

ESTRATEGIAS DE MEJORA EN MICROSCOPIA POR ILUMINACIÓN O COLECCIÓN ESTRUCTURADA

Tesis Doctoral por

JORGE SOLA PICABEA

Directores

GENARO SAAVEDRA TORTOSA

EMILIO SÁNCHEZ ORTIGA



Programa de Doctorat en Física
Facultat de Física, Universitat de València

Septiembre 2020

DECLARACIÓN

Dr. Genaro SAAVEDRA TORTOSA, Catedrático de Universidad, y Dr. Emilio SÁNCHEZ ORTIGA, Investigador Contratado, pertenecientes al Departamento de Óptica, Optometría y Ciencias de la Visión de la Universitat de València,

CERTIFICAN

que la presente memoria, *Estrategias de mejora en microscopía por iluminación o colección estructurada*, resume el trabajo de investigación realizado, bajo su dirección, por D. Jorge SOLA PICABEA y constituye su Tesis para optar al Grado de Doctor en Física.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Valencia, a 21 de diciembre de 2020.

Fdo.:

Dr. Genaro Saavedra Tortosa

Fdo.:

Dr. Emilio Sánchez Ortiga

«Elige un trabajo que te guste y no tendrás que trabajar ni un día de tu vida.»

Confucio

A continuación se enumeran las *Publicaciones, Comunicaciones en congresos y Patentes* en las que he participado a lo largo del desarrollo de este proyecto de Tesis Doctoral. Nótese que al final del documento se listarán aquellas referencias relacionadas con el desarrollo de esta Tesis, tanto ajenas como propias.

PUBLICACIONES

- [1] B. JAVIDI, J. SOLA-PIKABEA y M. MARTINEZ-CORRAL, «Breakthroughs in photonics 2014: Recent advances in 3-D integral imaging sensing and display», *IEEE Photonics Journal* **7**, n.º 3 (2015) 1-7.
- [2] A. DORADO, G. SAAVEDRA, J. SOLA-PIKABEA y col., «Integral imaging monitors with an enlarged viewing angle», *Journal of Information and Communication Convergence Engineering* **13**, n.º 2 (2015) 132-138.
- [3] M. MARTINEZ-CORRAL, A. DOBLAS, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, J. SOLA-PIKABEA y G. SAAVEDRA, «Static real-time capture of 3D microscopy images», *SPIE Newsroom* **1**, n.º 2 (2015) 1-3.
- [4] A. LLAVADOR, J. SOLA-PIKABEA, G. SAAVEDRA, B. JAVIDI y M. MARTINEZ-CORRAL, «Resolution improvements in integral microscopy with Fourier plane recording», *Optics Express* **24**, n.º 18 (2016) 20792-20798.
- [5] G. SCROFANI, J. SOLA-PIKABEA, A. LLAVADOR, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, J. BARREIRO, G. SAAVEDRA, J. GARCÍA-SUCERQUIA y M. MARTINEZ-CORRAL, «FIMic: design for ultimate 3D-integral microscopy of in-vivo biological samples», *Biomedical Optics Express* **9**, n.º 1 (2018) 335-346.
- [6] J. SOLA-PIKABEA, A. GARCÍA-RIUS, G. SAAVEDRA, J. GARCÍA-SUCERQUIA, M. MARTINEZ-CORRAL y E. SÁNCHEZ-ORTIGA, «Fast and robust phase-shift estimation in two-dimensional structured illumination microscopy», *PLOS ONE* **14**, n.º 8 (2019) e0221254.

- [7] G. SCROFANI, J. SOLA-PIKABEA, A. LLAVADOR, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, J. BARREIRO, G. SAAVEDRA, J. GARCÍA-SUCERQUIA, N. INCARDONA y M. MARTINEZ-CORRAL, «3D integral microscopy based in far-field detection», *Proceedings of the SPIE* **10666** (2018) 106660Z.
- [8] N. PATWARY, J. SOLA-PIKABEA, A. DOBLAS, G. SAAVEDRA, M. MARTINEZ-CORRAL y C. PREZA, «Evaluation of the use of wavefront encoding to reduce depth-induced aberration in structured-illumination microscopy», *Proceedings of the SPIE* **10499** (2018) 104991.
- [9] J. SOLA-PIKABEA, A. DOBLAS, G. SAAVEDRA, M. MARTINEZ-CORRAL y C. PREZA, «Optimal design of incoherent tunable-frequency structured illumination microscope scheme», *Proceedings of the IEEE 15th International Symposium on Biomedical Imaging* (2018) 449-452.
- [10] M. MARTINEZ-CORRAL, J. BARREIRO, A. LLAVADOR, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, J. SOLA-PIKABEA, G. SCROFANI y G. SAAVEDRA, «Integral imaging with Fourier-plane recording», *Proceedings of the SPIE* **10219**, n.º 0 (2017) 10219-0B.
- [11] M. MARTINEZ-CORRAL, A. DORADO, S. HONG, J. SOLA-PIKABEA y G. SAAVEDRA, «Display of travelling 3D scenes from single integral-imaging capture», *Proceedings of the SPIE* **9867** (2016) 986706.
- [12] A. DOBLAS, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, G. SAAVEDRA, J. SOLA-PIKABEA, M. MARTINEZ-CORRAL, P. HSIEH e Y. HUANG, «Three-dimensional microscopy through liquid-lens axial scanning», *Proceedings of the SPIE* **9495** (2015) 959503.
- [13] A. TOLOSA, H. NAVARRO, G. SAAVEDRA, M. MARTINEZ-CORRAL, J. SOLA-PIKABEA, A. PONS, R. MARTÍNEZ-CUENCA y B. JAVIDI, «Optical barriers in integral imaging monitors through micro-Köhler illumination», *Proceedings of the SPIE* **9495** (2015) 94950L.
- [14] S. HONG, A. DORADO, G. SAAVEDRA, J. SOLA-PIKABEA y M. MARTINEZ-CORRAL, «Full-parallax 3D display from the hole filtered depth information», *Proceedings of the SPIE* **9495** (2015) 95950E.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS

- [1] A. DOBLAS, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, G. SAAVEDRA, J. SOLA-PIKABEA, M. MARTÍNEZ-CORRAL, P.-Y. HSIEH e Y.-P. HUANG, «Three-dimensional microscopy through liquid-lens axial scanning», en *Three-Dimensional Imaging, Visualization, and Display Conference in the SPIE Meeting on Defense, Security and Sensing*, Baltimore (MD, EE.UU.) 2015.
- [2] A. TOLOSA, H. NAVARRO, G. SAAVEDRA, M. MARTÍNEZ-CORRAL, J. SOLA-PIKABEA, A. PONS, R. MARTÍNEZ-CUENCA y B. JAVIDI, «Optical barriers in integral imaging monitors through micro-Köhler illumination», en *Three-Dimensional Imaging, Visualization, and Display Conference in the SPIE Meeting on Defense, Security and Sensing*, Baltimore (MD, EE.UU.) 2015.
- [3] S. HONG, A. DORADO, G. SAAVEDRA, J. SOLA-PIKABEA y M. MARTÍNEZ-CORRAL, «Full-parallax 3D display from the hole-filtered depth information», en *3DTV-Conference: The True Vision-Capture, Transmission and Display of 3D Video (3DTV-CON)*, Lisboa (Portugal) 2015.
- [4] M. MARTÍNEZ-CORRAL, A. DORADO, S. HONG, J. SOLA-PIKABEA y G. SAAVEDRA, «Display of travelling 3D scenes from single integral-imaging capture», en *Three-Dimensional Imaging, Visualization, and Display Conference en el SPIE Meeting on Defense and Commercial Sensing*, Baltimore (MD, EE.UU.) 2016.
- [5] M. MARTÍNEZ-CORRAL, J. BARREIRO, A. LLAVADOR, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, J. SOLA-PIKABEA, G. SCROFANI y G. SAAVEDRA, «Integral imaging with Fourier-plane recording», en *Three-Dimensional Imaging, Visualization, and Display Conference en el SPIE Meeting on Defense and Commercial Sensing*, Anaheim (CA, EE.UU.) 2017.

- [6] G. SCROFANI, J. SOLA-PIKABEA, A. LLAVADOR, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, J. BARREIRO, J. GARCÍA-SUCERQUIA, N. INCARDONA y M. MARTÍNEZ-CORRAL, «3D integral microscopy based in far-field detection», en *Three-Dimensional Imaging, Visualization, and Display Conference in the SPIE Meeting on Defense and Commercial Sensing*, Orlando (FL, EE.UU.) 2018.
- [7] N. PATWARY, J. SOLA-PIKABEA, A. DOBLAS, G. SAAVEDRA, M. MARTÍNEZ-CORRAL y C. PREZA, «Evaluation of the use of wavefront encoding to reduce depth-induced aberration in structured illumination microscopy», en *Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXV in the SPIE Photonics West – BiOS*, San Francisco (CA, EE.UU.) 2018.
- [8] J. SOLA-PIKABEA, A. DOBLAS, G. SAAVEDRA, M. MARTÍNEZ-CORRAL y C. PREZA, «Optimal design of incoherent tunable-frequency structured illumination microscope scheme», en *IEEE 15th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2018)*, Washington (DC, EE.UU.) 2018.
- [9] J. SOLA-PIKABEA, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, G. SAAVEDRA y M. MARTÍNEZ-CORRAL, «Phase-Shift Estimation in Structured Illumination Microscopy by Normalized Peak Intensity Difference», en *Focus on Microscopy*, Londres (Reino Unido) 2019.
- [10] G. SCROFANI, J. SOLA-PIKABEA, G. SAAVEDRA, A. LLAVADOR, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, J. BARREIRO, J. GARCÍA-SUCERQUIA y M. MARTÍNEZ-CORRAL, «Microscopía integral de campo lejano», en *XII Reunión Nacional de Óptica*, Castellón (España) 2018.
- [11] J. SOLA-PIKABEA, A. DOBLAS, G. SAAVEDRA, M. MARTÍNEZ-CORRAL y C. PREZA, «Diseño óptimo de un sistema de iluminación estructurada incoherente con frecuencia variable», en *XII Reunión Nacional de Óptica*, Castellón (España) 2018.
- [12] J. SOLA-PIKABEA, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, A. GARCÍA-RIUS, G. SAAVEDRA, J. GARCÍA-SUCERQUIA y M. MARTÍNEZ-CORRAL, «Microscopía por iluminación estructurada con determina-

ción iterativa de desplazamiento de fase», en *XII Reunión Nacional de Óptica*, Castellón (España) 2018.

- [13] M. MARTÍNEZ-CORRAL, J. BARREIRO, A. LLAVADOR, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, J. SOLA-PIKABEA, G. SCROFANI, G. SAAVEDRA y B. JAVIDI, «Three-dimensional imaging through Fourier-domain Integral Microscopy», en *Focus on Microscopy*, Burdeos (Francia) 2017.
- [14] J. SOLA-PIKABEA, G. SCROFANI, A. LLAVADOR, J. BARREIRO, M. MARTÍNEZ-CORRAL y G. SAAVEDRA, «Dark-Field Imaging with an Integral Microscope», en *Focus on Microscopy*, Burdeos (Francia) 2017.
- [15] M. MARTÍNEZ-CORRAL, J. BARREIRO, A. LLAVADOR, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, J. SOLA-PIKABEA, G. SCROFANI, G. SAAVEDRA y B. JAVIDI, «Three-dimensional imaging through Fourier-domain Integral Microscopy», en *III International Conference on Applications in Optics and Photonics*, Faro (Portugal) 2017.
- [16] M. MARTÍNEZ-CORRAL, A. LLAVADOR, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, J. SOLA-PIKABEA y G. SAAVEDRA, «3D integral microscopy with improved resolution and depth of field», en *OSA 3D Image Acquisition and Display: Technology, Perception and Applications*, Heidelberg (Alemania) 2016.
- [17] E. SÁNCHEZ-ORTIGA, A. DOBLAS, J. SOLA-PIKABEA, G. SAAVEDRA, P. HSIEH, Y. HUANG y M. MARTÍNEZ-CORRAL, «Non-mechanical axial scanning in wide-field microscopy by means of a liquid lens», en *Focus on Microscopy*, Gotinga (Alemania) 2015.
- [18] A. DORADO, J. SOLA-PIKABEA, G. SAAVEDRA y M. MARTÍNEZ-CORRAL, «Computation of travelling frames from single integral-imaging capture», en *International OSA Network of Students Meeting*, Valencia (España) 2015.
- [19] J. SOLA-PIKABEA, G. SAAVEDRA, M. MARTÍNEZ-CORRAL y E. SÁNCHEZ-ORTIGA, «Three-dimensional image and reconstruction with monocular camera dynamically apodized with a LCD», en *International OSA Network of Students Meeting*, Valencia (España) 2015, BEST POSTER PRESENTATION AWARD.

- [20] S. HONG, J. SOLA-PIKABEA, G. SAAVEDRA y M. MARTÍNEZ-CORRAL, «3D Integral Imaging display using Hole-Filtered depth information», en *International OSA Network of Students Meeting*, Valencia (España) 2015.

PATENTES

- [1] M. MARTÍNEZ-CORRAL, G. SAAVEDRA, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, A. LLAVADOR y J. SOLA-PIKABEA, «Microscopio integral, usos del mismo y sistema de microscopía integral», *Patente Española P201531938* (2015) .
- [2] H. FRUCTUOSO-NAVARRO, M. MARTÍNEZ-CORRAL, G. SAAVEDRA, J. SOLA-PIKABEA, J. BARREIRO-HERVÁS y S. HONG, «Method and device for depth detection using stereo images», *Patente Internacional PCT/EP2016/075714* (2016) .
- [3] M. MARTÍNEZ-CORRAL, G. SAAVEDRA, J. SOLA-PIKABEA y E. SÁNCHEZ-ORTIGA, «Microscopio óptico por fluorescencia y método para la obtención de imágenes de microscopía óptica por fluorescencia», *Patente Española P31769ES00-SOL* (2019) .

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Antecedentes	1
1.2	Motivación	3
1.3	Objetivos	6
2	MICROSCOPIA CONVENCIONAL	9
2.1	Introducción	9
2.2	Óptica ondulatoria	9
2.2.1	Sistema óptico focal	12
2.2.2	Sistema óptico afocal telecéntrico	13
2.3	Formación de imágenes	16
2.3.1	Sistemas formadores de imagen coherentes	17
2.3.2	Sistemas formadores de imagen incoherentes	19
2.4	Propiedades ópticas	20
2.4.1	Límite de resolución espacial	20
2.4.2	Capacidad de seccionado óptico	21
2.4.3	Funciones de transferencia	23
2.4.4	Tiempo de captura.	29
2.4.5	Profundidad de campo	30
3	MICROSCOPIA POR ILUMINACIÓN ESTRUCTURADA (SIM)	35
3.1	Introducción	35
3.2	Sistema de iluminación	36
3.3	Sistema de colección	40
3.4	Método de reconstrucción	42
3.4.1	Descomposición de las componentes	42
3.4.2	Reconstrucción de la información frecuencial	45
3.4.3	Aumento de resolución isótropo	49
4	ESTIMACIÓN DEL CORRIMIENTO DE FASE	51
4.1	Motivación	51
4.2	Análisis teórico	52
4.3	Simulación del proceso de captura y reconstrucción	60
4.3.1	Velocidad del algoritmo	65
4.3.2	Reconstrucción final	67
4.4	Estudio Experimental	71

4.5	Extensión a desplazamientos de fase asimétricos .	77
4.5.1	Análisis teórico	77
4.5.2	Simulación	81
4.5.3	Estudio Experimental	90
5	OPTIMIZACIÓN DEL CONTRASTE EN EL PATRÓN	93
5.1	Introducción	93
5.2	Campo y visibilidad en un sistema SIM coherente	94
5.3	Campo y visibilidad en un sistema SIM incoherente	101
5.4	Compromiso entre la visibilidad y el campo . . .	104
6	MICROSCOPIA POR ILUMINACIÓN ESTRUCTURADA ESCA- NEADA	109
6.1	Introducción	109
6.2	Análisis teórico	110
6.3	Simulación	115
6.4	Validación experimental	117
6.4.1	Montaje experimental	117
6.4.2	Resultados	119
7	CONCLUSIONES	125
	BIBLIOGRAFÍA	127

1

INTRODUCCIÓN

La inquietud del ser humano por el conocimiento de la naturaleza, de la física y, más concretamente de la óptica, dio lugar hace varios siglos a que éste se diera cuenta de que la luz que atraviesa una gota de agua sufre una desviación en su interior que da lugar a imágenes aumentadas del objeto del cual procede la luz. Se había descubierto la primera lente y con ello había empezado el camino de la microscopía moderna. Un camino que, sin solución de continuidad, sigue hoy día y que ha ido evolucionando desde sus inicios.

1.1 ANTECEDENTES

La microscopía, entendida como el conjunto de técnicas o métodos destinados a hacer visibles los objetos que, por su tamaño, están fuera del rango de resolución del ojo humano, apareció en las primeras décadas del siglo XVII. Hasta esta fecha los seres vivos más pequeños conocidos eran insectos diminutos y además, no se pensaba que pudieran existir organismos con vida de menor tamaño. En este momento los naturalistas podían describir con detalle organismos que, hasta ese momento, eran inobservables y los anatomistas podían descubrir estructuras, que por su tamaño, no eran visibles anteriormente [1].

La evolución de la microscopía va ligada al desarrollo de la tecnología. Así, primero apareció el microscopio *simple* [2], formado únicamente por una lente y, posteriormente, el microscopio *compuesto* [3] constituido por un acoplamiento de varias lentes, inventado en 1590 por el holandés Zacharias Jansen [4]. Hubo una evolución paulatina en la construcción de microscopios en la que se fueron mejorando las características de estos. En 1665,

Robert Hooke publicó *Micrographia* [5], uno de los libros más importantes en microscopía durante esa época y épocas posteriores.

La microscopía no dejaba de desarrollarse en gran medida por la evolución tecnológica de los microscopios. No obstante, las lentes que se utilizaban en estos microscopios eran imperfectas, de superficies irregulares. Entonces apareció Anton Van Leeuwenhoek también sobre mediados del siglo XVII. Leeuwenhoek usó lentes simples pero de dimensiones muy reducidas, lo que aumenta la apertura numérica del sistema óptico. Llegó a conseguir obtener aumentos de hasta 270 veces el tamaño real del objeto observado con buena resolución. Con estos microscopios consiguió observar por primera vez bacterias y protozoarios o *animálculos* como él los llamó entonces [6].

La microscopía seguía evolucionando y, en la segunda mitad del S. XIX Ernest Abbe haría su aparición para dejar una serie de resultados teóricos e invenciones de instrumentos en el campo de la óptica que aceleraron la evolución en este campo [7]. En 1868 inventó las lentes apocromáticas que eliminan la aberración cromática primaria y secundaria debidas a variaciones en el índice de refracción del material de la lente, efecto que producía una imagen coloreada en los bordes. Dos años más tarde desarrollaría una teoría, llamada relación de los senos, que establece las condiciones de un sistema óptico para generar imágenes libres de aberración esférica. Esto le llevaría a inventar el condensador de Abbe que permitía una iluminación más extensa de la muestra. Tras esto siguió aportando avances en este campo junto a la empresa creada por su amigo Carl Zeiss.

La evolución de la microscopía ha sido exponencial. De hecho en las últimas décadas ha cambiado tanto que en sus inicios los primeros microscopios tenían la función de observar muestras microscópicas con el ojo desnudo y a día de hoy son sistemas mucho más complejos formados por ordenadores, medios de captura de alta sensibilidad, láseres y mecanismos motorizados, entre una larga lista de innovaciones en función de su desempeño.

1.2 MOTIVACIÓN

Existen dos límites que nos impone la naturaleza ondulatoria de la luz y que no seremos capaces de superar con las técnicas proporcionadas por la microscopía convencional. La primera limitación que nos encontramos está en la resolución predicha por la difracción. En 1879, John William Strutt (Lord Rayleigh) realizó uno de los descubrimientos más importantes dentro del campo de la óptica: determinó la existencia de un límite máximo en la resolución que se podía obtener en la imagen capturada por un sistema óptico convencional. Esta resolución depende de las características del sistema óptico utilizado para la observación y de la longitud de onda de la luz empleada [8]. En sus estudios Lord Rayleigh determinó que las imágenes de dos estrellas que emitían en la misma región espectral estaban en *contacto* entre ellas, es decir estaban en el límite para poder afirmar la existencia de dos fuentes distintas, cuando la separación angular entre ellas era $\Theta = 1.22 \frac{\lambda}{D}$, siendo λ la longitud de onda de la luz y D el diámetro de apertura del objetivo del telescopio. Se establecía, por tanto una relación inversa entre la apertura de la lente que forma la imagen y la resolución *angular* del sistema. Para un microscopio fue Abbe quien estableció de modo similar su límite en resolución espacial, obteniendo que éste venía dado (al emplear una iluminación incoherente de la muestra) por [7]

$$\rho = \frac{\lambda}{2NA}, \quad (1.1)$$

donde $NA = n \sin \alpha$ representa la apertura numérica del objetivo del microscopio, siendo n el índice de refracción del medio entre el objetivo y la muestra y α la mitad del ángulo del cono de admisión de luz de dicho objetivo.

Gracias a los avances tecnológicos en la construcción de objetivos de microscopio [9] se consiguió alcanzar este límite impuesto por la naturaleza de la luz. Estos objetivos están contruidos con una combinación de lentes tal que, la apertura numérica efectiva en el espacio objeto de la muestra, alcanza valores próximos a 1 con objetivos diseñados para ser utilizados en aire y, algo superiores a 1 cuando hay un medio inmersión, en contacto entre

la lente y la muestra, de índice de refracción mayor al del aire. Dicho límite se refiere a sistemas convencionales pero en las últimas décadas se han desarrollado técnicas no convencionales que permiten sobrepasar estos límites. El estudio y el análisis de la resolución en algunas de las técnicas existentes y la innovación de otras en algunos casos, tras un proceso de estudio del comportamiento de los campos electromagnéticos en diferentes sistemas ópticos, es uno de los principales objetivos de este trabajo.

La otra limitación que nos presenta la naturaleza de la luz es la capacidad de seccionado óptico de un sistema de captura [10], es decir, la capacidad que tiene un sistema óptico para capturar la información que proviene de un plano de la muestra discriminando el resto de planos transversales ortogonales al eje óptico del sistema de captura. Esta cualidad es la que nos permite obtener la información tridimensional de la muestra. Los microscopios convencionales no poseen capacidad de seccionado óptico. Una de las razones de este hecho es que la tecnología existente hoy día nos proporciona sensores bidimensionales. Estos sensores detectan la intensidad de los fotones procedentes de la muestra independientemente del plano del que provengan, con lo que la información tridimensional de la muestra acaba entremezclándose en el sensor, perdiendo así la capacidad de reconstruir la muestra tridimensional. Además, se produce una pérdida de contraste del plano de foco debido a la luz procedente de planos desenfocados. Por todo esto, el estudio y la búsqueda de técnicas que posean la capacidad de obtener seccionado óptico en el proceso de captura de la muestra se convertirá en otro objetivo importante.

Aparte de las limitaciones puramente teóricas debidas a la difracción de la luz, en la práctica la velocidad de captura y visualización de la información en un sistema de microscopía es también una característica muy importante. Una alta velocidad en la captura de la información tridimensional de un objeto nos permite, por ejemplo, estudiar muestras biológicas en movimiento. Además, una velocidad elevada en la reproducción de esta información puede dar la posibilidad de realizar estudios biológicos en tiempo real o la reproducción de videos que realmente

reproduzcan imágenes tridimensionales de una muestra, entre otras aplicaciones.

