscopy”](#). 2nd. New York: Plenum Pres, 1995.
- [91] Pawley, J. B., ed. [“Handbook of biological confocal microscopy”](#). 3rd. New York: Plenum Pres, 2006.
- [92] Preza, C., Miller, M. I., Thomas, L. J. y McNally, J. G. [“Regularized linear method for reconstruction of three-dimensional microscopic objects from optical sections”](#). En: *Journal of the Optical Society of America A: Optics, Image Science, and Vision* 9 (2), (1992).
- [93] Preza, C. y Conchello, J.-A. [“Depth-variant maximum-likelihood restoration for three-dimensional fluorescence microscopy”](#). En: *Journal of the Optical Society of America A: Optics, Image Science, and Vision* 21 (9), (2004).
- [94] Rawlins, D. J. [“Light Microscopy”](#). Ed. por Graham, J. M. y D.'Billington. The Introduction to Biotechniques. Bios Scientific Publishers, 1992.
- [95] Ribes, A. y Schmitt, F. [“Linear inverse problems in imaging”](#). En: *IEEE Signal Processing Magazine* 25 (4), (2008).
- [96] Richardson, W. H. [“Bayesian-Based Iterative Method of Image Restoration”](#). En: *Journal of the Optical Society of America* 62 (1), (1972).
- [97] Rieger, B., Nieuwenhuizen, R. y Stallinga, S. [“Image Processing and Analysis for Single-Molecule Localization Microscopy: Computation for nanoscale imaging”](#). En: *Signal Processing Magazine, IEEE* 32 (1), (2015).
- [98] Sage, D., Donati, L., Soulez, F., Fortun, D., Schmit, G., Seitz, A., Guiet, R., Vonesch, C. y Unser, M. [“DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy”](#). En: *Methods* 115 (2017).
- [99] Sarder, P. y Nehorai, A. [“Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images”](#). En: *Signal Processing Magazine, IEEE* 23 (3), (2006).
- [100] Shaevitz, J. W. y Fletcher, D. A. [“Enhanced three-dimensional deconvolution microscopy using a measured depth-varying point-spread function”](#). En: *Journal of the Optical Society of America A: Optics, Image Science, and Vision* 24 (9), (2007).
- [101] Shampine, L. [“Vectorized adaptive quadrature in MATLAB”](#). En: *Journal of Computational and Applied Mathematics* 211 (2), (2008).
- [102] Shaw, P. J., Agard, D. A., Hiraoka, Y. y Sedat, J. W. [“Tilted view reconstruction in optical microscopy. Three-dimensional reconstruction of Drosophila melanogaster embryo nuclei”](#). En: *Biophysical Journal* 55 (1), (1989).

- [103] Sibarita, J. B. [“Deconvolution microscopy”](#). En: *Advances In Biochemical Engineering* 95 (2005).
- [104] Sluder, G. y Wolf, D. E. [“Digital Microscopy”](#). Ed. por Sluder, G. y Wolf, D. E. 3rd. Vol. 81. *Methods in Cell Biology*. Elsevier, 2007.
- [105] Small, A. y Stahlheber, S. [“Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy”](#). En: *Nature methods* 11 (3), (2014).
- [106] Snyder, D., Schulz, T. y O’Sullivan, J. [“Deblurring subject to nonnegativity constraints”](#). En: *Signal Processing, IEEE Transactions on* 40 (5), (1992).
- [107] Snyder, D. L., Hammoud, A. M. y White, R. L. [“Image recovery from data acquired with a charge-coupled-device camera”](#). En: *Journal of the Optical Society of America A: Optics, Image Science, and Vision* 10 (5), (1993).
- [108] Spies, R. y Temperini, K. “Apuntes de clases”. En: *Problemas inversos con aplicaciones al procesamiento y reconstrucción de imágenes digitales*. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. 2008.
- [109] Stodden, V., Leisch, F. y Peng, R. D., eds. “Implementing Reproducible Research”. CR, 2014.
- [110] Stodden, V. y Miguez, S. [“Best Practices for Computational Science: Software Infrastructure and Environments for Reproducible and Extensible Research”](#). En: *Journal of Open Research Software* 1 (2014).
- [111] Stokes, G. G. [“On the Change of Refrangibility of Light”](#). En: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 142 (1852).
- [112] Stokseth, P. A. [“Properties of a Defocused Optical System”](#). En: *Journal of the Optical Society of America* 59 (10), (1969).
- [113] Tanus Mafud, M. A., Diaz Zamboni, J. E. y Casco, V. H. [“Estimación del índice de refracción de especímenes en microscopía de fluorescencia”](#). En: *Proceedings del 4to. Congreso de la Asociación Argentina de Microscopía*. 2016.
- [114] Török, P., Varga, P., Laczik, Z. y Booker, G. R. [“Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: an integral representation”](#). En: *Journal of the Optical Society of America A: Optics, Image Science, and Vision* 12 (2), (1995).
- [115] [“Understanding Microscopes and Objectives”](#). Edmund Optics. 2017 (accedido en marzo de 2017).
- [116] Valeur, B. [“Molecular Fluorescence: Principles and Applications”](#). Wiley-VHC Verlag GmbH, 2012.
- [117] Vicente, N. B., Diaz Zamboni, J. E., Adur, J. F. y Casco, V. H. [“Evaluation of 3D image-treatment algorithms applied to optical-sectioning microscopy”](#). En: *XII Congreso Argentino de Ciencias de la Computación*. 2006.

- [118] Vicente, N. B., Diaz Zamboni, J. E., Adur, J. F., Fernanda, I. M., Galetto, C. D. y Casco, V. H. [“Development of a semi-automatic algorithm for deconvolution and quantification of three-dimensional microscopy images”](#). En: *Acta Microscopica* 19 (3), (2010).
- [119] Vicente, N. B., Diaz Zamboni, J. E., Adur, J. F., Izaguirre, M. F. y Casco, V. H. [“Enhancement of an automatic algorithm for deconvolution and quantification of three-dimensional microscopy images”](#). En: *XIV Congreso Argentino de Ciencias de la Computación*. 2008.
- [120] Vicente, N. B., Diaz Zamboni, J. E., Adur, J. F., Paravani, E. V. y Casco, V. H. [“Photo-bleaching correction in fluorescence microscopy images”](#). En: *J. Phys: Conf. Ser.* 90 (1), (2007).
- [121] Wallace, W., Schaefer, L. H. y Swedlow, J. R. [“A workingperson’s guide to deconvolution in light microscopy”](#). En: *Biotechniques* 31 (5), (2001).
- [122] Wang, Z. y Bovik, A. C. [“Mean squared error: Love it or leave it? A new look at Signal Fidelity Measures”](#). En: *IEEE Signal Processing Magazine* 26 (1), (2009).
- [123] Weinstein, M. y Castleman, K. R. [“Reconstructing 3-D Specimens From 2-D Section Images”](#). En: *Proc. SPIE* 0026 (1971).
- [124] Wu, Q., Merchant, F. A. y Clastleman, K. R. [“Microscope Image Processing”](#). Academic Press, 2008.
- [125] Xu, C., Aissaoui, I. y Jacquy, S. [“Algebraic analysis of the Van Cittert iterative method of deconvolution with a general relaxation factor”](#). En: *Journal of the Optical Society of America A, Optics and Image Science* 11 (11), (1994).