Estas limitaciones han generado un interés evidente en la necesidad de encontrar otras técnicas microscópicas capaces de solventar estos inconvenientes. Son muchas las técnicas existentes hoy en día para resolver estos problemas. No obstante, cada una de ellas presenta sus ventajas e inconvenientes. Entre ellas, en este trabajo nos centraremos en una de ellas: la microscopía por iluminación estructurada (SIM del inglés *Structured Illumination Microscopy*) [11, 12], y una combinación de ésta con una técnica ya clásica de imagen 3D, la microscopía confocal de barrido (CLSM del inglés *Confocal Laser Scanning Microscopy*) [13-15].

Aunque en capítulos posteriores realizaremos una descripción detallada de las distintas técnicas, vamos a hacer una breve introducción a las características de estas técnicas de captura, procesado y visualización de objetos microscópicos tridimensionales.

Una de las técnicas comentadas es la SIM. Esta técnica es capaz de aumentar la resolución final de la imagen hasta el doble de lo que obtendríamos con un sistema convencional utilizando el mismo sistema formador de imagen compuesto por un objetivo de microscopio conjugado a infinito y una segunda lente conocida como lente de tubo que forma la imagen. Además, posee la capacidad de obtener seccionado óptico de la muestra. La captura de la información es bastante rápida pero necesita hacer 3 capturas de la muestra, por cada orientación y plano axial, cambiando la fase del patrón de iluminación periódicamente entre ellas. No obstante, para poder reproducir la información procedente del objeto es necesario un procesamiento digital de la información capturada.

La CLSM proporciona un ligero aumento en la resolución lateral aunque su principal ventaja con respecto a los sistemas convencionales es la capacidad de seccionado óptico. Esta técnica requiere del barrido tridimensional de la muestra con un haz focalizado, lo que repercute en el tiempo de captura con respecto a otros sistemas. Por ello el inconveniente en esta técnica radica en el tiempo de captura principalmente. La necesidad de incrementar el tiempo de captura hace que esta técnica no sea útil para la

observación de muestras biológicas en movimiento. Utilizaremos algunos de los principios físicos que rigen esta técnica para crear una técnica de microscopía totalmente innovadora.

1.3 OBJETIVOS

Son muy diversos los objetivos en esta tesis, pero se pueden resumir diciendo que en este trabajo se han estudiado las propiedades ópticas de distintos sistemas de microscopía manipulando convenientemente el modo en el que se ilumina la muestra o en el que se registra la luz que parte de la misma. Este amplio estudio ha llevado al conocimiento necesario para realizar modificaciones de algunas técnicas en algún caso, o la invención de nuevas técnicas en otros casos, para la mejora de estas propiedades ópticas.

Para ello este trabajo se ha dividido de la siguiente manera: en el primer capítulo aparece una introducción para contextualizar al lector. En el segundo capítulo presentaremos la microscopía convencional, realizando tanto los desarrollos teóricos como las demostraciones necesarias para la fácil y rápida comprensión de las principales características ópticas de este tipo de sistemas microscópicos. A continuación, desarrollaremos el bloque dedicado a la SIM. En él, primero mostraremos los detalles conceptuales de este tipo de sistemas. El cambio de fase en el patrón de iluminación en esta técnica no siempre es algo trivial, por lo que en este trabajo desarrollaremos una forma para la detección precisa de la fase del patrón de iluminación. Otro de los factores condicionantes que se presentan cuando utilizamos la técnica SIM es la relevancia que tiene en ella la iluminación. En esta técnica es muy importante que la iluminación se produzca a través de un patrón periódico. En condiciones normales este patrón de iluminación puede poseer una estructura aperiódica debido a imperfecciones en los elementos ópticos tanto en el sistema de iluminación como en el de colección. Por este motivo, abordaremos una propuesta de solución a este problema. Además, un análisis y estudio exhaustivo dio lugar a la creación de una nueva técnica de mi-

croscopía que sobrepasa las técnicas existentes en términos de resolución, seccionado óptico y tiempo de procesamiento digital de la información, que combina la arquitectura de la CLSM y la estrategia de la SIM. También presentaremos esta técnica con todo detalle matemático y pruebas de su validez tanto mediante simulaciones como a través de resultados experimentales.

2 | MICROSCOPIA CONVENCIONAL

2.1 INTRODUCCIÓN

La *microscopía óptica* es el conjunto de técnicas que proporciona información de objetos a escala microscópica por medio del empleo de elementos ópticos como lentes, diafragmas, filtros y un largo etcetera. Sin embargo, la microscopía va más allá de esta simple definición. Al fin y al cabo, dentro de la óptica, utilizamos la luz como medio de información para poder conocer tanto las características intrínsecas del objeto (distintos índices de refracción de las sustancias que conforman el objeto, intensidad de la luz procedente de cada punto del objeto,...), como extrínsecas al objeto (situación tridimensional espacial del objeto). Es decir, la luz nos proporciona la información necesaria del objeto a estudiar, pero para obtenerla tenemos que ser capaces de registrar de forma adecuada esta información procedente de los campos electromagnéticos emitidos, reflejados o transmitidos por la muestra.

Para estudiar las técnicas de microscopía capaces de mejorar las propiedades ópticas de la microscopía convencional, primero tenemos que entender en profundidad las características de los sistemas de microscopía convencional y los motivos de sus limitaciones en las propiedades ópticas alcanzables. Para lograr este fin tenemos que empezar desarrollando conceptos simples que desembocarán en conceptos, o incluso teorías, de mayor complejidad.

2.2 ÓPTICA ONDULATORIA

De aquí en adelante se considerará el efecto de la difracción empleando la aproximación escalar de los campos electromagnéticos,

es decir, ignoraremos el carácter vectorial de las distribuciones de amplitud de los campos [16]. Adicionalmente, consideraremos la aproximación paraxial en la propagación de la luz debido a que la propagación de estos campos se produce para ángulos pequeños (alrededor de 5°) respecto del eje óptico del sistema [17]. En la aproximación paraxial tendremos en cuenta la velocidad de oscilación de cada uno de los términos a la hora de cortar el polinomio tras el desarrollo en serie de Taylor. Así, por ejemplo, la amplitud compleja $E(\mathbf{r})$ de una onda esférica monocromática con foco en el origen de coordenadas y longitud de onda λ la expresaremos como

$$E(\mathbf{r}) = \frac{E_0}{|\mathbf{r}|} e^{i\frac{2\pi}{\lambda}|\mathbf{r}|} = \frac{E_0}{\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}} e^{i\frac{2\pi}{\lambda}\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}}, \quad (2.1)$$

donde $\mathbf{r} = (x, y, z)$ es el vector de posición del punto de observación. El tratamiento paraxial pasa por aproximar el resultado anterior, para puntos de observación cercanos al eje óptico y no muy cercanos al foco de la onda, es decir, para $x^2 + y^2 \ll z^2$, como,

$$E(\mathbf{r}) \approx \frac{E_0}{z} e^{ikz} e^{i\frac{k}{2z}(x^2 + y^2)}. \quad (2.2)$$

siendo $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ el número de onda de la radiación, y donde hemos considerado una aproximación a orden cero para el denominador, cuyo significado está directamente relacionado con la amplitud del campo, y a primer orden en el argumento de la exponencial, la cual está vinculada con la oscilación de la fase, cuya frecuencia de oscilación es mucho mayor a la de la amplitud.

Los objetos de estudio de este trabajo son los dispositivos de formación de imágenes de objetos 3D. Los sistemas de formación de imágenes son arquitecturas ópticas lineales en la amplitud compleja del campo luminoso, de modo que si partimos de una distribución $o(\mathbf{x}_0, z_0)$ en el espacio objeto, la respuesta final en el espacio imagen se debe poder expresar como

$$o'(\mathbf{x}', z') = \iiint_{-\infty}^{+\infty} o(\mathbf{x}_0, z_0) \bar{h}(\mathbf{x}', z'; \mathbf{x}_0, z_0) d^2\mathbf{x}_0 dz_0, \quad (2.3)$$

donde $\bar{h}(\mathbf{x}', z'; \mathbf{x}_0, z_0)$ es la respuesta 3D del sistema en las coordenadas (\mathbf{x}', z') del espacio imagen generada por un punto emisor

(de amplitud unidad) con coordenadas (\mathbf{x}_0, z_0) en el espacio objeto. De ahora en adelante, en las parejas (\mathbf{x}, z) , $\mathbf{x} = (x, y)$ representará la posición en el plano transversal al eje óptico que contiene el punto analizado, mientras que z representará la localización axial de dicho plano. A la función \bar{h} se la denomina respuesta unidad, respuesta impulsional o función de Green, aunque emplearemos de ahora en adelante el nombre más habitual en los sistemas de formación de imágenes: función de esparcimiento de un punto (PSF, de sus siglas en inglés *point spread function*). La linealidad no es la única condición que ha de cumplir un sistema de formación de imágenes ideal. El otro requerimiento necesario es su invariancia a desplazamientos, que requiere que un desplazamiento del punto objeto genere únicamente un desplazamiento proporcional de la PSF del sistema. Matemáticamente, para que un sistema sea invariante a desplazamientos se ha de cumplir

$$\forall (\mathbf{x}_0, z_0) \in \mathbb{R}^3, \exists ! K_T, K_A \in \mathbb{R} / \bar{h}(\mathbf{x}', z'; \mathbf{x}_0, z_0) = \bar{h}(\mathbf{x}' - K_T \mathbf{x}_0, z' - K_A z_0; \mathbf{0}, 0). \quad (2.4)$$

Cuando esto ocurre, la Ec. 2.3 se transforma en un convolución 3D (\otimes_3), de modo que se puede expresar

$$o'(\mathbf{x}', z') = \frac{1}{K_T^2 K_A} o\left(\frac{\mathbf{x}'}{K_T}, \frac{z'}{K_A}\right) \otimes_3 h(\mathbf{x}', z'), \quad (2.5)$$

donde $h(\mathbf{x}', z') = \bar{h}(\mathbf{x}', z'; \mathbf{0}, 0)$ representa la PSF para un punto objeto situado en el origen de coordenadas, es decir, para $(\mathbf{x}_0, z_0) = (\mathbf{0}, 0)$.

A continuación estudiaremos cómo un sistema óptico focal (es decir, cuyos focos y planos principales se encuentran a distancia finita del sistema) no puede considerarse un sistema de formación de imágenes de objetos 3D. Posteriormente demostraremos que un sistema afocal telecéntrico sí que cumple esta condición, y que por ello son el tipo de sistemas que se emplean para capturar imágenes de muestras 3D. Es importante indicar que, siempre que no sean relevantes, se obviarán factores constantes en las expresiones matemáticas que iremos obteniendo en lo que queda de este trabajo.

2.2.1 Sistema óptico focal

Consideremos, pues, un sistema óptico focal como el de la Fig.2.1, en el que los puntos principales y focales se han representado por H y F en el espacio objeto, y por H' y F' en el espacio imagen, mientras que el punto axial de la pupila de salida del sistema se ha representado por P' . El origen de coordenadas en el espacio objeto e imagen se fijará en F y F' , respectivamente, por simplicidad.

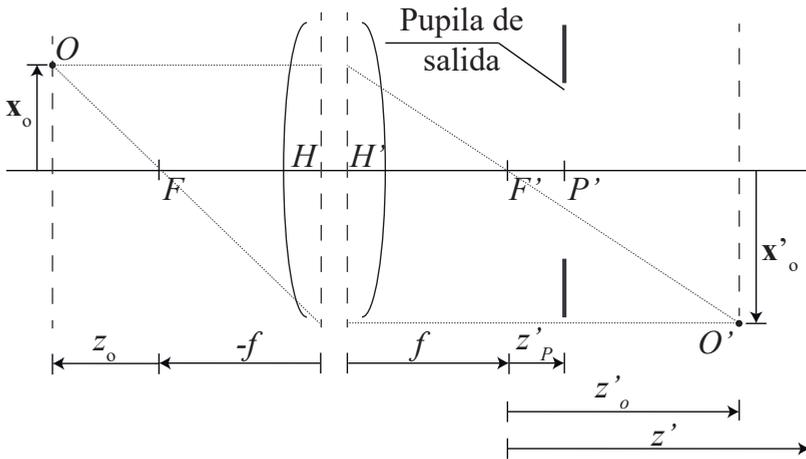


Figura 2.1: Esquema de un sistema óptico de focal imagen f iluminado por la radiación de un punto O . El punto O' representa la imagen de O de acuerdo con la Óptica Geométrica.

Sea un punto objeto O de coordenadas (x_0, z_0) que emite radiación monocromática de longitud de onda λ . Mediante la consideración de estar trabajando bajo condiciones paraxiales, es sencillo probar que sobre la pupila de salida del sistema se obtiene una distribución de amplitudes compleja del campo que corresponde a una onda esférica con foco en el punto imagen (de acuerdo con las leyes de la Óptica Geométrica) O' , cuyas coordenadas en el espacio imagen vendrán dadas por

$$\begin{aligned} x'_0 &= M_0 x_0, \\ z'_0 &= -\frac{f^2}{z_0}, \end{aligned} \quad (2.6)$$

siendo f la distancia focal imagen del sistema y el aumento lateral $M_0 = f/z_0$, como se deduce de las ecuaciones de conjugación de Newton [18]. Es sencillo demostrar que además de esta onda esférica aparece un factor de fase relacionado con la posición del punto objeto, de modo que, tras la pupila de salida del sistema, la distribución de amplitudes vendrá dada por

$$U'(\mathbf{x}'_p, z'_p; \mathbf{x}_0, z_0) = M_0 e^{i \frac{k(M_0-1)}{2(z_0-f)} |\mathbf{x}_0|^2} e^{i \frac{k}{2(z'_p-z_0)} |\mathbf{x}'_p - \mathbf{x}'_0|^2} \frac{1}{z'_p - z_0} p'(\mathbf{x}'_p), \quad (2.7)$$

donde z'_p representa la coordenada axial de la pupila de salida, siendo $p'(\mathbf{x}'_p)$ su transmitancia en amplitud y $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ el número de onda de la radiación. Finalmente, para determinar la PSF en el caso no telecéntrico, \bar{h}_{NT} , en una posición axial cualquiera z' aplicaremos el operador paraxial de la propagación libre [16], obteniendo

$$\begin{aligned} \bar{h}_{NT}(\mathbf{x}', z'; \mathbf{x}_0, z_0) &= U'(\mathbf{x}', z'_p; \mathbf{x}_0, z_0) \otimes_2 \frac{e^{ik(z'-z'_p)}}{(z'-z'_p)} e^{\frac{ik}{2(z'-z'_p)} |\mathbf{x}'|^2} = \\ &= M_0 e^{i \frac{k(M_0-1)}{2(z_0-f)} |\mathbf{x}_0|^2} e^{i \frac{k}{2(z'_p+f^2/z_0)} |\mathbf{x}' - f\mathbf{x}_0/z_0|^2} \frac{1}{z'_p + f^2/z_0} p'(\mathbf{x}') \otimes_2 \frac{e^{ik(z'-z'_p)}}{(z'-z'_p)} e^{\frac{ik}{2(z'-z'_p)} |\mathbf{x}'|^2}, \quad (2.8) \end{aligned}$$

siendo \otimes_2 la operación de convolución 2D en las coordenadas transversales, y donde se han sustituido las coordenadas en el espacio imagen del punto emisor de acuerdo con las Ecs.2.6. La dependencia de esta PSF con las coordenadas (\mathbf{x}_0, z_0) del punto fuente deja claro que no es posible cumplir la condición 2.4, por lo que estos sistemas focales no serán invariantes a desplazamientos 3D y, por tanto, inadecuados para obtener imágenes de muestras no planas.

2.2.2 Sistema óptico afocal telecéntrico

Consideremos ahora un sistema afocal telecéntrico, es decir, un sistema compuesto, en su configuración más simple, por dos subsistemas focales dispuestos de modo que el foco imagen del primero coincide con el foco objeto del segundo y en el que el diafragma de apertura se encuentra situado sobre este plano focal

común. En un microscopio óptico típico, el primer subsistema se corresponderá con un objetivo de microscopio (L_{ob}) corregido al infinito, es decir, que en su disposición óptima una muestra plana se coloca en su plano focal objeto y su imagen se forma en el infinito. El segundo subsistema, conocido como lente de tubo (L_T), forma la imagen de la muestra 2D en su plano focal imagen.

Supongamos ahora que tenemos un punto emisor en el espacio objeto del primer subsistema, tal como se puede apreciar en la Fig. 2.2. En este caso, por comodidad, el origen de coordenadas en el espacio objeto se tomará en el foco objeto del primer subsistema, mientras que en el espacio imagen se fijará en el foco imagen del segundo subsistema. En el espacio intermedio, se tomará como origen el foco común de los dos subsistemas. Consideraremos, como en el apartado anterior, que las coordenadas del punto objeto son (\mathbf{x}_0, z_0) . El sistema completo generará una distribución de amplitudes en el espacio imagen del segundo subsistema que definirá la PSF del sistema telecéntrico, $\tilde{h}_T(\mathbf{x}', z'; \mathbf{x}_0, z_0)$. Para obtener la distribución de intensidades en el espacio imagen haremos un recorrido paso a paso por el camino que seguirá esta distribución de amplitudes desde que parte del punto fuente. Para empezar, siguiendo el razonamiento ya empleado en la sección anterior, el campo generado sobre el plano focal imagen del primer subsistema, en el que se sitúa el diafragma de apertura, vendrá generado por la amplitud correspondiente a una onda esférica proveniente del punto imagen (de acuerdo con las leyes de la Óptica Geométrica) O' a través del primer subsistema, es decir,

$$U'(\mathbf{x}_P, 0; \mathbf{x}_0, z_0) = M_0 e^{i \frac{k(M_0-1)}{2(z_0-f_{ob})} |\mathbf{x}_0|^2} e^{-i \frac{k}{2z'_0} |\mathbf{x}_P - \mathbf{x}'_0|^2} \frac{z'_0}{z'_0} p(\mathbf{x}_P), \quad (2.9)$$

donde $p(\mathbf{x}_P)$ representa la transmitancia en amplitud del diafragma de apertura, y donde las coordenadas de O' , (\mathbf{x}'_0, z'_0) se obtienen a través de las Ecs. 2.6 sustituyendo f por la focal del primer subsistema, f_{ob} .

Por otro lado, se puede demostrar que dada una distribución compleja en el foco objeto de un sistema, la propagación de este

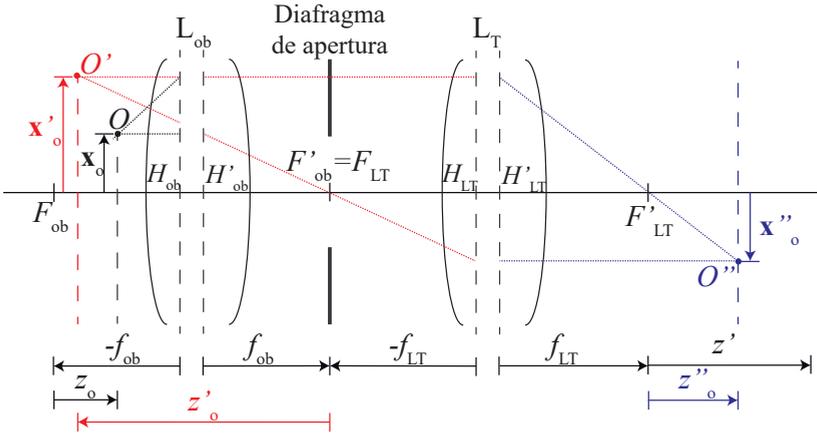


Figura 2.2: Esquema de un sistema óptico afocal telecéntrico, constituido por el acoplamiento confocal de dos subsistemas focales L_{ob} y L_T , iluminado por la radiación de un punto O . El punto O' representa la imagen de O a través de L_{ob} de acuerdo con la Óptica Geométrica. Análogamente, O'' denota la imagen de O' a través de L_T .

campo hasta el foco imagen de éste se puede expresar matemáticamente simplemente realizando la transformada de Fourier escalada al campo inicial [16]. Teniendo esto en consideración, podemos escribir el campo sobre el plano focal imagen del segundo subsistema como,

$$\begin{aligned}
 U''(\mathbf{x}', 0; \mathbf{x}_0, z_0) &= \tilde{U}'\left(\frac{\mathbf{x}'}{\lambda f_{LT}}, 0; \mathbf{x}_0, z_0\right) = \\
 &= e^{i\frac{k(M_0-1)}{2(z_0-f_{ob})}|\mathbf{x}_0|^2} e^{i\frac{k}{2z'_0}|\mathbf{x}'_0|^2} e^{-i\frac{k}{2z''_0}|\mathbf{x}'-\mathbf{x}''_0|^2} \otimes_2 \tilde{p}\left(\frac{\mathbf{x}'}{\lambda f_{LT}}\right), \quad (2.10)
 \end{aligned}$$

siendo f_{LT} la distancia focal del segundo subsistema y donde $\tilde{f}(\mathbf{u}, z)$ representa la transformada de Fourier de la función $f(\mathbf{x}, z)$ respecto de las coordenadas transversales $\mathbf{x} = (x, y)$. Los valores (\mathbf{x}''_0, z''_0) corresponden a las coordenadas de la imagen geométrica del punto fuente en el espacio imagen final. Aplicando las ecuaciones de conjugación de Newton sobre las coordenadas en el espacio intermedio (\mathbf{x}''_0, z''_0) y relacionando éstas del mismo

modo con las coordenadas originales del punto fuente, es sencillo obtener que en este caso

$$\begin{aligned} \mathbf{x}_0'' &= M\mathbf{x}_0, \\ z_0'' &= M^2 z_0, \end{aligned} \quad (2.11)$$

donde $M = -f_{LT}/f_{ob}$. Nótese que este valor es constante independientemente del punto O considerado en el espacio objeto. Considerando este resultado y usando también que $M_0 = f_{ob}/z_0$ es directo comprobar que los dos primeros factores de fase de la Ec. 2.10 se cancelan mutuamente. Así,

$$U''(\mathbf{x}', 0; \mathbf{x}_0, z_0) = e^{-i\frac{k}{2z_0''}|\mathbf{x}' - \mathbf{x}_0''|^2} \otimes_2 \tilde{p}\left(\frac{\mathbf{x}'}{\lambda f_{LT}}\right). \quad (2.12)$$

Finalmente, si propagamos libremente esta distribución de amplitudes una distancia genérica z' , obtendremos la PSF del sistema telecéntrico. Actuando como en el apartado anterior,

$$\begin{aligned} \bar{h}_T(\mathbf{x}', z'; \mathbf{x}_0, z_0) &= U''(\mathbf{x}', 0; \mathbf{x}_0, z_0) \otimes_2 \frac{e^{ikz'}}{z'} e^{\frac{ik}{2z'}|\mathbf{x}'|^2} = \\ &= \frac{e^{i\frac{k}{2(z' - M^2 z_0)}|\mathbf{x}' - M\mathbf{x}_0|^2}}{(z' - M^2 z_0)} \otimes_2 \tilde{p}\left(\frac{\mathbf{x}'}{\lambda f_{LT}}\right), \end{aligned} \quad (2.13)$$

donde se han empleado las Ecs. 2.11. A partir de este resultado, es evidente que los sistemas afocales-telecéntricos tienen una PSF que cumple la condición 2.4, con $K_T = M$ y $K_A = M^2$. Así pues, se trata de sistemas formadores de imágenes adecuados para registrar la estructura de objetos 3D, tal y como se comentó anteriormente. Por este motivo a lo largo de todo este trabajo, siempre que deseemos estudiar sistemas ópticos que generen la imagen de distintos planos axiales del espacio objeto, haremos uso de sistemas afocales-telecéntricos.

2.3 FORMACIÓN DE IMÁGENES

Existen dos escenarios muy diferentes cuando hablamos de formación de imágenes en términos de la respuesta de la muestra

a la iluminación. Un primer caso se da cuando iluminamos la muestra coherentemente y ésta reacciona transmitiendo o reflejando la luz. Cuando recogemos la información tendremos la superposición coherente de las imágenes de cada uno de los puntos de la muestra en el espacio imagen.

El segundo caso que nos podemos encontrar se da cuando se ilumina coherentemente la muestra y la posterior respuesta de ésta se produce de forma incoherente (por ejemplo por medio de emisores fluorescentes con los que se haya tintado la muestra o cuando la iluminación de la muestra es incoherente). Esta respuesta incoherente de la muestra a la iluminación se traduce en una distribución de irradiancia en el espacio imagen dada por la superposición incoherente de la distribución de intensidades generada por cada uno de los puntos emisores del objeto. Esta diferencia hace que el proceso de formación de imágenes en ambos sistemas sean distintos con diferencias sustanciales como veremos a continuación.

2.3.1 Sistemas formadores de imagen coherentes

En el caso en el que se ilumine un objeto con una iluminación coherente¹ y, este objeto, transmita o refleje esa luz, y se recoja mediante un sistema afocal-telecentrico, como el descrito anteriormente, en el espacio imagen se tiene la superposición coherente de las imágenes de cada uno de los puntos del objeto que han sido atravesados (o reflejados) por el haz de iluminación. Podemos considerar a cada uno de los puntos que componen el objeto como puntos emisores secundarios del frente de ondas según el principio de Huygens [16]. De este modo la distribución compleja de amplitudes en el espacio imagen, cuando se considera el caso

¹ Se dice que una iluminación se considera coherente cuando proviene de un único punto y que conserva una relación de fase constante. Es decir, cuando conocido el valor del campo electromagnético en un punto es posible predecirlo en cualquier otro.

en el que se ilumina un objeto de reflectancia o transmitancia en amplitud $o(\mathbf{x}, z)$ coherentemente, vendrá dada por

$$o'(\mathbf{x}', z') = \iiint_{-\infty}^{+\infty} h(\mathbf{x}' - M\mathbf{x}_0, z' - M^2z_0) o(\mathbf{x}_0, z_0) d^2x_0 dz_0. \quad (2.14)$$

Podemos identificar la convolución existente en la ecuación anterior para escribir en las coordenadas del espacio imagen

$$o'(\mathbf{x}', z') = \frac{1}{M^4} o\left(\frac{\mathbf{x}'}{M}, \frac{z'}{M^2}\right) \otimes_3 h(\mathbf{x}', z'). \quad (2.15)$$

En esta última expresión podemos ver que el hecho de que la integral la podamos escribir como una convolución tridimensional significa que estos sistemas son sistemas lineales e invariantes a desplazamientos 3D.

Acabamos de determinar la distribución de amplitudes en el espacio imagen generada por el sistema óptico, pero los sensores en los sistemas formadores de imágenes típicamente registran la intensidad de las ondas electromagnéticas. Por esto, una vez capturada la información lo que tendremos será lo siguiente,

$$I'(\mathbf{x}', z') = |o'(\mathbf{x}', z')|^2 = \left| \frac{1}{M^4} o\left(\frac{\mathbf{x}'}{M}, \frac{z'}{M^2}\right) \otimes_3 h(\mathbf{x}', z') \right|^2. \quad (2.16)$$

Esta última expresión deduce la habilidad de estos sistemas para generar imágenes en sentido estricto, es decir, reproducen en el espacio imagen la distribución tridimensional de intensidades objeto reescalada, en la que cada punto se ve afectado de igual manera por la respuesta impulsional del sistema. Además, esta contribución se refiere a la distribución de amplitudes lo que generará un ruido de fase en la distribución de intensidades final debido a las interferencias producidas por esta superposición en la contribución de amplitudes en el espacio imagen.

2.3.2 Sistemas formadores de imagen incoherentes

Supongamos un sistema formador de imágenes incoherente, es decir, cada punto de la distribución de irradiancia objeto emite de forma independiente al resto de puntos. En la práctica, existen dos situaciones en las que se puede dar este supuesto:

1. Muestra tintada. Tras la iluminación del objeto mediante un haz monocromático, este absorbe un fotón de una longitud de onda y emite otro de longitud de onda mayor mediante un proceso denominado fluorescencia.
2. Muestra iluminada uniformemente. Al iluminar el objeto uniformemente empleando luz que provenga de una fuente incoherente, llamada iluminación de campo claro, este reflejará la luz generando una distribución de irradiancia incoherente.

Para expresar la distribución de intensidades en el espacio imagen debida a todos los puntos del objeto podemos seguir un razonamiento análogo al utilizado en la Ec. 2.14,

$$I'(\mathbf{x}', z') = \iint_{-\infty}^{+\infty} |h(\mathbf{x}' - M\mathbf{x}_0, z' - z_0)|^2 |o(\mathbf{x}_0, z_0)|^2 d^2\mathbf{x}_0 dz_0, \quad (2.17)$$

que podemos expresar en su forma de convolución como

$$I'(\mathbf{x}', z') = \frac{1}{M^4} \left| o \left(\frac{\mathbf{x}'}{M'}, \frac{z'}{M^2} \right) \right|^2 \otimes_3 |h(\mathbf{x}', z')|^2. \quad (2.18)$$

En el caso coherente teníamos la superposición en amplitud de la contribución de cada punto del objeto, lo cual generaba esa interferencia antes de calcular la intensidad. Ahora, en el caso incoherente tenemos la contribución de cada punto a la distribución final igual que antes, pero ahora esta superposición se produce en intensidad lo cual no genera ningún tipo de término adicional debido a interferencias.

Todas las técnicas que veamos en este trabajo estarán basadas en la respuesta incoherente de la muestra a la iluminación, es decir trabajaremos siempre con muestras fluorescentes que absorben los fotones en la iluminación y emiten bajo otra longitud de onda evitando ese ruido coherente.

2.4 PROPIEDADES ÓPTICAS

A continuación vamos a ver algunas de las propiedades ópticas y limitaciones que presentan los sistemas formadores de imágenes descritos anteriormente y que son la base de las técnicas de microscopía convencional.

2.4.1 Límite de resolución espacial

Se puede demostrar que, bajo el criterio de Rayleigh [19], la distancia mínima a la que dos puntos emisores de luz de igual irradiancia pueden estar separados en el plano focal objeto y seguir siendo distinguibles en el plano focal imagen viene dada por

$$\rho_x = 0,61 \frac{\lambda n}{NA}, \quad (2.19)$$

donde NA es la apertura numérica del sistema óptico, λ la longitud de onda de la luz y n el índice de refracción en el espacio objeto. También se puede determinar la resolución axial del sistema dada por,

$$\rho_z = 0,61 \frac{2\lambda n}{NA^2}. \quad (2.20)$$

Según el criterio de Rayleigh podemos ver claramente que un sistema óptico tendrá unas resoluciones lateral y axial máximas que dependen directamente de la apertura numérica del sistema óptico así como de la longitud de onda de la iluminación. La máxima apertura numérica de los objetivos de microscopio en aire es 1 y las longitudes de onda de la radiación utilizada en el visible también están limitadas a unos valores máximos alrededor

de los 500 nm. Es decir, es evidente que para incrementar las resoluciones sin modificar la λ ni la NA necesitamos recurrir a técnicas no convencionales.

2.4.2 Capacidad de seccionado óptico

Hasta ahora hemos analizado la capacidad teórica de formación de imágenes 3D de los sistemas ópticos. Sin embargo, aunque podemos generar estas distribuciones 3D en el espacio imagen no se dispone actualmente de un sistema de registro 3D que permita acceder simultáneamente a todos los puntos del espacio imagen. Los sistemas de registro de imagen actuales tienen una estructura esencialmente 2D y la captura de una distribución 3D de intensidad se realiza típicamente tras un proceso de barrido axial, capturando en cada paso una sección transversal de la imagen. Una característica muy importante en la formación de imágenes 3D es el contraste de las imágenes 2D proporcionadas por el sistema para distintos planos transversales, ya que la contribución de los planos desenfocados de la muestra sobre el plano conjugado con el plano del sensor genera un *ruido* que puede afectar de modo muy acusado a la imagen de la sección enfocada. Una manera de estudiar la contribución de cada plano desenfocado sobre el plano de foco consiste en evaluar la intensidad total distribuida en cada sección transversal de la PSF en irradiancia del sistema. A este parámetro lo denominaremos intensidad integrada y vendrá dado por

$$P(z) = \iint_{-\infty}^{+\infty} |h(\mathbf{x}, z)|^2 d^2\mathbf{x}. \quad (2.21)$$

Por otro lado, este parámetro puede estudiarse también analizando el contenido espacio-frecuencial de esta PSF, que más adelante analizaremos con detalle. Así, en el espacio recíproco de Fourier, tendremos la distribución de frecuencias de la PSF en irradiancia dada por

$$H(\mathbf{u}, w) = \iiint_{-\infty}^{+\infty} |h(\mathbf{x}, z)|^2 e^{-i2\pi\mathbf{u}\mathbf{x}} e^{-i2\pi w z} d^2\mathbf{x} dz, \quad (2.22)$$

donde $\mathbf{u} = (u, v)$ y w son las frecuencias laterales y axiales respectivamente. Si nos fijamos exclusivamente en las frecuencias axiales,

$$\begin{aligned} H(\mathbf{0}, w) &= \iiint_{-\infty}^{+\infty} |h(\mathbf{x}, z)|^2 e^{-i2\pi w z} d^2\mathbf{x} dz = \\ &= \int_{-\infty}^{+\infty} P(z) e^{-i2\pi w z} dz = \tilde{P}(w), \end{aligned} \quad (2.23)$$

o, recíprocamente,

$$P(z) = \tilde{H}(\mathbf{0}, -z). \quad (2.24)$$

Así pues, la transformada de Fourier del contenido de frecuencias espaciales *axiales* de la PSF en irradiancia establece el trasvase de energía entre los planos desenfocados y el plano de foco en los sistemas de captura de imágenes 3D. La aptitud para recoger la máxima proporción de la energía del campo luminoso del plano en foco frente a la de planos desenfocados se denomina capacidad de seccionado óptico. Nótese que cuanto más picada sea esta intensidad integrada en torno al plano de foco ($z = 0$) menor será este efecto de *solapamiento* de los planos desenfocados y, por tanto, mayor será el seccionado óptico proporcionado por el sistema. Por otro lado, a partir de la Ec. 2.24 se deduce que cuanto mayor sea la anchura de la función $H(\mathbf{0}, w)$ mayor será la capacidad de seccionado óptico del sistema considerado.

Ahora bien, en un sistema convencional las leyes de la física nos dicen, por conservación de la energía, que la potencia transportada sobre cada plano transversal de un punto objeto debe ser constante. Así que podemos escribir,

$$P_{conv}(z) = P. \quad (2.25)$$

o bien, en el dominio de Fourier,

$$H_{conv}(\mathbf{0}, w) = P \delta(w). \quad (2.26)$$

Así pues, la anchura de la función $H_{conv}(\mathbf{0}, w)$ es la mínima posible. Concluimos, por tanto, que los sistemas convencionales carecen completamente de seccionado óptico. Las técnicas que estudiaremos en esta tesis mejoran esta capacidad, imprescindible para poder realizar una reconstrucción adecuada de muestras 3D.

2.4.3 Funciones de transferencia

En el anterior apartado hemos analizado el contenido de frecuencias espaciales de la PSF en el espacio imagen pero únicamente en la dirección axial. El estudio de la forma de la transformada de Fourier 3D de la PSF es una manera alternativa de analizar el efecto del sistema de formación de imágenes sobre la estructura de las imágenes 3D. Para entender esta aproximación, partiremos de las Ecs. 2.14 y 2.18, que representan la relación entre las distribuciones del campo en el espacio objeto e imagen a través de convoluciones con la correspondiente PSF. En primer lugar, cuando el sistema de formación de imágenes funciona con radiación coherente, la Ec. 2.14 conduce, tras una transformación de Fourier, al resultado

$$\tilde{\delta}'(\mathbf{u}, w) = \tilde{\delta}(M\mathbf{u}, M^2w)H_c(\mathbf{u}, w), \quad (2.27)$$

donde $H_c(\mathbf{u}, w) = \tilde{h}(\mathbf{u}, w)$. Así, el contenido frecuencial de la distribución 3D de amplitudes en el espacio imagen es una versión escalada del contenido frecuencial de la amplitud del objeto multiplicada por una función de transferencia H_c , que es la transformada de Fourier de la PSF en amplitud del sistema. A esta función se la denomina función de transferencia coherente (CTF, del inglés *coherent transfer function*). Su estudio permite determinar cómo se modifica cada una de las frecuencias espaciales de la amplitud del objeto para generar la amplitud de la imagen. Por otro lado, para sistemas de formación de imágenes incoherentes, la Ec. 2.18 conduce a un resultado similar pero para las distribuciones 3D de intensidad, es decir

$$\tilde{I}'(\mathbf{u}, w) = \tilde{I}(M\mathbf{u}, M^2w)H(\mathbf{u}, w), \quad (2.28)$$

donde $H(\mathbf{u}, w)$ es en este caso la transformada de Fourier de la PSF en intensidad, $|h(\mathbf{x}, z)|^2$. Para estos sistemas, la función de transferencia entre el contenido frecuencial de la distribución 3D de intensidades en el espacio objeto y el espacio imagen H , se la denomina función de transferencia óptica (OTF, del inglés *optical transfer function*). Estrictamente, la definición de la OTF incluye un factor de normalización que obviaremos aquí por simplicidad.

Desde este punto de vista, es interesante definir la resolución de un sistema óptico a partir de la extensión del soporte de la función de transferencia, a la que llamaremos ancho de banda frecuencial. Nótese que la determinación de la resolución de un sistema en el espacio de Fourier no depende de la muestra considerada si no que depende únicamente del sistema óptico. A continuación presentaremos algunos resultados de estas funciones de transferencia asociadas a sistemas con diafragma de apertura con soporte circular, que es el más común en microscopía.

2.4.3.1 *Función de transferencia coherente de sistemas con simetría de revolución*

Para obtener la forma de la CTF en este tipo de sistemas, recordaremos la definición de la PSF a partir de la transmitancia $p(\mathbf{x}_p)$ de su diafragma de apertura, considerando que éste estará limitado por un soporte circular centrado en el eje de radio r_p . Así, realizamos la transformada de Fourier de dicha respuesta impulsional para obtener

$$\bar{H}_c(\bar{\mathbf{u}}, \bar{w}) = \iint_{-\infty}^{+\infty} \bar{h}(\bar{\mathbf{x}}, \bar{z}) e^{-i2\pi\bar{\mathbf{u}}\bar{\mathbf{x}}} e^{-i2\pi\bar{w}\bar{z}} d^2\bar{\mathbf{x}} d\bar{z}, \quad (2.29)$$

donde hemos introducido las variables normalizadas, para dar generalidad al resultado, de la siguiente manera

$$\begin{aligned} \bar{\mathbf{u}} &= \frac{\lambda f}{r_p} \mathbf{u}, & \bar{w} &= \frac{\lambda f^2}{r_p^2} w, \\ \bar{\mathbf{x}} &= \frac{r_p}{\lambda f} \mathbf{x}, & \bar{z} &= \frac{r_p^2}{\lambda f^2} z, \end{aligned} \quad (2.30)$$

y donde por simplicidad de notación hemos expresado $f = f_{LT}$. Utilizando este cambio de variables podemos escribir la respuesta impulsional del sistema de la siguiente manera,

$$\bar{h}(\bar{\mathbf{x}}, \bar{z}) = i\lambda r_p^2 e^{i2\pi\bar{z}\bar{w}_0} \iint_{|\bar{\mathbf{x}}_p| \leq 1} \bar{p}(\bar{\mathbf{x}}_p) e^{-i2\pi\bar{\mathbf{x}}_p\bar{\mathbf{x}}} e^{-i\pi\bar{z}|\bar{\mathbf{x}}_p|^2} d^2\bar{\mathbf{x}}_p, \quad (2.31)$$

con $w_0 = 1/\lambda$. Introduciendo esta última expresión en la Ec. 2.29 y realizando la integral pertinente [20], llegamos a

$$\bar{H}_c(\bar{\mathbf{u}}, \bar{w}) = \bar{p}(\bar{\mathbf{u}}) \delta \left(\bar{w} - \bar{w}_0 + \frac{1}{2} |\bar{\mathbf{u}}|^2 \right). \quad (2.32)$$

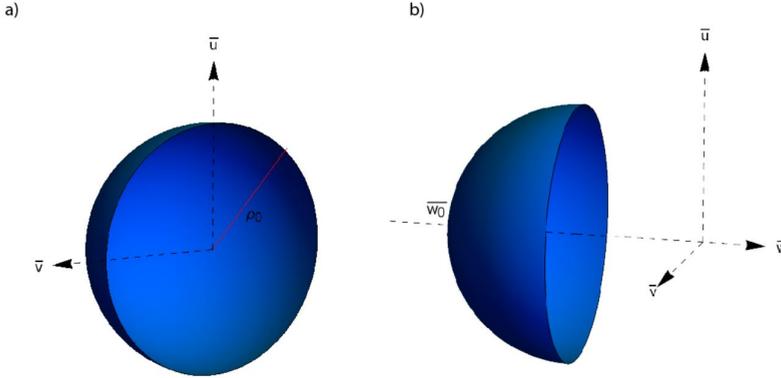


Figura 2.3: Representación de la función de transferencia coherente 3D en un microscopio convencional en la que aparece explícitamente la frecuencia de corte normalizada del sistema en la dirección transversal (ρ_0) y la ausencia de las frecuencias axiales (salvo para $\bar{w} = \bar{w}_0$).

En la Fig. 2.3 se puede ver una representación de la ecuación anterior en la que se aprecia que la CTF 3D es una superficie definida por un casquete parabólico sobre el que se proyecta transversalmente la forma de la función pupila del sistema óptico. Así que una vez conocida la función pupila de un sistema óptico podemos determinar directamente la resolución transversal de éste. De este modo, la resolución transversal de un sistema viene determinada por la máxima frecuencia espacial transmitida por la función pupila.

Deshaciendo la normalización de las coordenadas realizada al inicio, podemos determinar la frecuencia espacial de corte en un sistema óptico coherente con simetría de revolución en torno al eje óptico de la siguiente manera,

$$|\mathbf{u}_0^c| = \frac{r_p}{\lambda f} = \frac{NA}{\lambda}. \quad (2.33)$$

Podemos ver que obtenemos la misma dependencia con la NA y la λ que la predicha por el criterio de Rayleigh, teniendo en cuenta la relación inversa entre la resolución y la frecuencia de corte del sistema óptico.

En relación a la resolución axial, en la Fig. 2.3 podemos ver como la función de transferencia coherente presenta una delta de Dirac sobre el eje axial, lo que implica que los sistemas convencionales formadores de imagen coherentes no poseen capacidad de seccionado óptico de la muestra.

2.4.3.2 Función de transferencia incoherente de sistemas con simetría de revolución

De forma análoga al subapartado anterior, expresamos la OTF 3D de un sistema óptico incoherente como la transformada de Fourier de su respuesta impulsional

$$\tilde{H}(\bar{\mathbf{u}}, \bar{w}) = \iiint_{-\infty}^{+\infty} |\tilde{h}(\bar{\mathbf{x}}, \bar{z})|^2 e^{-i2\pi\bar{\mathbf{u}}\bar{\mathbf{x}}} e^{-i2\pi\bar{w}\bar{z}} d^2\bar{\mathbf{x}} d\bar{z}. \quad (2.34)$$

Podemos expresar la PSF como el producto de la respuesta impulsional coherente por su complejo conjugada

$$|h(\bar{\mathbf{x}}, \bar{z})|^2 = h(\bar{\mathbf{x}}, \bar{z})h(\bar{\mathbf{x}}, \bar{z})^*. \quad (2.35)$$

y, a partir del teorema de la convolución podemos expresar la OTF 3D como la autocorrelación ($*_3$) de la CTF 3D realizando la transformada de Fourier a la Ec. 2.35, que es lo que expresa la integral en Ec. 2.34

$$\tilde{H}(\bar{\mathbf{u}}, \bar{w}) = \tilde{H}_c(\bar{\mathbf{u}}, \bar{w}) \otimes_3 \tilde{H}_c(-\bar{\mathbf{u}}, -\bar{w})^* = \tilde{H}_c(\bar{\mathbf{u}}, \bar{w}) *_3 \tilde{H}_c(\bar{\mathbf{u}}, \bar{w}). \quad (2.36)$$

En la Fig. 2.4 podemos apreciar la autocorrelación de los dos casquetes parabólicos enfrentados expresados en la Ec. 2.36. Consideraremos a continuación el cálculo de la OTF 3D de un sistema con difragma de apertura cuya transmitancia tenga simetría de

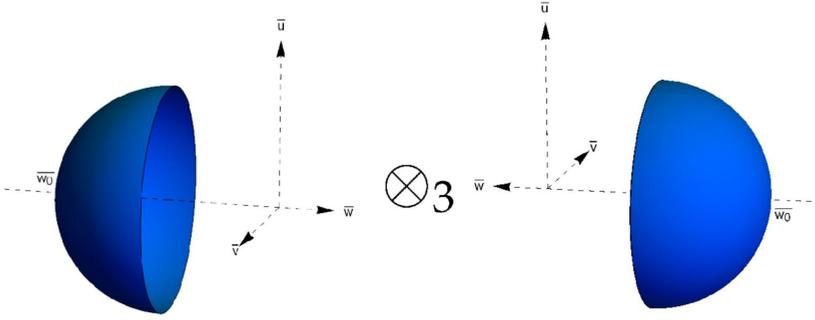


Figura 2.4: Representación gráfica del proceso de la convolución de la CTF 3D con su complejo-conjugada.

revolución. En ese caso, podemos expresar la autorrelación de la CTF de la siguiente manera [20],

$$\bar{H}(\bar{\mathbf{u}}, \bar{w}) = \int_{-\infty}^{+\infty} P(\bar{\rho}, \alpha) \delta(\bar{w} + \alpha \bar{\rho}) d\alpha, \quad (2.37)$$

donde hemos definido $\bar{\rho} = |\bar{\mathbf{u}}|$ y

$$P(\bar{\rho}, \alpha) = \int_{-\infty}^{+\infty} \bar{p}\left(\alpha - \frac{\bar{\rho}}{2}, \beta\right) \bar{p}^*\left(\alpha - \frac{\bar{\rho}}{2}, \beta\right) d\beta, \quad (2.38)$$

es la proyección sobre el eje α del producto de las funciones $\bar{p}(\alpha, \beta)$ con simetría radial desplazadas una distancia $\bar{\rho}$ a lo largo de este eje. Resolviendo la integral de la Ec. 2.37 obtenemos una OTF 3D en un sistema con simetría de revolución dada por

$$\bar{H}(\bar{\rho}, \bar{w}) = \frac{1}{\bar{\rho}} P\left(\bar{\rho}, -\frac{\bar{w}}{\bar{\rho}}\right). \quad (2.39)$$

En particular, considerando el caso habitual de un sistema óptico con diafragma de apertura circular transparente, la función $P(\bar{\rho}, \alpha)$ vendrá dada por la proyección sobre el eje α del área común de los dos círculos separados una distancia $\bar{\rho}$. Mediante un razonamiento puramente geométrico obtenemos [20]

$$P(\bar{\rho}, \alpha) = 2 \operatorname{Re} \left\{ \sqrt{1 - \left(|\alpha| + \frac{\bar{\rho}}{2}\right)^2} \right\}, \quad (2.40)$$

de modo que,

$$\bar{H}(\bar{\rho}, \bar{w}) = \frac{2}{\bar{\rho}} \operatorname{Re} \left\{ \sqrt{1 - \left(\frac{|\bar{w}|}{\bar{\rho}} + \frac{\bar{\rho}}{2} \right)^2} \right\}. \quad (2.41)$$

A partir de esta última expresión podemos extraer la frecuencia espacial de corte del sistema en la dirección transversal resolviendo la condición

$$H(\bar{\rho}_0, 0) = \frac{2}{\bar{\rho}_0} \operatorname{Re} \left\{ \sqrt{1 - \left(\frac{\bar{\rho}_0}{2} \right)^2} \right\} = 0. \quad (2.42)$$

De esta ecuación podemos determinar que la frecuencia de corte del sistema en las coordenadas normalizadas vale $\bar{\rho}_0 = 2$. Deshaciendo el cambio de las Ecs. 2.30, la frecuencia de corte transversal incoherente vendrá dada por

$$|\mathbf{u}_0^i| = 2 \frac{NA}{\lambda}. \quad (2.43)$$

A la vista de este último resultado podríamos concluir que un sistema formador de imágenes incoherente posee el doble de resolución que un sistema coherente. No obstante, esta afirmación no es correcta. Para empezar, como puede verse en la Fig. 2.5(a), los detalles más pequeños del objeto, es decir las frecuencias más altas que aparecen radialmente más alejadas del centro de la OTF, poseen menor peso que las frecuencias bajas situadas en el centro geométrico de la OTF. Esto supone que las frecuencias más altas tendrán menor contraste que las bajas. Por otro lado, la CTF representa el espectro de la distribución de amplitudes, en cambio, la OTF nos muestra el espectro de la distribución de intensidades, por lo tanto no son directamente comparables.

A partir de la Ec. 2.37 es sencillo ver que aparece una discontinuidad infinita (tipo delta de Dirac) en el origen de las frecuencias espaciales y que la función es nula en el resto de las frecuencias axiales. En la Fig. 2.5(b) se puede apreciar una representación bidimensional de la OTF 3D para $\bar{v} = 0$. En ella vemos que existe una región cónica en torno a la dirección axial dentro del cual las frecuencias espaciales que no se transmiten

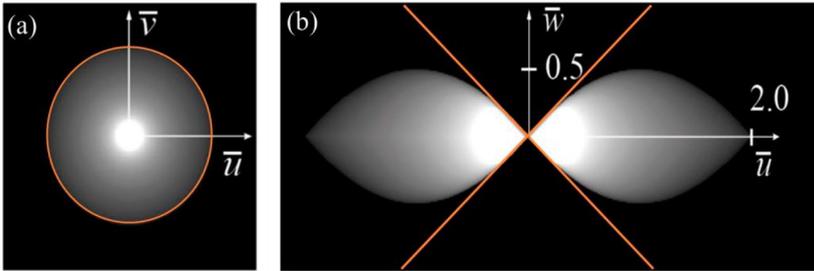


Figura 2.5: Representación de secciones de la OTF 3D en un sistema con pupila circular transparente: (a) plano $\bar{u}-\bar{v}$ (transversal); y (b) plano $\bar{u}-\bar{w}$. En la subfigura (a) se representa en color naranja la circunferencia correspondiente a la frecuencia espacial de corte en la dirección transversal, y en la subfigura (b) el cono de pérdidas de las frecuencias espaciales en la dirección axial.

por el sistema óptico. Esta región es conocida como cono de pérdidas. Este cono de pérdidas es el que justifica la ausencia de frecuencias axiales en el espacio imagen, y por lo tanto de seccionado óptico, en un sistema convencional trabajando con luz incoherente o con una respuesta incoherente de la muestra debido a la fluorescencia de la misma.

2.4.4 Tiempo de captura.

La diversidad existente entre las distintas técnicas de microscopía es tal que los distintos tiempos de captura, procesado o reproducción de la información procedente de la muestra puede variar de forma notable. La velocidad en cada uno de estos procesos puede no ser relevante si queremos estudiar la morfología de materiales inertes. No obstante, el estudio de muestras biológicas en movimiento requiere una técnica de captura de la información suficientemente rápida como para poder discriminar entre las distintas posiciones de la muestra biológica en su movimiento.

Hay que tener en cuenta que la captura digital de la información en forma de fotones requiere un tiempo en el que los fotones están impactando contra el sensor, otro tiempo para convertir la información analógica en digital y otro tiempo para guardar esta

información, lo cual impone un tiempo mínimo para el proceso de registro. Por otro lado, para la formación de imágenes 3D, típicamente se necesita un barrido tanto axial como lateral de la muestra, de modo que el límite no solo viene dado por el sensor si no por el sistema de barrido. Además, existe un límite físico relacionado con el número de fotones mínimo necesario para que la captura no esté afectada por el ruido. También hay que tener presente que un tiempo de captura bajo implica menor número de fotones de información y este aspecto será relevante a la hora de elegir la técnica de captura ya que unas técnicas funcionan mejor que otras con un número bajo de fotones.

Todo esto nos ha llevado a estudiar técnicas de microscopía capaces de ejecutar sus procesos de captura, procesamiento digital y reproducción de la información 3D con la mayor velocidad posible.

2.4.5 Profundidad de campo

Es conocido que, debido a la extensión de los elementos de registro del sensor empleado para capturar la imagen (p.e., los píxeles en un sensor digital), los sistemas presentan una cierta tolerancia al desenfoque. Dicho de otro modo, la respuesta del sensor a un punto conjugado exactamente con él es la misma que si este punto se proyecta ligeramente desenfocado. Para que esto ocurra, la *mancha* desenfocada del punto ha de ocupar una extensión menor o igual al tamaño de los elementos del sensor. Al intervalo axial en el espacio objeto en el que la imagen de cualquier punto genera la misma respuesta que un punto en foco se denomina intervalo de nitidez y su extensión se llama profundidad de campo (*DoF* del inglés *depth of field*). El estudio difractivo de la *DoF* de un sistema formador de imágenes es compleja, pero optaremos aquí por dar una aproximación geométrica que nos permita estimar este parámetro aproximadamente.

Consideraremos un sistema afocal-telecéntrico como el de la Fig. 2.6, ya que es el tipo de arquitectura que estudiaremos en este trabajo por su capacidad de registro de imágenes 3D, como ya hemos comentado. Además, tomaremos como plano objeto

conjugado con el sensor el plano focal objeto del primero de los subsistemas, ya que es así como trabajan óptimamente los microscopios que funcionan con objetivos corregidos al infinito. Realizaremos por simplicidad un análisis 1D, suponiendo un tamaño de píxel c .

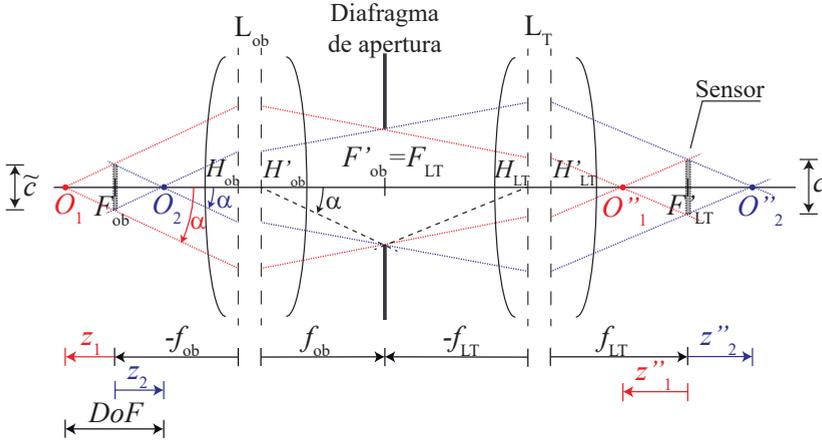


Figura 2.6: Esquema empleado en el cálculo de la DoF proporcionado por un sistema afocal-telecéntrico. Suponemos un tamaño de los elementos de sensor c , cuya antiimagen en el espacio objeto tendrá una extensión \tilde{c} .

Analizaremos el sistema en el espacio objeto, estudiando qué puntos axiales O_1 y O_2 proyectan sobre la antiimagen del píxel (cuyo tamaño denotaremos por \tilde{c}) una zona iluminada del mismo tamaño que dicha antiimagen. A partir de la igualdad de los ángulos α indicados en la Fig. 2.6, se puede obtener fácilmente que

$$\frac{-z_1}{\tilde{c}/2} = \frac{f_{ob}}{r_p}, \quad (2.44)$$

donde z_1 es la distancia del foco objeto del primer subsistema L_{ob} a O_1 y r_p representa, de nuevo, el radio del diafragma de apertura. Si tenemos en cuenta la relación de conjugación entre la antiimagen del píxel y éste mismo a través de todo el sistema, tendremos también que

$$\tilde{c} = \frac{c}{M}, \quad (2.45)$$

siendo M el aumento del sistema afocal. Combinando estas dos últimas ecuaciones, se obtiene finalmente

$$z_1 = -\frac{c}{2M NA} , \quad (2.46)$$

donde NA es la apertura numérica del primer subsistema. Repitiendo el mismo razonamiento para O_2 se obtiene $z_2 = -z_1$, lo que muestra que el intervalo de nitidez en estos sistemas es simétrico respecto del plano de enfoque. Finalmente, la DoF vendrá dada por

$$DoF = z_2 - z_1 = \frac{c}{M NA} . \quad (2.47)$$

En la Fig. 2.7 podemos apreciar la diferencia entre una captura realizada con un sistema óptico con una profundidad de campo reducida, a la derecha, y otra con una profundidad de campo mayor, a la izquierda. Para la realización de estas capturas se utilizó un objetivo fotográfico con diafragma variable. Se fijaron las posiciones de la escena y del sistema óptico. Cerrando el diafragma se capturó la imagen de la izquierda, ya que al cerrar el diafragma estamos reduciendo el tamaño de la lente efectiva del objetivo y con esto la NA de éste, lo que aumenta la DoF . De forma análoga se capturó la imagen de la derecha con el diafragma del objetivo abierto.

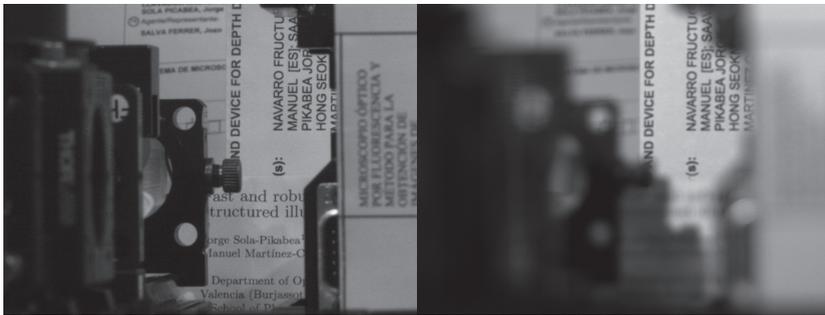


Figura 2.7: Imágenes ejemplo capturadas con un sistema óptico con poca profundidad de campo (derecha) y otra con mayor DoF (izquierda).

Para mostrar el efecto de la profundidad de campo se utilizó un objetivo fotográfico, pero cabe matizar que típicamente los

objetivos de microscopio tienen aperturas numéricas altas que hacen que la profundidad de campo sea bastante reducida (del orden de decenas de micras a cientos de nanómetros).

3

MICROSCOPIA POR ILUMINACION ESTRUCTURADA (SIM)

3.1 INTRODUCCION

Una de las características principales que definen la microscopía convencional se refiere al tipo de iluminación sobre la muestra. En cualquier microscopio convencional, la muestra se ilumina uniformemente. En el caso particular en el que se ilumina una muestra fluorescente, esta iluminación uniforme produce la excitación homogénea de los fluoróforos contenidos en la muestra. Cada fluoróforo de la muestra actuará como emisor puntual, una vez haya emitido la energía en forma de fotón debido al decaimiento de los niveles energéticos.

La microscopía por iluminación estructurada (SIM, como ya abreviamos en el capítulo anterior) no cumple este principio y por tanto no pertenece a las técnicas de microscopía inscritas dentro del marco de la microscopía convencional. En esta técnica, la muestra se ilumina mediante un patrón estructurado. Este procedimiento permite codificar información de altas frecuencias espaciales de la muestra en bajas frecuencias espaciales. Así es posible capturar frecuencias espaciales del objeto tales que el microscopio convencional no sería capaz de detectar debido al límite en resolución transversal marcado por la difracción de la luz como ya vimos en el apartado 2.4.1. Esta técnica requiere capturar una serie de imágenes y aplicar un algoritmo de reconstrucción antes de poder obtener la imagen final con aquellas frecuencias altas que el microscopio convencional no es capaz de capturar. De este modo, esta técnica nos permite obtener imágenes que pueden llegar a mejorar la resolución transversal en un factor 2 respecto de un sistema convencional con los mismos elementos ópticos. Por otro lado, esta técnica también posee la capacidad de obtener seccionado óptico de la muestra aunque en muchos casos en una configuración en la cual el aumento

en resolución transversal está limitado. Como ya vimos, los microscopios convencionales carecen de la capacidad de obtener seccionado óptico.

En este bloque estudiaremos los procedimientos necesarios para implementar esta técnica tanto teórica como experimentalmente. Para este fin se irá realizando un desarrollo de la técnica partiendo de los conceptos más simples. Una vez introducidas todas las propiedades y conceptos necesarios para entender en profundidad las ventajas que esta técnica nos puede proporcionar se analizarán los avances innovadores que hemos conseguido, tales como un nuevo algoritmo para la determinación precisa del desplazamiento del patrón, el aumento de contraste en el patrón de iluminación o la creación de una nueva técnica de microscopía capaz de conseguir seccionado óptico y aumentar en un factor 2 la resolución lateral del microscopio simultáneamente.

3.2 SISTEMA DE ILUMINACIÓN

Para empezar vamos a estudiar el proceso de iluminación de la muestra. Como ya se ha comentado, la iluminación se produce mediante un patrón estructurado. La forma más habitual consiste en generar un patrón transversal de perfil cosenoidal en amplitud mediante la interferencia de una serie de ondas planas coherentes entre sí tanto temporal como espacialmente. Típicamente la vía para generar este patrón cosenoidal es la de hacer interferir dos ondas planas con distinta inclinación respecto del eje óptico del sistema [21-23]. En este caso, la interferencia de las dos ondas planas genera un patrón de iluminación cosenoidal en los planos transversales al eje óptico del sistema.

Otra alternativa utilizada es la de generar tres ondas planas con distinta inclinación [24, 25]. En esta configuración dispondremos de las dos ondas descritas anteriormente y adicionalmente otra onda plana que viaje en la dirección del eje óptico. En este caso tendríamos el patrón cosenoidal transversal al eje óptico descrito anteriormente y, además, una modulación axial con otro patrón cosenoidal. Esta modulación axial se emplea para obtener

seccionado óptico adicional y mejora de la resolución lateral de la muestra.

Existe otro método alternativo que emplea iluminación estructurada para obtener seccionado óptico de la muestra por medio de la proyección incoherente de un patrón de iluminación. No obstante, este tipo de iluminación no es un patrón de iluminación cosenoidal en amplitud sino en intensidad, lo que lo convierte en un sistema de iluminación estructurada completamente distinto al que usaremos en este trabajo. El modelo de microscopio *Apotome*® perteneciente a la empresa *Zeiss* sigue este concepto de iluminación incoherente. Este microscopio comercial tiene la capacidad de generar la imagen de una red de difracción sobre la muestra que hace que este tipo de técnica posea seccionado óptico. Sin embargo, esta técnica no tiene la capacidad de aumentar la resolución transversal del microscopio. Otra de las limitaciones que posee es la poca flexibilidad a la hora de elegir la frecuencia de modulación del patrón de iluminación, ya que al estar generando la imagen de un objeto determinado, (una serie de rendijas separadas periódicamente), solo es posible cambiar la frecuencia de modulación del patrón cambiando el objeto que se utiliza para generar el patrón. En concreto este microscopio dispone de 3 tests con diferente período [26]. Sin embargo este método es distinto tanto en la práctica como en su concepto de la técnica que vamos a analizar. En este documento nos vamos a ceñir a la primera alternativa en la cual consideraremos únicamente un patrón puramente cosenoidal en una dirección transversal al eje óptico y constante e infinitamente extenso en la dirección del eje óptico (es decir, sin modulación axial) mediante la interferencia de un par de ondas planas.

Para la generación de las ondas planas que se van a utilizar para producir el patrón de iluminación estructurada cosenoidal también existen diferentes métodos. A continuación vamos a describir el método utilizado comúnmente para generar estas dos ondas planas coherentes entre sí. Este método emplea una red de difracción unidimensional. Si se ilumina esta red mediante un haz colimado dispondremos de una serie de ondas planas con diferentes direcciones y coherentes entre sí tras atravesar la red, donde el ángulo que forman cada par de ondas planas

contiguas depende del período de la red de difracción. Dado que en este método SIM necesitamos únicamente dos ondas planas, típicamente se utilizan los órdenes +1 y -1 de la red, entre otras cosas por ser los órdenes simétricos con mayor peso en intensidad. Para ello se bloquea mecánicamente el orden cero tras la red de difracción y los órdenes superiores se extraen fuera del sistema haciendo uso del tamaño finito de la pupila del objetivo de microscopio.

Consideremos, por tanto, una red de difracción unidimensional iluminada por una onda plana monocromática paralela al eje óptico, cuya transmitancia en amplitud se puede expresar como

$$t(\mathbf{x}) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} c_n e^{i2\pi \frac{n}{p} x}, \quad (3.1)$$

siendo c_n los coeficientes de peso para cada uno de los órdenes de la red, p el período de la red y donde, por simplicidad, hemos elegido la modulación de la transmitancia en la dirección del eje OX. El campo 3D difractado por este objeto puede calcularse, como ya se introdujo en el capítulo anterior, como

$$s_0(\mathbf{x}, z) = t(\mathbf{x}) \otimes_2 \frac{e^{ikz}}{z} e^{\frac{ik}{2z} |\mathbf{x}|^2} = e^{ikz} \sum_{n=-\infty}^{+\infty} c_n e^{-i\pi \lambda z \left(\frac{n}{p}\right)^2} e^{i2\pi \frac{n}{p} x}, \quad (3.2)$$

siendo z la distancia de propagación desde la red. Esta distribución de amplitudes se proyectará a través del sistema de iluminación del microscopio sobre el espacio de la muestra. Este sistema, como hemos indicado, bloqueará todos los órdenes del sumatorio anterior excepto los correspondientes a $n = \pm 1$. El caso más habitual en fluorescencia es considerar un sistema de iluminación afocal constituido por una primera lente L_1 , de focal f_1 y con la red sobre su plano focal objeto, y el propio objetivo del microscopio. A partir de los resultados del capítulo anterior, se deduce que, siempre que la frecuencia fundamental $u_0 = 1/p$ de la red quede por debajo de la frecuencia de corte coherente de este sistema, la distribución de amplitudes en el espacio de la muestra queda como

$$s(\mathbf{x}, z) = \frac{c_{+1}}{M_{il}} e^{i2\pi \frac{x}{M_{il} p}} + \frac{c_{-1}}{M_{il}} e^{-i2\pi \frac{x}{M_{il} p}}, \quad (3.3)$$

donde se han omitido factores de fase irrelevantes para el resultado que buscamos y donde $M_{il} = f_{ob}/f_1$. En el caso en que la transmitancia de la red de difracción sea real y centrosimétrica, algo que suele ser habitual, los pesos de los órdenes simétricos respecto del orden cero cumplirán $c_{+n} = c_{-n}$. Con todo, la distribución de amplitudes en el espacio de la muestra queda

$$s(\mathbf{x}, z) = 2 \frac{c_{+1}}{M_{il}} \cos \left(2\pi \frac{x}{M_{il}p} \right). \quad (3.4)$$

Así, la distribución de intensidades del patrón de iluminación cosenoidal proyectado sobre el espacio de la muestra del microscopio será,

$$S(\mathbf{x}, z) = |s(\mathbf{x}, z)|^2 = 2 \frac{c_{+1}^2}{M_{il}^2} \left[1 + \cos \left(2\pi \frac{2x}{M_{il}p} \right) \right]. \quad (3.5)$$

Por lo tanto mediante este procedimiento proyectamos un patrón cosenoidal sobre la muestra del microscopio cuya frecuencia depende exclusivamente de la frecuencia de la red y del aumento producido por el sistema de iluminación. En la fig. 3.1 se puede apreciar una ilustración del sistema de iluminación que se ha estudiado en este apartado.

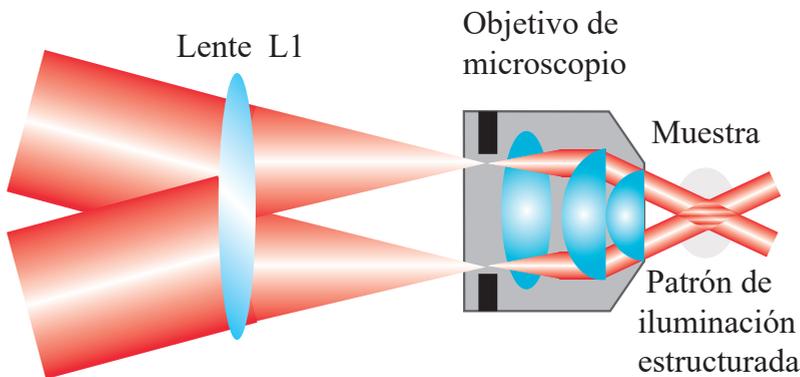


Figura 3.1: Esquema del sistema de iluminación en un sistema SIM

3.3 SISTEMA DE COLECCIÓN

A continuación pasamos a estudiar la respuesta del sistema al iluminar la muestra con un patrón estructurado. La iluminación coherente excitará cada uno de los fluoróforos de la muestra fluorescente. De este modo tendremos que la luz emitida incoherentemente por la muestra es debida a la iluminación de un patrón cosenoidal puro. Así que, la respuesta de la muestra compuesta por una distribución de fluoróforos $O(\mathbf{x}, z)$, será de la siguiente forma

$$I_{ill}(\mathbf{x}, z) = S(\mathbf{x}, z) \cdot O(\mathbf{x}, z), \quad (3.6)$$

siendo $S(\mathbf{x}, z)$ la distribución de intensidades del patrón de iluminación. La imagen de I_{ill} por medio del sistema afocal telecéntrico que constituye el microscopio, proporcionará una distribución de intensidades 3D en el espacio imagen de la forma siguiente,

$$I(\mathbf{x}, z) = \left[S \left(\frac{\mathbf{x}}{M}, \frac{z}{M^2} \right) \cdot O \left(\frac{\mathbf{x}}{M}, \frac{z}{M^2} \right) \right] \otimes_3 h_{inc}(\mathbf{x}, z). \quad (3.7)$$

donde la PSF 3D del sistema de colección en irradiancia viene dada por $h_{inc}(\mathbf{x}, z) = |h(\mathbf{x}, z)|^2$, como vimos en el apartado 2.4.3, y el aumento del microscopio $M = -f_{LT}/f_{ob}$ es el definido en el capítulo anterior. En la Fig. 3.2 se puede apreciar una ilustración del sistema de colección.

Para poder analizar las características más relevantes de estas expresiones matemáticas, vamos a movernos del espacio de posiciones a su espacio recíproco de frecuencias, realizando la transformada de Fourier de esta última expresión. Así, el espectro de frecuencias de dicha distribución será,

$$\tilde{I}(\mathbf{u}, w) = [\tilde{S}(M\mathbf{u}, M^2w) \otimes_3 \tilde{O}(M\mathbf{u}, M^2w)] \cdot H(\mathbf{u}, w), \quad (3.8)$$

siendo $H(\mathbf{u}, w)$ la OTF del sistema. En el caso en el que la iluminación sea uniforme, lo que tendremos será la convolución de una delta de Dirac centrada en el origen, con el espectro de frecuencias del objeto recortado por la extensión frecuencial permitida por la OTF. Es decir, tenemos la información obtenida

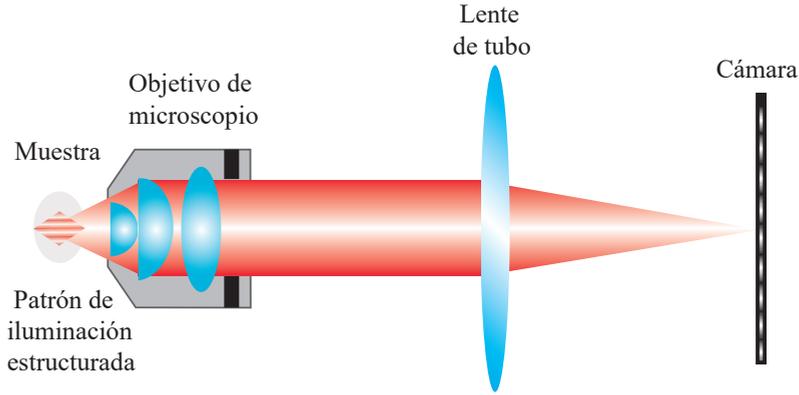


Figura 3.2: Esquema del sistema de captura en un sistema de Microscopía por Iluminación Estructurada

por un microscopio convencional en el que la máxima frecuencia espacial del objeto que somos capaces de capturar nos la limita la OTF del sistema. En cambio, si aplicamos la iluminación de un patrón puramente cosenoidal, como el descrito en la Ec. 3.5 del apartado anterior, tendremos la siguiente expresión,

$$\begin{aligned} \tilde{S}(M\mathbf{u}, M^2w) \otimes_3 \tilde{O}(M\mathbf{u}, M^2w) \propto \\ \left[\delta(\mathbf{u}, w) + \frac{1}{2}\delta(u_-, v, w) + \frac{1}{2}\delta(u_+, v, w) \right] \otimes_3 \tilde{O}(M\mathbf{u}, M^2w) = \\ \tilde{O}(M\mathbf{u}, M^2w) + \frac{1}{2}\tilde{O}(Mu_-, Mv, M^2w) + \frac{1}{2}\tilde{O}(Mu_+, Mv, M^2w), \end{aligned} \quad (3.9)$$

donde $u_{\pm} = u \pm \frac{2}{pMM_{ii}}$. Así, el contenido espectral en el espacio imagen vendrá dado por

$$\begin{aligned} \tilde{I}(\mathbf{u}, w) = \underbrace{\tilde{O}(M\mathbf{u}, M^2w) \cdot H(\mathbf{u}, w)}_{F_0} + \\ \frac{1}{2} \left[\underbrace{\tilde{O}(Mu - A, Mv, M^2w) \cdot H(\mathbf{u}, w)}_{F_{-1}} + \underbrace{\tilde{O}(Mu + A, Mv, M^2w) \cdot H(\mathbf{u}, w)}_{F_{+1}} \right], \end{aligned} \quad (3.10)$$

donde $A = \frac{2}{M_{ii}p}$. En esta última expresión podemos ver claramente diferenciados tres términos. El primero de ellos nos da información de las frecuencias del objeto centradas en el origen y limitadas por la OTF del sistema igual que tendríamos en un microscopio convencional. Aparte, tenemos otros dos términos desplazados simétricamente del orden cero que acabamos de describir. Estos términos nos dan información de las frecuencias espaciales del objeto desplazadas proporcionalmente a la frecuencia del patrón de iluminación, también limitadas por el soporte finito de la OTF del sistema.

Es evidente que en esta situación tenemos mayor información de los detalles de la muestra que en el caso convencional, pero está entremezclada. Necesitamos poder extraer la información del objeto por partes, y para ello necesitamos encontrar un parámetro que varíe dichas componentes y así generar un sistema de ecuaciones compatible determinado. A partir de ahora, los términos F_0, F_{-1}, F_{+1} indicados en la Ec. 3.10 se denominarán componentes de Fourier o frecuenciales en la imagen SIM.

3.4 MÉTODO DE RECONSTRUCCIÓN

3.4.1 Descomposición de las componentes

Para poder aislar las componentes que están entremezcladas una solución es emplear técnicas de corrimiento de fase. Supongamos que tenemos la capacidad de introducir un desfase o desplazamiento de la fase del patrón de iluminación cosenoidal de manera controlada. En este caso, la distribución de amplitudes del patrón adquiriría la siguiente forma,

$$S_i(\mathbf{x}, z) \propto 1 + \cos(2\pi Ax + \phi_i), \quad (3.11)$$

siendo ϕ_i el desfase introducido al patrón original con una fase inicial nula. Reproduciendo el análisis ejecutado anteriormente, en el espacio de Fourier, sobre el sensor tendremos una distribu-

ción de intensidades debidas a la emisión de los fluoroforos cuya transformada de Fourier tiene la siguiente forma,

$$\tilde{I}_i(\mathbf{u}, w) = F_0(\mathbf{u}, w) + \frac{1}{2} \left[F_{-1}(\mathbf{u}, w)e^{-i\phi_i} + F_{+1}(\mathbf{u}, w)e^{i\phi_i} \right]. \quad (3.12)$$

A partir de esta última expresión podemos ver que una captura nos proporciona una ecuación en la que aparecen las 3 componentes frecuenciales, las cuales podemos considerar como las 3 incógnitas del sistema de ecuaciones. Modificando el valor de ϕ_i tres veces realizaremos el primer paso para conseguir un sistema de ecuaciones. La modificación de esta fase no es más que el desplazamiento lateral del patrón de iluminación. Dado que tenemos la capacidad de imponer el desfase deseado, la elección de este desplazamiento la realizaremos eligiendo valores que simplifiquen el cálculo matemático. Para ello elegimos un valor simétrico del desplazamiento a partir de una fase inicial nula, es decir, que los tres desfases introducidos serán $\phi_1 = -\phi$, $\phi_2 = 0$, $\phi_3 = \phi$. Con todo esto, la distribución de frecuencias espaciales en el espacio imagen debida a cada uno de los desplazamientos del patrón mencionado en este párrafo quedarán de la siguiente forma

$$\begin{aligned} \tilde{I}_\phi(\mathbf{u}, w) &= F_0(\mathbf{u}, w) + \frac{e^{-i\phi}}{2}F_{-1}(\mathbf{u}, w) + \frac{e^{i\phi}}{2}F_{+1}(\mathbf{u}, w) \\ \tilde{I}_0(\mathbf{u}, w) &= F_0(\mathbf{u}, w) + \frac{1}{2}F_{-1}(\mathbf{u}, w) + \frac{1}{2}F_{+1}(\mathbf{u}, w) \\ \tilde{I}_{-\phi}(\mathbf{u}, w) &= F_0(\mathbf{u}, w) + \frac{e^{i\phi}}{2}F_{-1}(\mathbf{u}, w) + \frac{e^{-i\phi}}{2}F_{+1}(\mathbf{u}, w). \end{aligned} \quad (3.13)$$

Podemos reescribir este sistema de ecuaciones en su expresión matricial de la siguiente manera:

$$\begin{pmatrix} e^{-i\phi}/2 & 1 & e^{i\phi}/2 \\ 1/2 & 1 & 1/2 \\ e^{i\phi}/2 & 1 & e^{-i\phi}/2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} F_{-1} \\ F_0 \\ F_{+1} \end{pmatrix} = R \begin{pmatrix} F_{-1} \\ F_0 \\ F_{+1} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \tilde{I}_\phi \\ \tilde{I}_0 \\ \tilde{I}_{-\phi} \end{pmatrix}. \quad (3.14)$$

Con el sistema en su forma matricial buscamos las soluciones mediante la regla de Cramer. Para ello primero calculamos el de-

terminante de la matriz de coeficientes del sistema de ecuaciones,

$$\det\{R\} = i \sin \phi (1 - \cos \phi) , \quad (3.15)$$

de donde podemos extraer que los valores que anulan el determinante del sistema no cumplen las condiciones para que el sistema sea compatible determinado y por lo tanto debemos descartarlas. Según este razonamiento los valores $\phi = n\pi$, con n cualquier numero entero, dan lugar a un sistema de ecuaciones sin solución única. Podemos hacer un razonamiento sencillo sobre esta conclusión: en el caso en el que eligieramos un desfase de π , estaríamos realizando el mismo desplazamiento tanto en la primera captura como en la última, lo que nos proporcionaría un sistema de 3 incógnitas con 2 ecuaciones, que corresponde a un sistema compatible indeterminado. Teniendo en consideración todo esto, podemos escribir la solución al sistema de ecuaciones de la siguiente forma,

$$\begin{aligned} F_{-1} &= \frac{\tilde{I}_{-\phi}(e^{-i\phi} - 1) + \tilde{I}_0 2i \sin \phi + \tilde{I}_\phi(1 - e^{i\phi})}{2i \sin \phi(1 - \cos \phi)} \\ F_0 &= \frac{\tilde{I}_{-\phi} - \tilde{I}_0 2 \cos \phi + \tilde{I}_\phi}{2(1 - \cos \phi)} \\ F_{+1} &= \frac{\tilde{I}_{-\phi}(1 - e^{i\phi}) + \tilde{I}_0 2i \sin \phi + \tilde{I}_\phi(e^{-i\phi} - 1)}{2i \sin \phi(1 - \cos \phi)} . \end{aligned} \quad (3.16)$$

Estas son las soluciones generales al sistema de ecuaciones planteado para cualquier valor de $\phi \neq n\pi$. En este punto tenemos la información frecuencial del objeto separada en las tres componentes. Esto se puede ver a partir de la definición de las componentes en la Ec. 3.10, cuya expresión es

$$\begin{aligned} F_0(\mathbf{u}, w) &= \tilde{O}(M\mathbf{u}, M^2w) \cdot H(\mathbf{u}, w) \\ F_{\pm 1}(\mathbf{u}, w) &= \tilde{O}(M(u \pm \hat{A}), Mv, M^2w) \cdot H(\mathbf{u}, w) , \end{aligned} \quad (3.17)$$

cuya transformada de Fourier la podemos escribir como sigue,

$$\begin{aligned} \tilde{F}_0(\mathbf{x}, z) &= O\left(\frac{\mathbf{x}}{M}, \frac{z}{M^2}\right) \otimes_3 h_{inc}(\mathbf{x}, z) \\ \tilde{F}_{\pm 1}(\mathbf{x}, z) &= \left\{ O\left(\frac{\mathbf{x}}{M}, \frac{z}{M^2}\right) e^{\mp i 2\pi \hat{A} x} \right\} \otimes_3 h_{inc}(\mathbf{x}, z) , \end{aligned} \quad (3.18)$$

siendo $\hat{A} = \frac{A}{M}$ la frecuencia de modulación del patrón cosenoidal de iluminación escalada por las características del sistema óptico en el espacio de posiciones. Podemos analizar este resultado desde el espacio de posiciones o bien desde el de frecuencias. Desde el punto de vista del espacio de posiciones, tenemos una componente (\tilde{F}_0) que nos proporciona la información que obtendríamos en un microscopio convencional. Adicionalmente, tenemos otras dos componentes afectadas por un factor de fase lineal ($\tilde{F}_{\pm 1}$). Volviendo al espacio de frecuencias en la Eq. 3.10, resulta más sencillo de visualizar que lo que tenemos es una componente frecuencial limitada por la extensión frecuencial de la OTF del sistema. Adicionalmente, otras dos componentes, también limitadas por la extensión frecuencial de la OTF, pero en este caso el origen de esta información, es decir, las mínimas frecuencias del objeto, no se posicionan en el centro de la OTF del sistema sino que aparecen desplazadas debido a ese factor de fase lineal que vemos en las expresiones en el espacio de posiciones. Este desplazamiento del origen de frecuencias del objeto, hace que, en una dirección determinada, desaparezcan frecuencias en un sentido pero en el sentido contrario aparecen frecuencias del objeto mayores a las que teníamos en el orden cero. De este modo tenemos 3 componentes espectrales de Fourier separadas y desplazadas respecto de su posición original debido al factor de fase lineal introducido por el patrón de iluminación, como se ve en la Fig. 3.3.

En este punto disponemos de la información de altas frecuencias del objeto separada por componentes. A continuación veremos el procedimiento necesario para componer esta información y obtener el resultado final deseado en el que conseguiremos ver detalles en la muestra imperceptibles con un microscopio convencional.

3.4.2 Reconstrucción de la información frecuencial

La recuperación del contenido de frecuencias espaciales de la muestra a partir de las imágenes $I_i(\mathbf{x}, z)$ se realiza convencionalmente tras un procesado digital [24]. En primer lugar, para

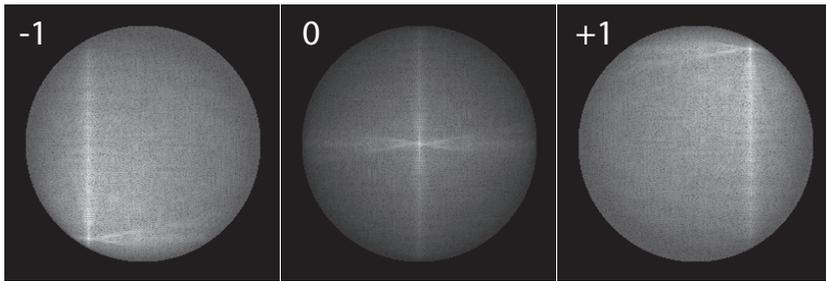


Figura 3.3: Componentes frecuenciales. De izquierda a derecha, ejemplo de representación de las componentes frecuenciales F_{-1} , F_0 y F_{+1} en el plano $w = 0$. Por motivos gráficos, el patrón estructurado se ha implementado a 45° del eje OX .

eliminar los efectos de borde en la la estimación de sus transformadas de Fourier, cada imagen se multiplica por una *ventana apodizadora* (típicamente una función coseno centrada con periodo igual a la mitad de la anchura de estas imágenes). Tras la transformada de Fourier digital sobre las imágenes *apodizadas*, se resuelve el sistema de ecuaciones 3.13 y se estiman las componentes $F'_i(\mathbf{u}, w)$.

Para compensar el desplazamiento producido por el patrón de iluminación y posicionar cada una de las frecuencias espaciales en su posición correcta tenemos dos maneras de entenderlo. La primera forma de interpretarlo es considerando el espectro de frecuencias del objeto recortado por la OTF del sistema pero desplazada en cada caso a la posición determinada por el período del patrón de iluminación, representado esquemáticamente en la Fig. 3.4.

La otra forma de verlo es a partir de las componentes representadas en la Fig. 3.3. Podemos recolocarlas de forma que el origen de frecuencias coincida en la misma posición en las tres componentes como se puede apreciar en la Fig. 3.5. En definitiva estamos haciendo lo mismo, en un caso estamos desplazando el espectro de frecuencias dejando fija la OTF y en el otro caso desplazamos la OTF dejando fijo el espectro de frecuencias.

No obstante, falta tener en consideracion un aspecto más. El hecho de que la OTF del sistema no es una función uniforme hace que haya que tenerlo en cuenta a la hora de obtener el resultado

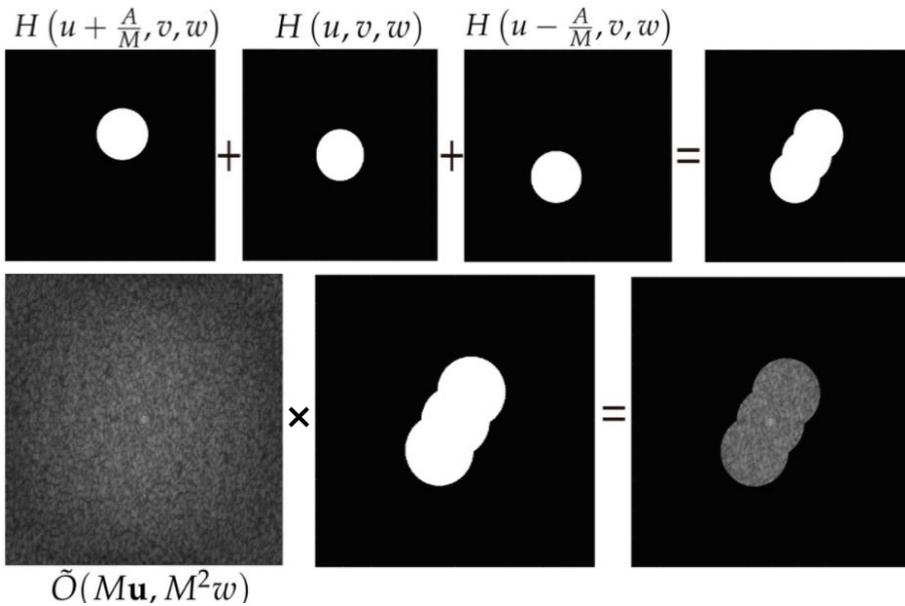


Figura 3.4: Representación esquemática de la reconstrucción de la información frecuencial (en el plano $w = 0$) de un sistema SIM considerando la distribución frecuencial del objeto recortada por la OTF desplazada.

final. Para solucionar este inconveniente es necesario aplicar un filtro de Wiener con una OTF estimada del sistema $\hat{H}(\mathbf{u}, w)$, realizando una desconvolución de cada una de las componentes. Por otro lado, los picos de intensidad que corresponden a la frecuencia central del espectro de las muestras convencionales presentan una intensidad desproporcionadamente alta frente al resto de la energía distribuida en cada componente. Este efecto limita fuertemente el contraste y genera patrones de franjas residuales en las reconstrucciones obtenidas. Para mejorar este aspecto se aplica un filtro tipo "notch" $N(\mathbf{u}, w)$ (generalmente en forma de dos funciones gaussianas invertidas sobre los órdenes ± 1) que reduce esta distorsión. Finalmente, para evitar los efectos de borde en la transformada de Fourier inversa que reconstruye la imagen de la muestra, se vuelve a aplicar una función apodizante con una extensión igual a la del soporte de la OTF extendida, $\hat{H}_{ext}(\mathbf{u}, w)$. De esta forma podemos escribir la reconstrucción

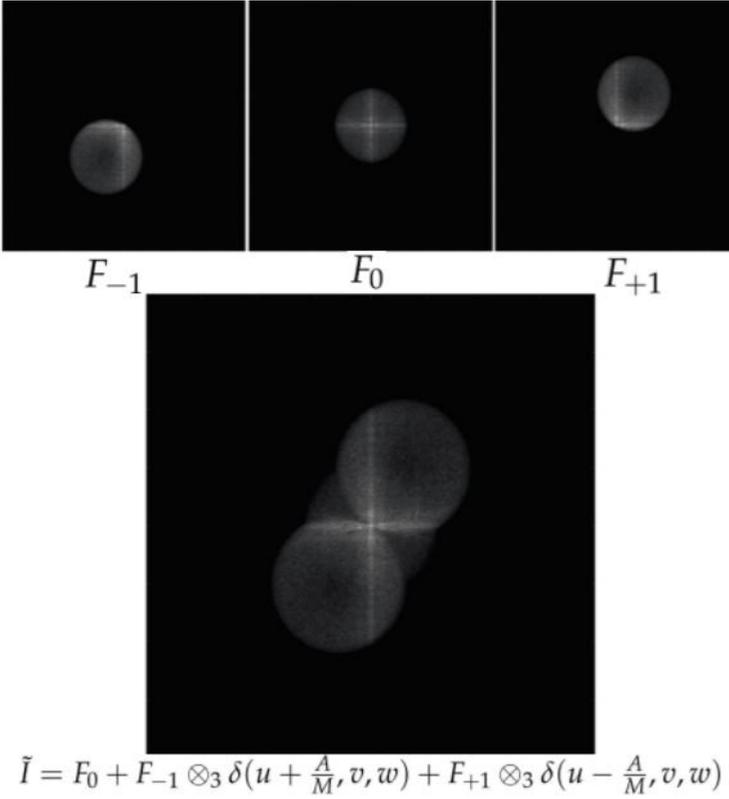


Figura 3.5: Representación esquemática en el plano $w = 0$ de la reconstrucción de la información frecuencial de un sistema SIM considerando las componentes frecuenciales F_{-1} , F_0 y F_{+1} cada una en su posición determinada por el período de modulación del patrón de iluminación.

estimada del espectro de frecuencias de la imagen sintética del objeto como [24]

$$\hat{O}_{sint}(\mathbf{u}, w) = \left[\sum_{i=-1}^1 \frac{\hat{H}^*(\mathbf{u}, w) F_i'(\mathbf{u}, w)}{|\hat{H}(\mathbf{u}, w)|^2 + W^2} \otimes_3 \delta(u - i\hat{A}, v, w) \right] N(\mathbf{u}, w) \hat{H}_{ext}(\mathbf{u}, w). \quad (3.19)$$

El parámetro W es el coeficiente ajustable del filtrado de Wiener. Hay que reseñar que la convolución con la delta de Dirac que aparece en esta última expresión, no es más que el reposiciona-

miento correcto de las componentes explicado al principio del apartado.

3.4.3 Aumento de resolución isótropo

Cabe decir que todo el análisis realizado en este capítulo ha sido considerando las variaciones de intensidad del patrón de iluminación en una única dirección. Esto repercute en un aumento en la resolución de la imagen final únicamente en dicha dirección. Para generar una reconstrucción final cuyo incremento en resolución sea isótropo habría que repetir el proceso rotando la proyección del patrón sobre la muestra para cada uno de los ángulos entre 0° y 90° . No obstante, este proceso requeriría un tiempo y necesidad de procesamiento muy elevados. En la práctica, realizando este proceso con tres rotaciones del patrón separadas angularmente equidistantes (-60° , 0° , 60°) se rellena la OTF sintética prácticamente por completo¹. Así, podemos escribir las distintas orientaciones del patrón de iluminación de la siguiente forma

$$S_i^j(\mathbf{x}, z) \propto 1 + \cos\left(2\pi \mathbf{A}^j \cdot \mathbf{x} + \phi_i\right), \quad (3.20)$$

donde ahora, el vector \mathbf{A}^j no solo contiene la información de la frecuencia $|\mathbf{A}^j| = A$ de modulación del patrón de iluminación, sino que además nos indica la orientación de dicho patrón. Por tanto el proceso de reconstrucción proporcionado por la Ec. 3.19 para una única dirección ahora se puede extender a

$$\hat{O}_{sint}(\mathbf{u}, w) = \sum_j^N \left[\sum_{i=-1}^1 \frac{\hat{H}^*(\mathbf{u}) F_i^j(\mathbf{u}, w)}{|\hat{H}(\mathbf{u})|^2 + W^2} \otimes_3 \delta(\mathbf{u} - i\hat{\mathbf{A}}^j, w) \right] N^j(\mathbf{u}, w) \hat{H}_{ext}^j(\mathbf{u}, w). \quad (3.21)$$

¹ Es muy importante diferenciar entre el desfase del patrón de iluminación en el cual se deslaza este patrón en la misma dirección en la que se genera el patrón, y entre la rotación del patrón sobre la muestra en la cual va cambiando el ángulo que forman entre la dirección del patrón y el eje x . Para mayor claridad, a lo largo del trabajo, los ángulos relativos al desplazamiento del patrón se han escrito en radianes y los relativos a la rotación del patrón en grados.

donde N representa el número de direcciones del patrón consideradas. Cabe precisar que todo el análisis realizado en este capítulo está sujeto al conocimiento exacto del desplazamiento de fase del patrón. Una determinación errónea del desplazamiento del patrón produce irregularidades en la reconstrucción final generando un resultado con pérdida de contraste y resolución. Además, las soluciones no serán correctas y, por ello, el espectro estimado obtenido del objeto no se corresponderá con su espectro real. En el siguiente capítulo presentaremos un método para determinar con precisión el desplazamiento de fase del patrón de iluminación a partir de las imágenes del objeto iluminado por el patrón y sin ningún conocimiento previo de las características del sistema óptico de captura.

4

ESTIMACIÓN DEL CORRIMIENTO DE FASE

4.1 MOTIVACIÓN

En el anterior capítulo hemos visto, de una forma teórica, el proceso completo de la técnica SIM. El desfase introducido en el patrón de iluminación se realiza, típicamente, mediante un proceso mecánico. Para ello es habitual desplazar, ortogonalmente al eje óptico del sistema, el elemento utilizado para generar el patrón cosenoidal utilizando un motor con desplazamiento de precisión. Es evidente que este movimiento mecánico ha de tener un intervalo de incertidumbre por el mero hecho de ser un movimiento discreto y no continuo. Para conseguir un resultado final satisfactorio en el que las componentes frecuenciales (F_0 , F_{-1} y F_{+1}) estén perfectamente separadas, es esencial una determinación precisa del desplazamiento de fase del patrón ya que, en caso contrario obtendríamos un resultado erróneo.

Existen en la literatura, diferentes métodos para determinar el desplazamiento de fase del patrón de iluminación, incluso sin conocer de antemano las características del sistema óptico. Shroff et al. [27] propusieron un método que se basaba en la medida de la fase en los picos secundarios del espectro de frecuencias de las imágenes elementales, es decir, en las transformadas de Fourier de las imágenes capturadas con el objeto iluminado por el patrón con sus diferentes desfases. Llamaremos a este método: Medida de la Fase en los Picos (MFP). Este método, aunque es robusto y rápido, produce errores superiores al 10 % cuando los desplazamientos del patrón son pequeños y, mucho más importante, tiene poca precisión en la determinación del desplazamiento cuando la frecuencia de modulación del patrón es igual o superior al 85 % de la frecuencia de corte determinada por la OTF del sistema. Esto limita el aumento en resolución alcanzable ya que para obtener un aumento en resolución del 100 %, respecto de

un sistema convencional con los mismos elementos ópticos, es necesario que la frecuencia de modulación del patrón de franjas coincida con la frecuencia de corte del sistema. Para resolver estos inconvenientes Wicker et al. propusieron un método capaz de determinar el desplazamiento de fase incluso cuando los picos de las componentes frecuenciales no eran visibles claramente [28]. Este método consiste en minimizar la correlación cruzada entre las componentes capturadas cambiando iterativamente la fase estimada. Sin embargo, dado que se basa en el cálculo de correlaciones cruzadas de los espectros de frecuencias, es un método muy lento en el que el tiempo de computación se incrementa considerablemente. Llamaremos a este método: Método de la Correlación Cruzada (MCC). Para intentar disminuir el tiempo de procesado, Wicker [29] propuso una alternativa a su método anterior en un único paso pero los resultados dejaban de ser tan precisos especialmente en condiciones en las que el número de fotones detectados es bajo o baja relación señal-ruido. A continuación vamos a presentar un innovador método para detectar el desplazamiento de fase del patrón de iluminación [30-32].

4.2 ANÁLISIS TEÓRICO

Para una determinación precisa del desplazamiento de fase del patrón de iluminación, en primer lugar consideraremos que la fase introducida por el desplazamiento del patrón es desconocida. Tras la captura de la imagen del objeto iluminado con el patrón cosenoidal, se realiza su transformada de Fourier y se determinan las posiciones de los picos de las componentes -1 , 0 y $+1$. A continuación se varía la fase en la Ec. 3.16 hasta obtener la fase real. Para la determinación de la fase real se utilizará un método al que llamaremos Diferencia en la Intensidad de los Picos Normalizada (DIPN). Hay que tener en mente que hasta el momento estamos estudiando el procedimiento considerando una única dirección en la proyección del patrón y que, por tanto,

así solo estaremos aumentando la resolución en la dirección de desplazamiento del patrón.

Consideremos un sistema SIM como el descrito en el Cap.3. Para ilustrar este proceso simularemos la formación de imágenes en un SIM utilizando una imagen 2D de un test de resolución USAF 1951®.

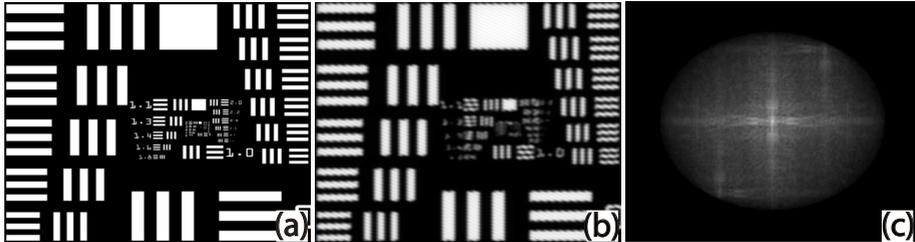


Figura 4.1: (a) Test USAF 1951® empleado en (b) para la simulación de la distribución de intensidades de una imagen 2D capturada en un SIM y (c) su transformada de Fourier en la que se aprecia el origen de frecuencias de los órdenes -1 , 0 y $+1$. De nuevo, se ha supuesto una modulación a 45° de la dirección horizontal. Por simplicidad, se ha tomado $M = 1$.

En las subfiguras Fig. 4.1(a) y Fig. 4.1(b) podemos ver la simulación del test en el espacio objeto y la distribución de intensidades en el espacio imagen sobre el plano del sensor de este test de resolución.

Típicamente el espectro de frecuencias de cada una de las imágenes capturadas tiene 3 picos claramente diferenciados, que corresponden a la frecuencia $\mathbf{u} = \mathbf{0}$ del objeto. Llamamos imagen elemental a cada una de las imágenes capturadas del objeto iluminado por el patrón con distintos desplazamientos de fase. En la subfigura 4.1(c) mostramos la transformada de Fourier de la imagen elemental que aparece en la subfigura 4.1(b). En ella se aprecian el origen de frecuencias de cada uno de los órdenes que caen dentro del soporte compacto de la OTF del sistema. Recordando y apoyándonos en la Ec. 4.1

$$\tilde{I}(\mathbf{u}, w) = \underbrace{\tilde{O}(M\mathbf{u}, M^2w) \cdot H(\mathbf{u}, w)}_{F_0} + \frac{1}{2} \left[\underbrace{\tilde{O}(Mu - A, Mv, M^2w) \cdot H(\mathbf{u}, w)}_{F_{-1}} + \underbrace{\tilde{O}(Mu + A, Mv, M^2w) \cdot H(\mathbf{u}, w)}_{F_{+1}} \right], \quad (4.1)$$

podemos ver que cada uno de los picos de la imagen se corresponde con el origen de frecuencias espaciales de los distintos términos de la ecuación. Es decir, el pico central representa las frecuencias más bajas correspondientes al primer término de la Ec. 4.1. A medida que nos alejamos radialmente del pico central nos estamos desplazando a frecuencias superiores de este término. Lo mismo ocurre si nos posicionamos en los picos adyacentes, cada uno tiene la información de bajas frecuencias del objeto, y estas frecuencias aumentan a medida que nos alejamos radialmente. Podemos relacionar la posición de cada uno de estos picos con la frecuencia de modulación del patrón de iluminación a partir de las coordenadas dadas por el vector $\mathbf{p}_m^j = m\hat{\mathbf{A}}^j$, siendo $m = (-1, 0, 1)$. Un proceso ilustrativo de la medida de las posiciones de los picos de cada componente a partir de las imágenes elementales está representado en la Fig. 4.2

En un proceso experimental típico se capturan tres imágenes (para cada posición axial de registro) con diferente fase en el patrón de iluminación $\phi = (-\alpha, 0, \alpha)$, donde el valor de la fase α es desconocido. A continuación resolvemos nuestro sistema de ecuaciones de la Ec. 3.14 pero teniendo en cuenta que no conocemos el valor del desplazamiento, por tanto consideramos un valor arbitrario α' del desfase entre los distintos patrones cosenoidales $\phi' = (-\alpha', 0, \alpha')$, al cual llamaremos estimación del desplazamiento de fase del patrón. Así que la Ec. 4.2

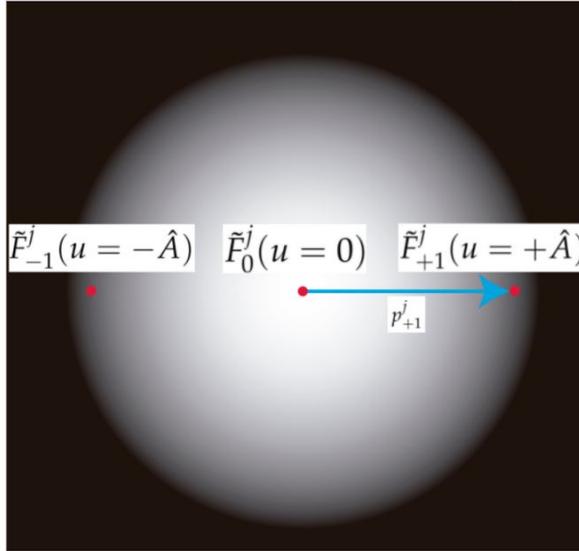


Figura 4.2: **Esquema del algoritmo.** Ilustración de la medida de la posición de los picos de las componentes a través de la transformadas de Fourier de las soluciones estimadas.

$$\begin{pmatrix} e^{-i\alpha'}/2 & 1 & e^{i\alpha'}/2 \\ 1/2 & 1 & 1/2 \\ e^{i\alpha'}/2 & 1 & e^{-i\alpha'}/2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{F}_{-1} \\ \hat{F}_0 \\ \hat{F}_{+1} \end{pmatrix} = R' \begin{pmatrix} \hat{F}_{-1} \\ \hat{F}_0 \\ \hat{F}_{+1} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \tilde{I}_{\alpha'} \\ \tilde{I}_0 \\ \tilde{I}_{-\alpha'} \end{pmatrix}, \quad (4.2)$$

nos proporcionará una estimación de las soluciones. Esta estimación solo será igual a la solución real cuando la fase estimada sea igual a la fase real $\alpha' = \alpha$. En este caso las 3 componentes del espectro estarán perfectamente aisladas y por tanto cada una de las componentes solo tendrá un pico correspondiente a la mínima frecuencia espacial proveniente del objeto. Atendiendo a este razonamiento y apoyandonos nuevamente en la Fig. 4.2, podemos calcular las intensidades del pico de cada una de las

componentes y sus residuos, es decir, la intensidad del pico de la componente que se está desligando, como sigue ¹

$$i_{pico}^m = \left| \hat{F}_m^j(\mathbf{u} = m\hat{\mathbf{A}}^j) \right|^2, \quad (4.3)$$

$$i_{resi}^m = \left| \hat{F}_m^j(\mathbf{u} = -m\hat{\mathbf{A}}^j) \right|^2, \quad (4.4)$$

donde \hat{F}_m^j son las soluciones estimadas proporcionadas por la Ec. 4.2. En ellas m puede tomar típicamente 3 valores $m = (-1, 0, 1)$, no obstante en el análisis que vamos a realizar haremos uso exclusivamente de $m = \pm 1$, que son los valores que se corresponden con las componentes de alta frecuencia. Además dado que ambas componentes son completamente simétricas, veremos que puede ser suficiente con aplicar el método DIPN para una de ellas únicamente.

Introduciendo una fase estimada en la Ec. 3.10 y resolviendo el sistema, por ejemplo, mediante la regla de Cramer, obtenemos la siguiente expresión para la componente con $m = 1$,

$$\hat{F}_{+1}(\mathbf{u}) = \frac{\tilde{I}_{-\alpha}(\mathbf{u}) (1 - e^{i\alpha'}) + \tilde{I}_0(\mathbf{u}) 2i \sin \alpha' + \tilde{I}_{+\alpha}(\mathbf{u}) (e^{-i\alpha'} - 1)}{2i \sin \alpha' (1 - \cos \alpha')}, \quad (4.5)$$

donde, recordemos que, α representa los valores reales del desplazamiento del patrón, y que aparecen dentro de las imágenes capturadas \tilde{I} , y α' representa las estimaciones del desplazamiento del patrón de iluminación. Introduciendo ahora las expresiones de las intensidades reales proporcionadas por cada una de las capturas expresadas en la Ec. 3.13, obtenemos una expresión para la estimación de la componente con $m = 1$ tal que

$$\begin{aligned} \hat{F}_{+1}(\mathbf{u}) \propto & \frac{\tilde{O}(M(\mathbf{u} - \hat{\mathbf{A}}^j)) [i \sin(\alpha - \alpha') + i \sin \alpha' - i \sin \alpha]}{2i \sin \alpha' (1 - \cos \alpha')} + \\ & + \frac{\tilde{O}(M(\mathbf{u} + \hat{\mathbf{A}}^j)) [-i \sin(\alpha + \alpha') + i \sin \alpha' + i \sin \alpha]}{2i \sin \alpha' (1 - \cos \alpha')}, \end{aligned} \quad (4.6)$$

¹ Por simplicidad de notación, obviaremos en este capítulo la dependencia de las funciones en la frecuencia axial w .

donde tenemos una combinación de fases reales y fases estimadas que harán que $\hat{F}_{+1}(\mathbf{u})$ solo sea la exacta cuando la fase estimada sea igual a la fase experimental. Podemos observar que en esta componente no existe contribución de la componente cero a la solución independientemente de los valores del desplazamiento de fase. Definimos ahora una función que nos proporcione la diferencia en la intensidad de los picos normalizada (DIPN), por ejemplo para la componente +1, como

$$\epsilon^{+1}(\alpha') = \frac{i_{pico}^{+1}(\alpha') - i_{resi}^{+1}(\alpha')}{i_{pico}^{+1}(\alpha') + i_{resi}^{+1}(\alpha')}, \quad (4.7)$$

que da una medida absoluta de la diferencia de intensidades entre los picos de las dos componentes de alta frecuencia. Esta función ϵ es uno de los puntos claves de este método. Valores próximos a cero de este parámetro $\epsilon(\alpha')$ indican que ambas intensidades son parecidas y por tanto las componentes siguen ligadas. En cambio, el valor máximo de este parámetro indica el valor de la fase estimada que hace que la información de una de las componentes desaparezca y tengamos la información separada como deseábamos.

Introduciendo la Ec. 4.6 en la Ec. 4.4 podemos reescribir los valores de las intensidades de los picos como

$$i_{pico}^{+1}(\alpha') = |K \cdot \tilde{O}(\mathbf{0}) + L \cdot \tilde{O}(2\mathbf{A}^j)| |H(-\hat{\mathbf{A}}^j)|^2$$

$$i_{resi}^{+1}(\alpha') = |L \cdot \tilde{O}(\mathbf{0}) + K \cdot \tilde{O}(-2\mathbf{A}^j)| |H(-\hat{\mathbf{A}}^j)|^2, \quad (4.8)$$

donde

$$K(\alpha, \alpha') = \frac{\sin \alpha' + \sin(\alpha - \alpha') - \sin \alpha}{2 \sin \alpha' (1 - \cos \alpha)},$$

$$L(\alpha, \alpha') = \frac{\sin \alpha' - \sin(\alpha + \alpha') + \sin \alpha}{2 \sin \alpha' (1 - \cos \alpha)}. \quad (4.9)$$

Sustituyendo en la Ec. 4.7, podemos escribir la curva del pico de intensidad normalizado como

$$\epsilon(\alpha') = \frac{(L^2 - K^2)(1 - \eta)}{(L^2 + K^2)(1 + \eta) + 4KL \operatorname{Re}(\eta)}, \quad (4.10)$$

donde $\eta = \left| \frac{\tilde{O}(2\mathbf{A}^j)}{\tilde{O}(\mathbf{0})} \right|$. Teniendo en cuenta la atenuación de la información de las frecuencias altas para muestras típicas respecto de las bajas frecuencias, sobretodo debido a la forma de la OTF (como vimos en el apartado 2.4.3.2), η puede ser despreciada, ya que

$$|\tilde{O}(\mathbf{0})| \gg |\tilde{O}(2\mathbf{A}^j)| \longrightarrow \eta \ll 1. \quad (4.11)$$

Para comprobar la convergencia del método propuesto, analizamos la variación de la función ϵ frente a la fase estimada α' en busca de máximos y mínimos. Para ello realizamos la derivada pertinente,

$$\partial_{\alpha'} \epsilon(\alpha') = \frac{(\cos \alpha' - \cos \alpha) \sin \alpha}{-1 + \cos \alpha' \cos \alpha}. \quad (4.12)$$

Cuando se iguala esta derivada a cero obtenemos como resultado $\alpha' = \pm\alpha + 2n\pi$, siendo n cualquier número entero. Trivialmente, vemos que la segunda derivada nos ofrece un resultado negativo en cualquier caso. Esto indica que la función que estamos analizando tiene un máximo absoluto cuando la fase estimada es igual a la fase real, obviando la multiplicidad de las soluciones debido a la periodicidad de la fase. Para demostrar este resultado realizamos un proceso iterativo dando valores a la fase estimada entre 0 y π para un valor determinado de la fase real. La sucesión de estos puntos dan lugar a una de las curvas representadas en la Fig. 4.3. En esta figura representamos curvas $\epsilon(\alpha')$ para distintos valores de la fase real introducida α . En la figura podemos ver que todas las curvas presentan un máximo absoluto cuando el valor de la fase estimada coincide con el de la fase real. Usaremos este parámetro como métrica de la bondad de la estimación de la fase al introducirla en la Ec. 3.14. Realizamos un proceso iterativo en el que las soluciones estimadas son obtenidas a partir de la estimación de las fase: ($\alpha'_{i+1} = \alpha'_i + \Delta\alpha$). La mejor estimación ocurre cuando ϵ es máximo, es decir,

$$\alpha'_{\text{máx}} \Big/ \epsilon(\alpha'_{\text{max}}) = \text{máx}(\epsilon(\alpha')) \longrightarrow \alpha'_{\text{max}} = \alpha; \hat{F}_m^j = F_m^j. \quad (4.13)$$

En la Fig. 4.4 se puede apreciar una ilustración del funcionamiento del algoritmo de convergencia.

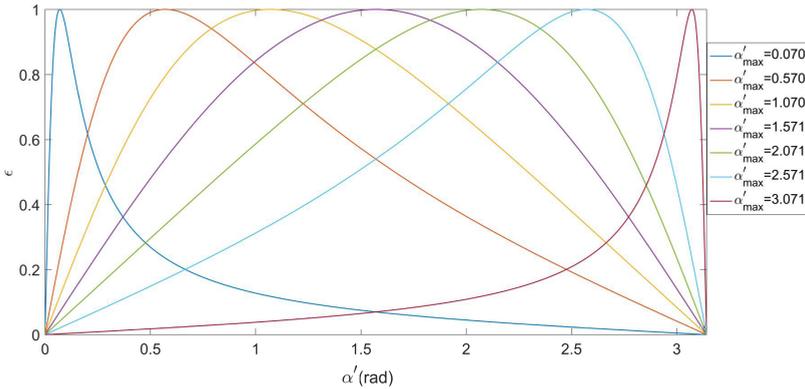


Figura 4.3: Curvas de pico de intensidad normalizada para diferentes valores del desplazamiento real del patrón.

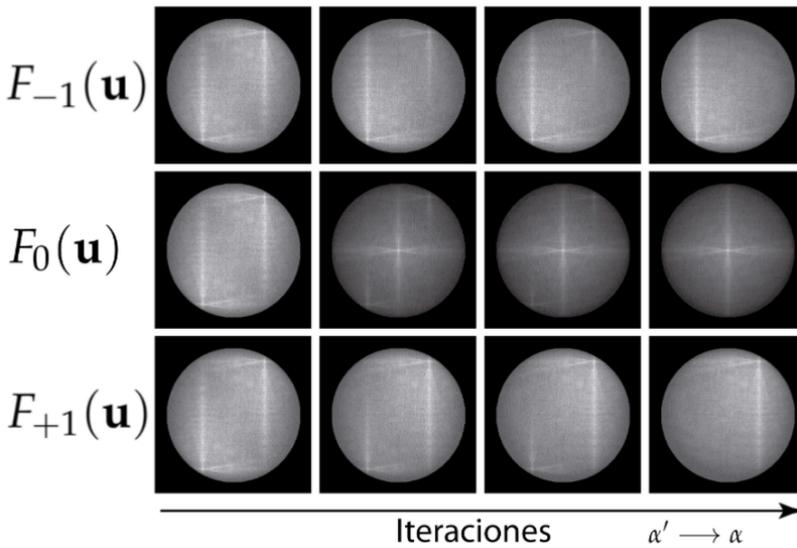


Figura 4.4: Ilustración del método de convergencia. Ejemplo de la convergencia de la solución para encontrar el valor que hace que la fase estimada (α') coincida con la real (α).

En esta ilustración se puede comprobar cómo a medida que las fases estimadas se van aproximando a los valores de las fases reales, las componentes frecuenciales se van desligando

quedando un único origen de frecuencias referente a una de las componentes.

Hay que decir que la precisión en la estimación de la fase depende del paso utilizado ($\Delta\alpha$) y que esta fase estimada solo será exactamente igual a la fase real cuando $\Delta\alpha \rightarrow 0$. Una vez desarrollado el método propuesto analíticamente, pasamos a corroborar este análisis de diversas formas empezando por un estudio mediante simulaciones.

4.3 SIMULACIÓN DEL PROCESO DE CAPTURA Y RECONSTRUCCIÓN

A continuación vamos a verificar la eficacia del método en condiciones ideales mediante simulaciones. Estas simulaciones estarán ausentes de ruido (excepto el ruido electrónico debido al sensor que si se ha tenido en cuenta), poseerán un contraste del patrón máximo y la frecuencia de modulación del patrón estará próxima a la frecuencia de corte de la OTF. Para este fin, primero procederemos a realizar un estudio de la convergencia de la función de mérito que utilizamos, es decir, la maximización de la diferencia de intensidad entre los picos de los órdenes de las componentes normalizadas (DIPN). A continuación, utilizaremos este análisis para proponer un algoritmo iterativo eficiente en términos de tiempo de convergencia y lo compararemos con los métodos más utilizados para este fin.

Empezamos la simulación generando un objeto cuya finalidad es únicamente la de medir la resolución de la imagen en la reconstrucción final. Por este motivo será un objeto binario compuesto por una serie de rectángulos cuyo tamaño cambia a lo largo de la dirección diagonal, como podemos ver en la Fig. 4.5. Simulamos la iluminación del objeto con un patrón cosenoidal, a 45° de la dirección horizontal, con una frecuencia espacial del 92% respecto de la frecuencia de corte de la OTF del sistema óptico.

El espectro frecuencial resultante tras la transformada de Fourier del objeto iluminado con un patrón cosenoidal, se filtra

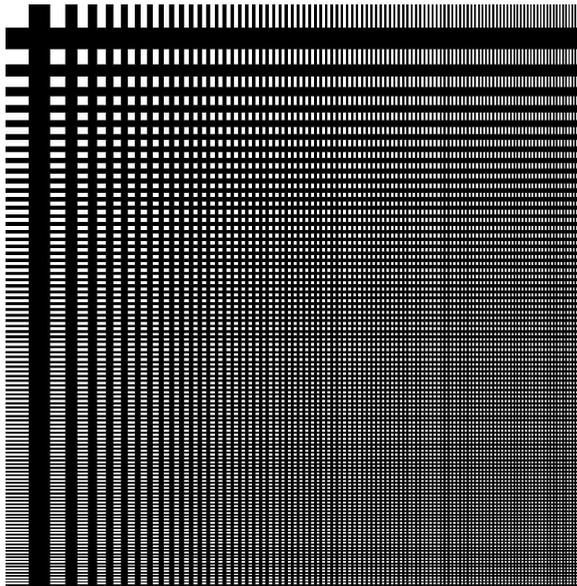


Figura 4.5: Objeto generado computacionalmente para la comprobación simulada de la determinación del desplazamiento del patrón del sistema de iluminación estructurada. El objeto consiste en una serie de rectángulos cuyo tamaño se va reduciendo de izquierda a derecha y de arriba a abajo.

haciendo uso de una función OTF simulada y, después, se realiza otra transformada de Fourier para producir la distribución de intensidades de la imagen simulada, tal y como muestra la Ec. 3.10. En la Fig. 4.6 podemos ver tanto la distribución de intensidades del objeto iluminado sobre el plano del sensor (a), como su transformada de Fourier (b). En esta simulación introducimos un desplazamiento del patrón cosenoidal conocido para capturar las tres imágenes elementales requeridas para obtener el resultado final tras su procesado digital. Todas las simulaciones que hemos realizado estaban afectadas por ruido de Poisson para tener en consideración el ruido electrónico producido por el sensor. Para comprobar la validez del método propuesto (DIPN), hemos realizado distintas simulaciones variando el desfase introducido por el desplazamiento del patrón entre 0 y π .

Teniendo en consideración estos aspectos, las imágenes elementales simuladas se introducen en el algoritmo propuesto,

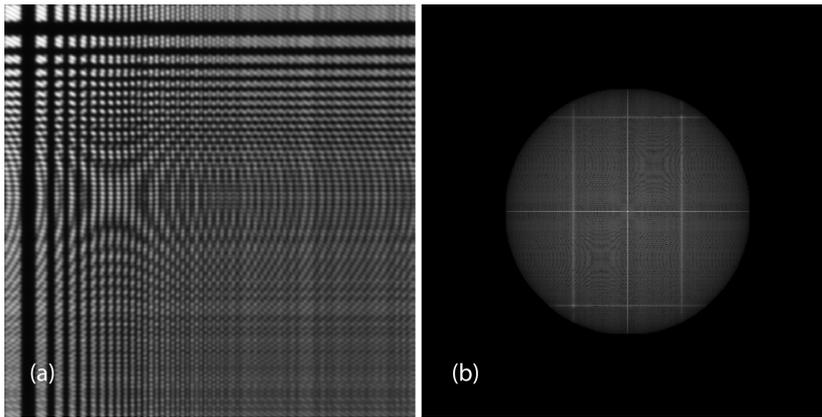


Figura 4.6: (a) Distribución de intensidades en el plano imagen del sistema de captura SIM, del objeto que aparece en la Fig. 4.5, (b) transformada de Fourier de la imagen que aparece en (a)

diseñado para extraer la estimación de la fase debida al desplazamiento del patrón. A partir de la simulación de intensidades en el plano del sensor en el espacio imagen, realizamos su transformada de Fourier y, tras considerar el tamaño finito de la OTF del sistema, aplicamos un algoritmo de detección de picos. Así determinamos la posición tanto del orden 0, que ha de estar en el centro geométrico de la transformada de Fourier de la imagen, como de los ordenes ± 1 , cuya distancia respecto al orden cero está directamente relacionada con la frecuencia de modulación del patrón cosenoidal de franjas tal como se aprecia en la Fig. 4.2. Hemos de tener en cuenta que la precisión a la hora de detectar la posición puede mejorarse simplemente realizando un *zero-padding* en las imágenes elementales [33]. De modo que, para un valor determinado del desplazamiento real del patrón, obtenemos un conjunto de soluciones aportadas por la expresión Ec. 4.6, cambiando iterativamente el valor de la fase estimada. Realizamos este proceso de determinación de la fase estimada dando valores a esta fase estimada entre $[0, \pi]$, utilizando un paso entre las distintas fases estimadas de $\Delta\alpha = 10^{-6}$ rad. Para cada uno de los valores de las fases estimadas medimos la intensidad de los picos en una de las componentes, por ejemplo $m = 1$, para

calcular los valores de la intensidad en el pico de la componente que estamos desligando (i_{pico}^{+1}) y la intensidad en el residuo de la otra componente que está desapareciendo (i_{resi}^{+1}). Cabe decir que este procedimiento es análogo a medir el pico de una de las componentes y el residuo de la otra componente, es decir, i_{pico}^{+1} y i_{resi}^{-1} . Introducimos estos valores en la Ec. 4.7 para generar la curva $\epsilon(\alpha')$. Este proceso se repite para distintos valores del desplazamiento real del patrón para generar las distintas curvas $\epsilon(\alpha')$. Las curvas resultantes se pueden ver en la subfigura superior de la Fig. 4.7.

Cada una de las curvas representadas en la Fig. 4.7(arriba) posee un máximo que se corresponde con el valor real del desplazamiento del patrón, tal y como predecía nuestro cálculo analítico en la Ec. 4.12. Para demostrar que los valores otorgados por nuestro algoritmo de las fases estimadas coinciden completamente con los desplazamientos del patrón reales, medimos los valores estimados y los comparamos con los valores reales. Como resultado de estas medidas comparativas se extrae que las fases estimadas coinciden con los valores simulados con una precisión que depende estrictamente de la precisión del paso utilizado a la hora de cambiar entre las distintas fases ($\Delta\alpha$), tal como se muestra en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Valor de la fase estimada (α') devuelta por el algoritmo propuesto para distintos pasos ($\Delta\alpha$) entre los posibles valores de estas fase estimadas. $\alpha = \pi/2 \approx 1,57079$

$\Delta\alpha$	α'
0.1	1.6
0.01	1.57
0.001	1.571
0.0001	1.5708

Las curvas de maximización de pico de intensidad normalizadas que aparecen en la Fig. 4.7(arriba) muestran claramente diferentes formas dependiendo del valor real de la fase, tal y

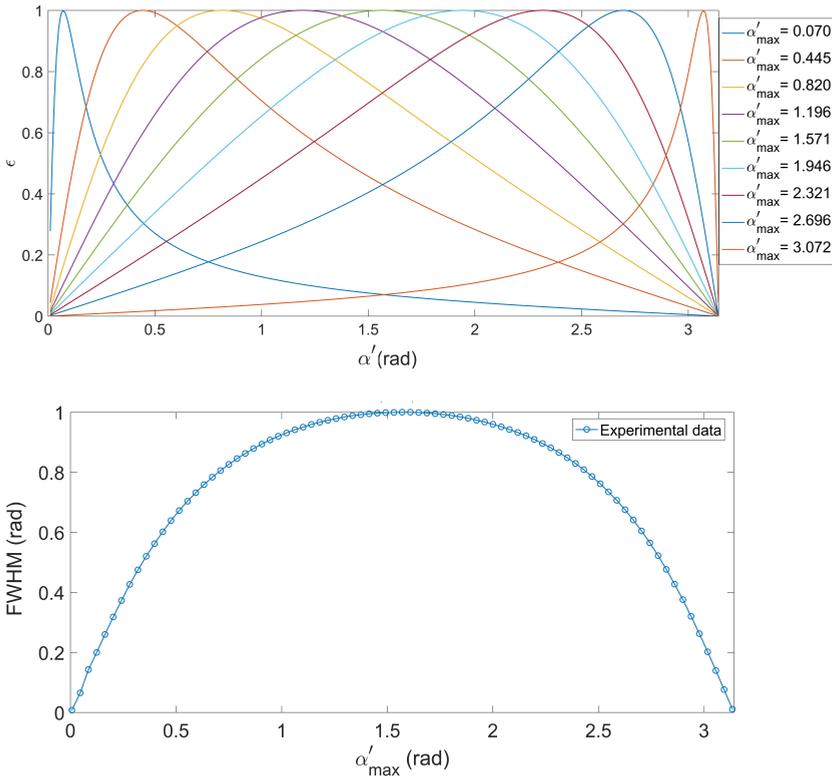


Figura 4.7: Representaciones gráficas para la determinación de la fase real del desplazamiento del patrón de iluminación simuladas. (arriba) distintas curvas simuladas variando la fase real del desplazamiento del patrón en las que el valor máximo de cada curva devuelve el valor estimado por el algoritmo, **(abajo)** medida de la anchura a media altura de cada una de las curvas representadas en la subfigura superior con fases estimadas entre 0 y π .

como predecían las curvas calculadas en el apartado analítico. Estas curvas son simétricas para valores próximos a $\pi/2$ y se van haciendo más estrechas y asimétricas a medida que el valor de la fase se aleja de este valor. Podemos asumir que las soluciones obtenidas por el método propuesto, son más estables y menos sensibles a errores experimentales cuando la curva es más ancha. La explicación a este razonamiento se basa en el hecho que para

una curva ancha el error en la determinación del máximo de $\epsilon^m(\alpha')$ es menos relevante que para curvas más estrechas. En base a esta explicación, medimos las anchuras a media altura (FWHM) de cada una de las curvas con un α distinta y representamos estos valores en función de la fase estimada. La curva resultante muestra un máximo perfectamente definido, como se puede observar en la Fig. 4.7 (abajo). Los valores experimentales obtenidos se ajustaron a un polinomio de grado n , siendo $n = 4$ el grado del polinomio que ajustaba con mayor precisión estos valores, con un coeficiente de correlación $R^2 = 0,9993$. A partir de la curva ajustada, el valor máximo de la anchura a media altura estimada se obtiene para $\alpha = \pi/2$.

Podemos concluir que para desplazamientos del patrón correspondientes a un desfase de $\pi/2$, las soluciones proporcionadas por la Ec. 4.6 son las más estables para el método propuesto. Se vuelven más inestables a medida que el valor real del desfase difiere de este valor. Es por este motivo que a partir de ahora cuando necesitemos realizar algún desplazamiento de fase del patrón de iluminación, procuraremos que esté próximo a este valor óptimo en nuestro método de $\alpha = \pi/2$.

4.3.1 Velocidad del algoritmo

Hasta ahora hemos hecho un estudio analítico donde hemos realizado los razonamientos y explicaciones de forma sencilla y ordenada. Sin embargo, la velocidad del algoritmo puede ser fácilmente optimizada. En lugar de calcular cada uno de los valores de la curva $\epsilon(\alpha')$, podemos empezar con una precisión baja, por ejemplo $\Delta\alpha = \pi/4$ hasta encontrar el valor máximo, y entonces reducir el paso y buscar cerca del máximo obtenido en el paso anterior. Se repite este procedimiento hasta la mínima precisión deseada. Aplicando este método, se obtiene una precisión en la fase de $\Delta\alpha = 10^{-6}$ en 64 iteraciones. El código ha sido implementado en Matlab© y ejecutado en un ordenador i7-6700HQ (2.60GHz) con 8GB de RAM en el cual el tiempo de cómputo para la determinación de la fase ha sido de 2.03 s. Implementamos el algoritmo basado en la correlación-cruzada (MCC) presentado

en [29], y, para una precisión del paso determinada e igual en ambos casos, obtuvimos un tiempo de cómputo de 7.01 s. Es notable hacer ver que este tiempo representa la aplicación del algoritmo para una única dirección de la proyección del patrón y este proceso debe hacerse para tres direcciones distintas con el fin de lograr una mejora en resolución isótropa. En la Fig. 4.8 se representa el tiempo de cómputo en relación a la precisión en el desplazamiento del patrón de iluminación estimado para el algoritmo iterativo de la correlación cruzada al igual que para nuestro método. Como puede verse, aunque ambos algoritmos

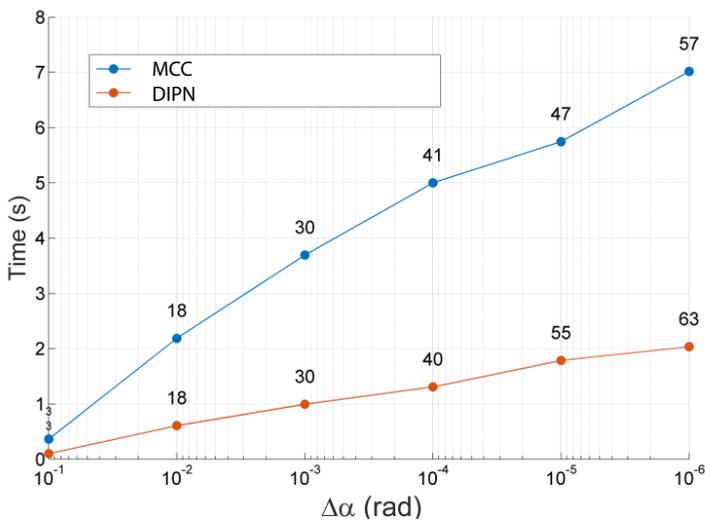


Figura 4.8: Comparación del tiempo de cómputo del algoritmo en la detección de la fase. Comparación del tiempo de cómputo necesario para la estimación del desplazamiento de fase para una única dirección en la proyección del patrón sobre la muestra para diferentes precisiones en la determinación ($\Delta\alpha$) entre nuestro método y el método de la correlación cruzada. El número que aparece sobre los puntos de la gráfica corresponde al número de iteraciones necesarias para la precisión correspondiente.

convergen aproximadamente en el mismo número de iteraciones, el algoritmo propuesto es más de 3 veces más rápido que el método basado en la correlación cruzada, que de hecho es

el método más utilizado hasta hoy en día para determinar el desplazamiento de fase del patrón.

4.3.2 Reconstrucción final

Por último, dentro de la validación de nuestro método mediante simulaciones, se llevo a cabo una simulación completa con su respectiva reconstrucción de un sistema SIM usando la imagen del objeto sintético generado para las demostraciones anteriores. Se aplicó el método propuesto para 3 direcciones del patrón de iluminación distintas con el fin de generar una resolución final isótropa. Para este fin se eligieron orientaciones de $(-60^\circ, 0^\circ, 60^\circ)$ usando el valor óptimo del desplazamiento de fase determinado con anterioridad $(-\pi/2, 0, \pi/2)$ y un paso mínimo en la iteración de $\Delta\alpha = 0,001$. Hay que tener en cuenta que el paso en la iteración puede tomar cualquier valor pero hemos considerado este valor mínimo por obtener un error final en la fase inferior al 1%. Las distribuciones en intensidad de la imagen convencional así como la reconstrucción de las imágenes de SIM y sus respectivas transformadas de Fourier se muestran en la Fig. 4.9.

En el espectro de Fourier de las imágenes de SIM no se observa ninguna imperfección tal como se espera cuando la estimación del desplazamiento del patrón es precisa. La frecuencia de modulación del patrón en este caso está muy próxima a la frecuencia de corte de la OTF del sistema óptico (alrededor del 95% de la frecuencia de corte). La reconstrucción muestra una mejora visual en la resolución lateral de la imagen SIM respecto de la convencional. Una vez medida esta mejora en resolución, se obtuvo un resultado de 1.93 veces la resolución obtenida en la imagen convencional.

Como ya comentamos al inicio de este capítulo, vamos a mostrar cómo afecta al resultado final una errónea determinación de la fase introducida por el desplazamiento del patrón. En la Fig. 4.10 mostramos una gráfica en la que hemos representado como varía la reconstrucción final de un test de resolución USAF 1951® en función del error en la determinación de la fase com-

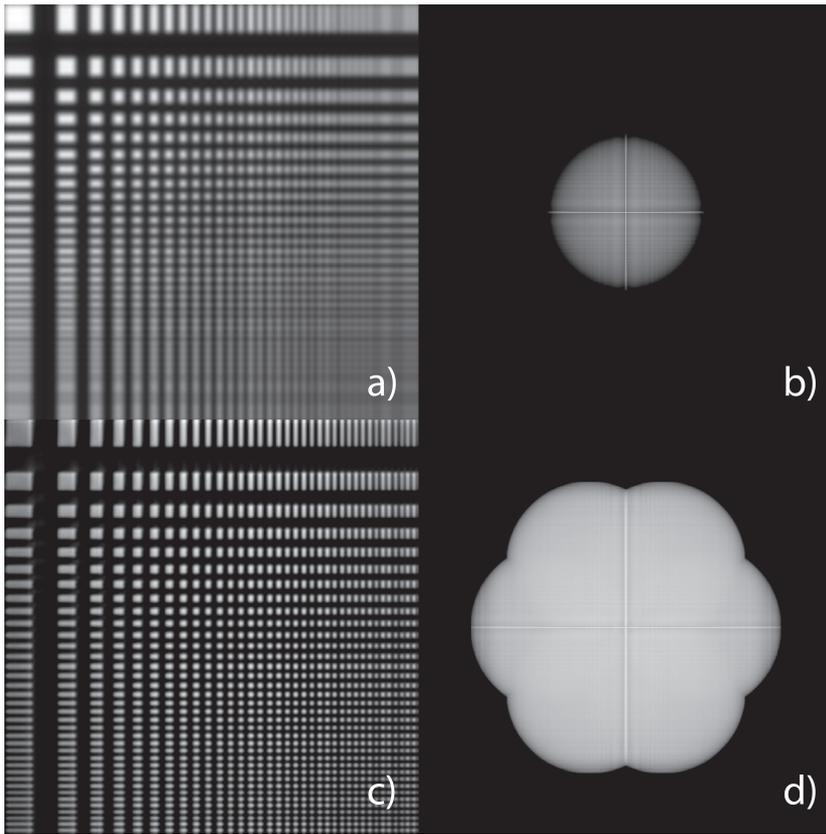


Figura 4.9: Simulaciones sistema convencional y SIM. Comparación entre la imagen convencional simulada del objeto binario (a) con su correspondiente espectro de frecuencias (b), y el resultado SIM obtenido a partir del algoritmo propuesto (c) y (d).

parándolo en cada caso con una reconstrucción realizada con la fase correcta. Para ello hemos realizado una reconstrucción con nuestro algoritmo utilizando la fase real. Una vez tenemos el resultado correcto, hemos realizado distintas reconstrucciones introduciendo errores en la determinación de la fase cada vez mayores, desde un 0% de error respecto de la fase real aumentando el valor del error hasta alcanzar un error del 20% que equivale a un error en la fase estimada de 0,3 rad. En el eje vertical de esta gráfica hemos representado la correlación entre la reconstrucción

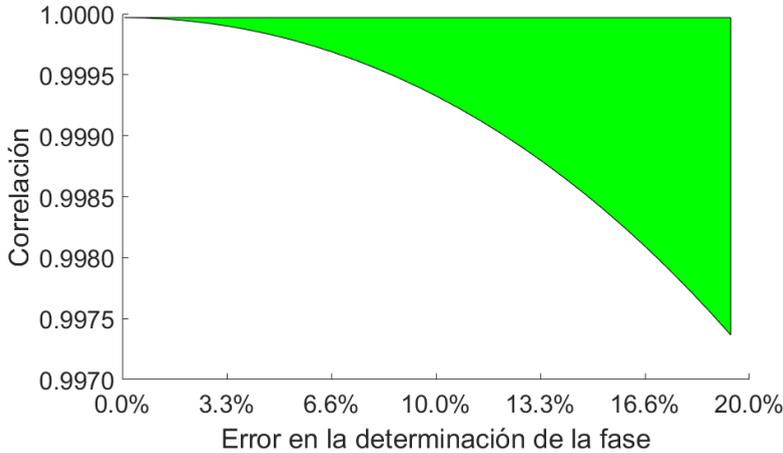


Figura 4.10: Variación del resultado final esperado en función del error en la determinación de la fase estimada. Gráfica que representa la correlación entre el resultado final exacto y el resultado final obtenido con fases erróneas cuyos valores están comprendidos entre un 0% y un 20% respecto del valor exacto de la fase real.

obtenida utilizando en cada caso la fase estimada errónea con la reconstrucción obtenida utilizando la fase real, es decir la correlación del resultado exacto con el resultado inexacto otorgado por la determinación equivocada en cada caso. En esta gráfica podemos observar como a medida que aumenta el error en la determinación de la fase linealmente, el resultado final difiere cada vez más del real. Esta relación confirma la necesidad de obtener una determinación precisa del desplazamiento del patrón para obtener un resultado final satisfactorio. En la Fig. 4.11 mostramos tanto las reconstrucciones finales como sus transformadas de Fourier para tres valores en el error de la determinación de la fase (0%, 9.4% y 19.8%). En el *zoom* realizado en las figuras se puede apreciar esas imperfecciones en la reconstrucción final, que aumentan a medida que aumenta el error en la determinación de la fase. En sus transformadas de Fourier todavía se aprecia con mayor claridad como las componentes no se han separado correctamente. Estas imperfecciones que aparecen en las image-

Porcentaje de error en la determinación de la fase estimada respecto de la fase real

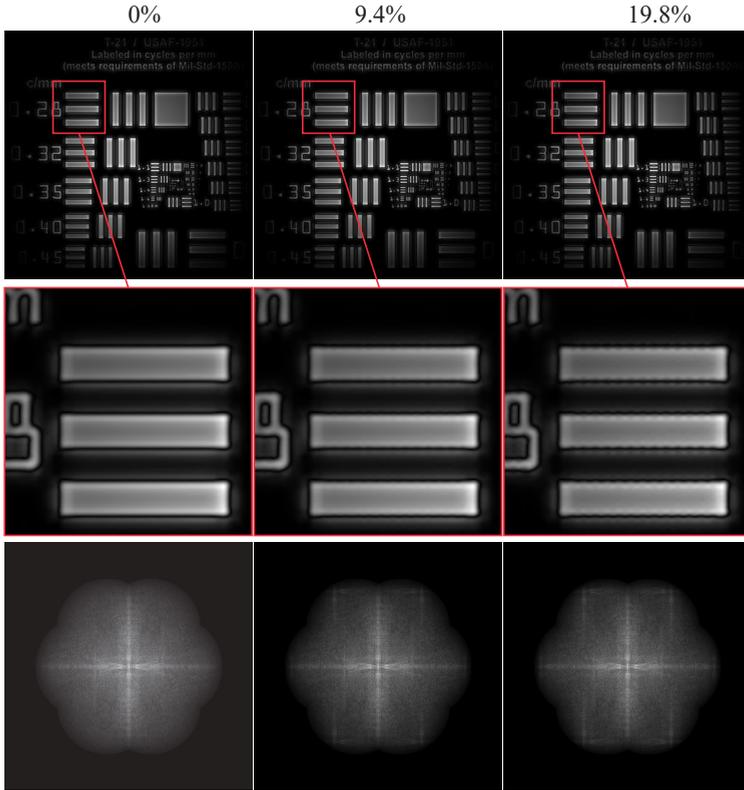


Figura 4.11: Reconstrucciones finales utilizando distintos valores erróneos en la determinación del desfase introducido por el patrón de iluminación. Reconstrucciones finales (fila superior), *zoom* representativo en el que se aprecia las imperfecciones en las reconstrucciones finales debidas a la errónea separación de las componentes frecuenciales (fila intermedia) y sus respectivas transformadas de Fourier (fila inferior).

nes del espacio de posiciones reflejan el patrón de iluminación que no ha sido eliminado correctamente.

De esta forma damos por finalizado el análisis simulado. Hasta ahora hemos verificado la efectividad de nuestro método tanto mediante el cálculo analítico como mediante simulaciones. A continuación vamos a corroborar estos resultados realizando

do reconstrucciones experimentales haciendo uso para ello de capturas reales.

4.4 ESTUDIO EXPERIMENTAL

A continuación vamos a analizar el comportamiento del método propuesto haciendo uso de capturas experimentales a partir de muestras reales. Para este fin construimos un sistema SIM como el que aparece esquemáticamente en la Fig. 4.12, compuesto por una serie de elementos que se describirán desde la salida de la fuente de iluminación hasta la captura de la imagen en el sensor de la cámara. El primer elemento que comprende nuestro

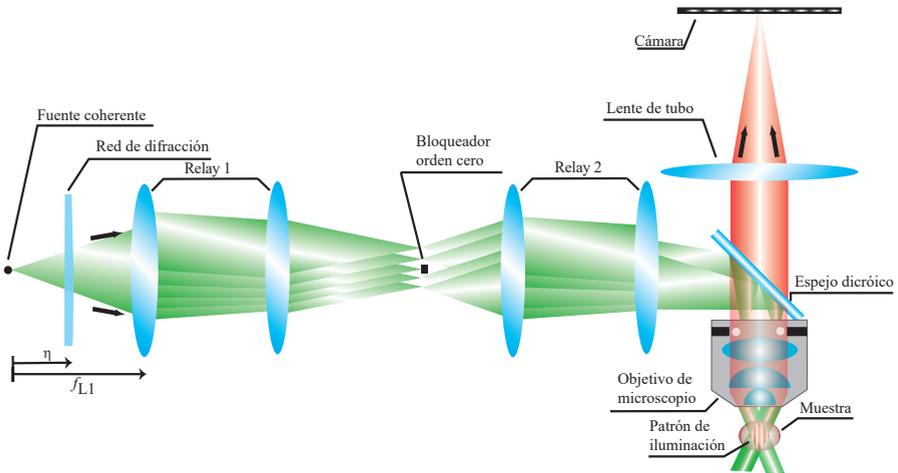


Figura 4.12: Esquema de un sistema SIM con red de difracción.

montaje es una fibra óptica acoplada a un láser monocromático de $\lambda = 488 \text{ nm}$. Esta fuente puntual se posiciona en el foco objeto de la primera lente de un sistema afocal telecentrico formado por 2 lentes de focal 50 mm. Entre la fuente puntual y la primera lente se situó una red de difracción de 50 lp/mm (Pasco®). En el plano imagen de la fuente a través del sistema afocal-telecentrico (o *relay*) focalizan las distintas ondas planas generadas por la red de difracción. Es en este plano en el que se filtra el orden cero de la red. Tras esto disponemos de otro *relay* óptico similar

al anterior con el que se conjugaba el plano donde acabamos de filtrar el orden cero de la red con el plano de la pupila del objetivo de microscopio. A continuación un objetivo de microscopio Olympus® con $M = 50\times$ (nominal) y $NA=0.5$. Los órdenes superiores se filtraron haciendo uso del tamaño finito del diafragma de apertura del objetivo de microscopio. Ya en el brazo de colección, una lente de tubo cuya focal es $f_{LT} = 200$ mm y por último una cámara Hamamatsu® OrcaFlash 4.0 sCMOS con 2048×2048 píxeles de $6.5 \mu\text{m}$ de tamaño. La iluminación de la red de difracción mediante una onda esférica genera una separación de los órdenes de difracción variable en función de la distancia a la que se encuentra la red de difracción de la fuente de iluminación. Esto cambia la frecuencia de modulación del patrón de iluminación [21]. La red de difracción se montó sobre una montura rotatoria la cual era controlada por un motor mecánico *de pasos* (Owis®) para desplazar el patrón de franjas cosenoidal lateralmente y también para cambiar la orientación de la proyección del patrón y así poder generar una reconstrucción que aumente la resolución isotrópicamente. Se usó un filtro pasa-alta ($\lambda_{cut} = 530$ nm) para filtrar la luz proveniente del láser en el camino de colección permitiendo así el paso de longitudes de onda de emisión de la muestra tras la excitación con la longitud de onda del láser.

Mediante este montaje vamos a comprobar la validez del método experimentalmente. Para ello usamos como muestra fibras de algodón tintadas de forma que cada punto de las fibras tinto emitiera incoherentemente respecto del resto. Se capturaron series de imágenes elementales SIM para distintos desplazamientos del motor antes descrito. Una de las imágenes elementales capturadas por el sistema y su correspondiente transformada de Fourier se muestran en la Fig. 4.13.

Para cada uno de los sets de imágenes elementales, calculamos las curvas de la diferencia de intensidad de los picos normalizada. Cada uno de los máximos de estas curvas nos proporciona una estimación de la fase mediante el método propuesto. Entonces, representamos los valores de los pasos del motor frente a los valores de la estimación de la fase obtenida, la cual muestra un comportamiento lineal como se esperaba. Se puede observar este

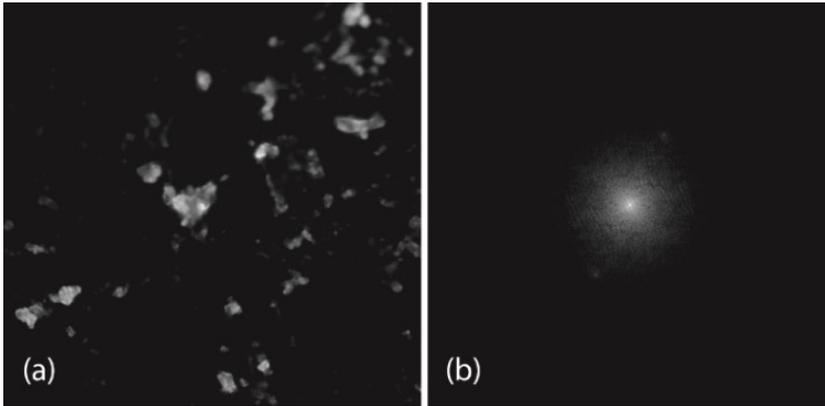


Figura 4.13: **Imagen elemental.** (a) imagen elemental de una muestra de fibras de algodón tintadas obtenida con nuestro montaje SIM y (b) su respectiva transformada de Fourier.

comportamiento en la Fig. 4.14 (izquierda). A continuación

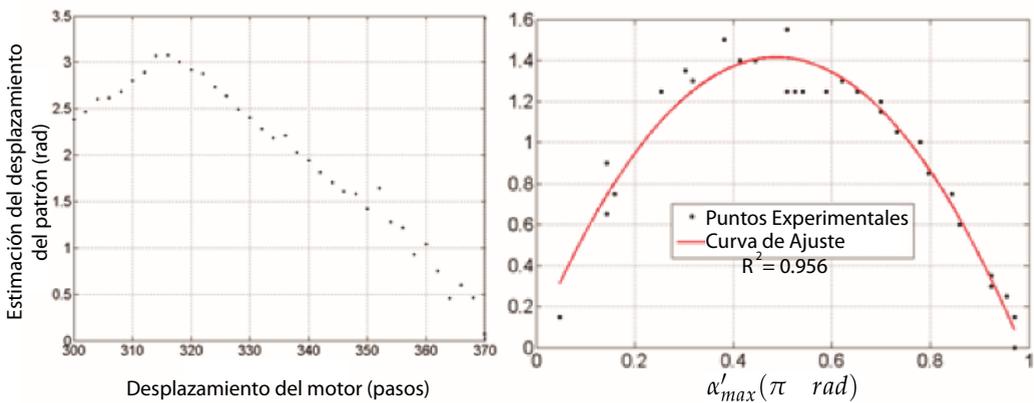


Figura 4.14: **Picos de intensidad normalizada experimentales.** (izquierda) Estimación del desplazamiento del patrón en términos de los pasos del motor. (Derecha) Medida de la anchura a media altura de cada una de las curvas experimentales de la determinación de la fase estimada.

se midió la anchura a media altura de las curvas de intensidad normalizadas y se representaron estos valores en función de la fase estimada. En la parte derecha de la Fig. 4.14 se puede apreciar este ajuste. El ajuste muestra un comportamiento polinomial de

cuarto orden, con un coeficiente de correlación $R^2 = 0,956$ y con un máximo en $\pi/2$. Estos resultados coinciden perfectamente con las conclusiones extraídas en la parte de la simulación. Hay que tener en cuenta que el contraste del patrón (Fig. 4.13) es relativamente bajo (alrededor de 0.27), pero como se esperaba, aún así podemos determinar con precisión el desplazamiento del patrón.

Con el montaje presentado podemos realizar una prueba de concepto para demostrar la mejora en resolución utilizando para ello un objetivo de microscopio de baja apertura numérica, $NA=0.1$ y $M = 4 \times$ (nominal). Como muestra utilizaremos un test USAF 1951® con el que nos es muy sencillo comparar y comprobar las resoluciones finales. En estas condiciones, realizamos una reconstrucción completa con SIM aplicando el método DIPN para determinar el desplazamiento del patrón capturando un conjunto de imágenes con un desplazamiento del patrón desconocido para tres orientaciones distintas del patrón proyectado rotadas en pasos de 60° . En la Fig. 4.15 se puede apreciar la comparación entre la reconstrucción SIM obtenida tras aplicar el método propuesto en la determinación de la fase del desplazamiento del patrón y la imagen obtenida utilizando un microscopio convencional. Es importante hacer notar que no existe ningún tipo de irregularidad ni en la reconstrucción final de la imagen SIM ni, sobretodo, en su transformada de Fourier. Este último apunte es importante ya que esto es lo que nos asegura que la fase estimada coincide exactamente con la fase real del desplazamiento. En la comparación de las reconstrucciones se obtuvo una mejora de 5 grupos entre los test de resolución de la imagen SIM y de la convencional, lo cual equivale a un aumento en resolución de 1.8 aproximadamente.

Por último, hicimos uso de una serie de reconstrucciones de unos archivos públicos disponibles a través de la base de datos publicada por el Proyecto *fairSIM* (<https://www.fairsim.org/>, SLM-SIM 200 nm-Tetraspeck 680 nm), para demostrar la validez del método con imágenes en las que los parámetros de adquisición nos sean completamente desconocidos. Estas imágenes estaban capturadas haciendo uso de cuatro direcciones distintas de la proyección del patrón. En la Fig. 4.16 se aprecia perfecta-

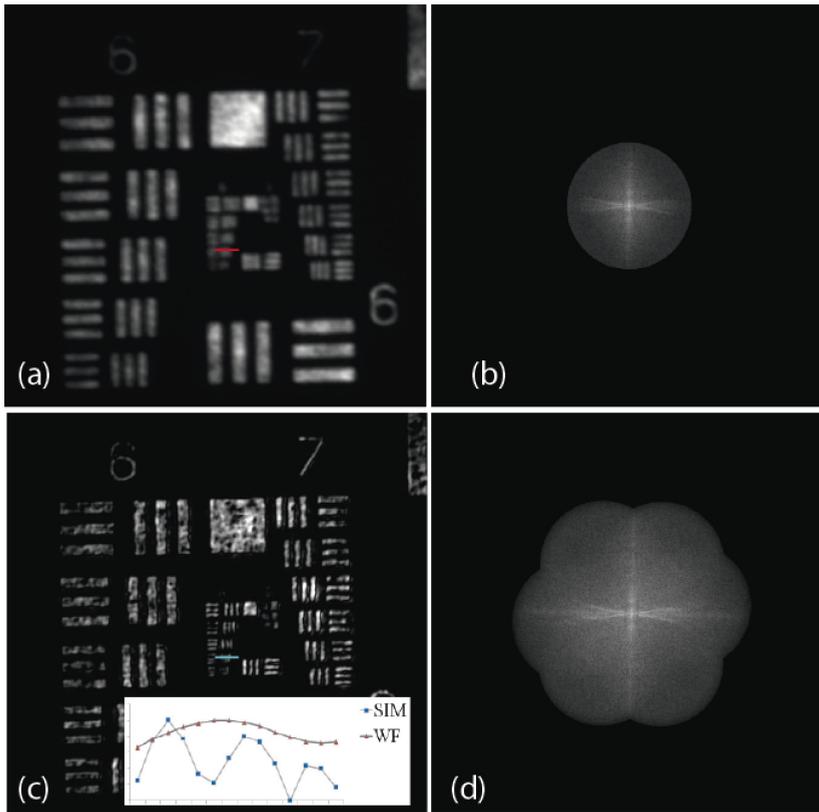


Figura 4.15: Reconstrucción experimental SIM. Distribución de intensidades de la reconstrucción convencional (a) y su respectiva transformada de Fourier (b). Distribución de intensidades de la reconstrucción SIM (c) y su espectro (d) utilizando el método propuesto. Se muestra un perfil del último grupo resuelto tanto en la reconstrucción convencional como en la de SIM.

mente que tras la reconstrucción completa, el método propuesto obtiene una imagen final sin ningún tipo de irregularidad, así como en su transformada de Fourier. Tal y como se comparó en los ejemplos anteriores, se puede apreciar perfectamente el aumento en resolución utilizando el método propuesto respecto de la imagen final obtenida en un microscopio con un sistema óptico convencional.

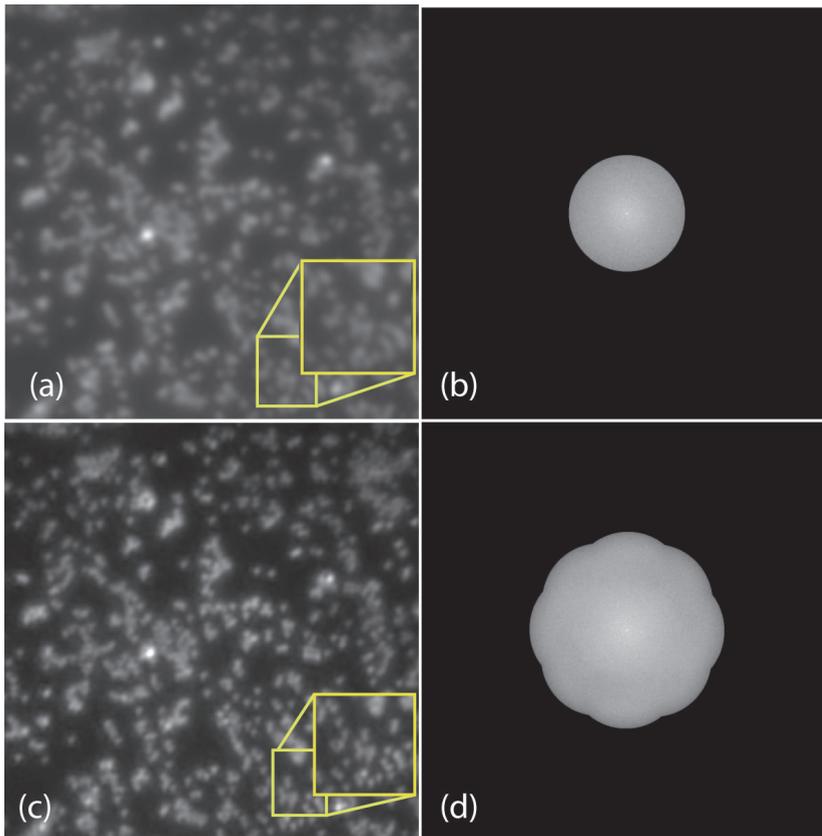


Figura 4.16: Reconstrucción realizada usando el método propuesto para un conjunto de datos publicados por el Proyecto *fairSIM* (a) Distribución de intensidades tras la reconstrucción convencional y (b) su respectiva transformada de Fourier. (c) Distribución de intensidades tras la reconstrucción SIM y (d) su respectiva transformada de Fourier.

En el siguiente apartado veremos lo que ocurre cuando el desplazamiento del patrón no es simétrico.

4.5 EXTENSIÓN A DESPLAZAMIENTOS DE FASE ASIMÉTRICOS

En el apartado anterior hemos visto la necesidad de determinar con precisión el desplazamiento de fase del patrón de iluminación para conseguir unos resultados finales satisfactorios. Para ello hemos validado el método mediante la demostración teórica, la verificación simulada y por último la verificación experimental de su validez. No obstante, en aras de facilitar la comprensión al lector de este extenso análisis del apartado anterior, se ha estado considerando un desplazamiento simétrico del patrón. En la práctica esto no ocurre así. De hecho, el razonamiento aplicado en el anterior apartado acerca de la incertidumbre en el desplazamiento del patrón debida al movimiento, usualmente mecánico, del elemento que sujeta la red de difracción, se puede aplicar igualmente a la hora de realizar cada uno de los desplazamientos dentro de la captura de las 3 imágenes necesarias. Es decir, el desfase introducido a la hora de desplazar el patrón en general será de $\phi = (\phi_0 - \alpha, \phi_0, \phi_0 + \beta)$, siendo ϕ_0 el desfase inicial. Dado que la forma en la que se define el desplazamiento de fase del patrón es arbitraria debido a que depende del origen que elijamos como primera posición de la fase, podemos reelegir el origen de fases e ignorar la fase inicial simplemente haciendo $\phi_0 = 0$, lo cual no afecta en ningún caso al tratamiento matemático.

4.5.1 Análisis teórico

A partir de las indicaciones anteriores, podemos desarrollar un análisis teórico similar al del apartado anterior. Así, consideremos un sistema SIM en el que se capturan 3 imágenes con sus respectivos desfases. Podemos escribir el sistema de ecuaciones de la siguiente manera,

$$R' \begin{pmatrix} \hat{F}_{-1} \\ \hat{F}_0 \\ \hat{F}_{+1} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \tilde{I}_{-\alpha} \\ \tilde{I}_0 \\ \tilde{I}_{+\beta} \end{pmatrix}, \quad (4.14)$$

siendo

$$R' = \begin{pmatrix} e^{i\alpha'}/2 & 1 & e^{-i\alpha'}/2 \\ 1/2 & 1 & 1/2 \\ e^{-i\beta'}/2 & 1 & e^{i\beta'}/2 \end{pmatrix} \quad (4.15)$$

Dado que ahora tenemos dos desplazamientos del patrón posiblemente distintos, el sistema de ecuaciones nos dará una estimación de las soluciones que solo será exacta cuando las fases estimadas sean iguales a las fase reales aplicadas al desplazamiento del patrón. Es decir, cuando $\alpha' = \alpha$ y además $\beta' = \beta$.

Ahora se puede definir una función de mérito bidimensional en lugar de la unidimensional que teníamos en el anterior análisis. Esta función representará una superficie en la que el máximo de la función nos proporcionará las fases estimadas (α' y β') que determinarán los valores reales de los desplazamientos de fase del patrón de iluminación. Nuestra propuesta de función DIPN tendrá la siguiente forma

$$\epsilon^m(\alpha', \beta') = \frac{i_{pico}^m(\alpha', \beta') - i_{resi}^m(\alpha', \beta')}{i_{pico}^m(\alpha', \beta') + i_{resi}^m(\alpha', \beta')}, \quad (4.16)$$

con $m = \pm 1$. Resolviendo el sistema de ecuaciones expresado en la Ec. 4.14 obtenemos como determinante, $\det\{R'(\alpha', \beta')\} = i[\sin \alpha'(\cos \beta' - 1) + \sin \beta'(\cos \alpha' - 1)]$. Igual que comentamos en la sección del caso unidimensional, este determinante ha de ser distinto de cero para que el sistema sea compatible determinado y por tanto $\alpha' \neq p\pi$ y $\beta' \neq q\pi$, siendo p y q números enteros. De acuerdo con esto, la solución para la componente frecuencial +1 se puede expresar de la siguiente forma

$$\hat{F}_{+1}(\mathbf{u}) = \frac{\tilde{I}_{-\alpha}(\mathbf{u})(e^{i\beta'} - 1) + \tilde{I}_0(\mathbf{u})(e^{-i\alpha'} - e^{i\beta'}) + \tilde{I}_{+\beta}(\mathbf{u})(1 - e^{-i\alpha'})}{i[\sin \alpha'(\cos \beta' - 1) + \sin \beta'(\cos \alpha' - 1)]}. \quad (4.17)$$

Sustituyendo las 3 imágenes capturadas en la ecuación anterior obtenemos la siguiente expresión

$$\hat{F}_{+1}(\mathbf{u}) = [K(\alpha', \beta') \cdot \tilde{O}(M(\mathbf{u} - \hat{\mathbf{A}}^j)) + L(\alpha', \beta') \tilde{O}(M(\mathbf{u} + \hat{\mathbf{A}}^j))] |H(\mathbf{u})|.$$

$$(4.18)$$

donde

$$K(\alpha', \beta') = \frac{e^{-i\alpha} - e^{i\alpha'} - e^{i\beta} + e^{-i\beta'} + e^{i(\alpha'+\beta)} - e^{-i(\alpha+\beta')}}{i[\sin \alpha'(\cos \beta' - 1) + \sin \beta'(\cos \alpha' - 1)]},$$

$$L(\alpha', \beta') = \frac{e^{-i\alpha} - e^{-i\alpha'} - e^{i\beta} + e^{i\beta'} + e^{-i(\alpha'-\beta)} - e^{-i(\alpha-\beta')}}{i[\sin \alpha'(\cos \beta' - 1) + \sin \beta'(\cos \alpha' - 1)]}.$$

$$(4.19)$$

Como se puede ver en la Ec. 4.18, no existe ningún tipo de contribución del orden cero de la iluminación estructurada a la solución estimada de la componente +1, independientemente de los valores del desplazamiento de fase, tal y como ocurría en el caso unidimensional. Sustituyendo $i_{pico}^{+1} = |\hat{F}_{+1} (+\hat{\mathbf{A}}^j)|$ y $i_{resi}^{+1} = |\hat{F}_{+1} (-\hat{\mathbf{A}}^j)|$ obtenemos,

$$i_{pico}^{+1}(\alpha', \beta') = |K(\alpha', \beta') \cdot \tilde{\mathcal{O}}(\mathbf{0}) + L(\alpha', \beta') \cdot \tilde{\mathcal{O}}(2\mathbf{A}^j)| |H(-\hat{\mathbf{A}}^j)|$$

$$i_{resi}^{+1}(\alpha', \beta') = |L(\alpha', \beta') \cdot \tilde{\mathcal{O}}(\mathbf{0}) + K(\alpha', \beta') \cdot \tilde{\mathcal{O}}(-2\mathbf{A}^j)| |H(\hat{\mathbf{A}}^j)|,$$

$$(4.20)$$

Dado que en el conjunto de imágenes elementales que comprende una captura SIM, los valores de las fases reales (α y β) están fijados, nuestra función de mérito será una función bidimensional de la siguiente forma,

$$\epsilon(\alpha', \beta') = \frac{(|K(\alpha', \beta')| - |L(\alpha', \beta')|)(1 - \eta)}{(|L(\alpha', \beta')| + |K(\alpha', \beta')|)(1 + \eta)},$$

$$(4.21)$$

donde de nuevo podemos despreciar η por el mismo razonamiento realizado con anterioridad. Así, la función de mérito representa una superficie bidimensional para las variables de las fases estimadas α' y β' con una forma que depende de las fases

reales α y β . Calculando el gradiente y la matriz hessiana de la función de mérito de la Ec. 4.21 obtenemos que dicha función tiene un máximo absoluto. Este análisis se realizó calculando las derivadas parciales haciendo uso del programa Mathematica® y resolviendo el sistema de ecuaciones resultante. Obtuvimos como resultado que las derivadas parciales eran igual a cero cuando $\alpha' = \pm\alpha + 2n\pi$ y $\beta' = \pm\beta + 2n'\pi$, siendo n, n' números enteros cualesquiera. Se puede demostrar que el determinante de la matriz hessiana en estos puntos es siempre negativo, lo que supone la existencia de un máximo absoluto en las superficies cuando la fase estimada coincide con la fase real. Hay que tener en cuenta que los desplazamientos de fase son inferiores a 2π , lo cual nos permite eludir la multiplicidad de las soluciones. Para tal propósito, se muestran algunos ejemplos con diferentes valores de las fases reales en la Fig. 4.17

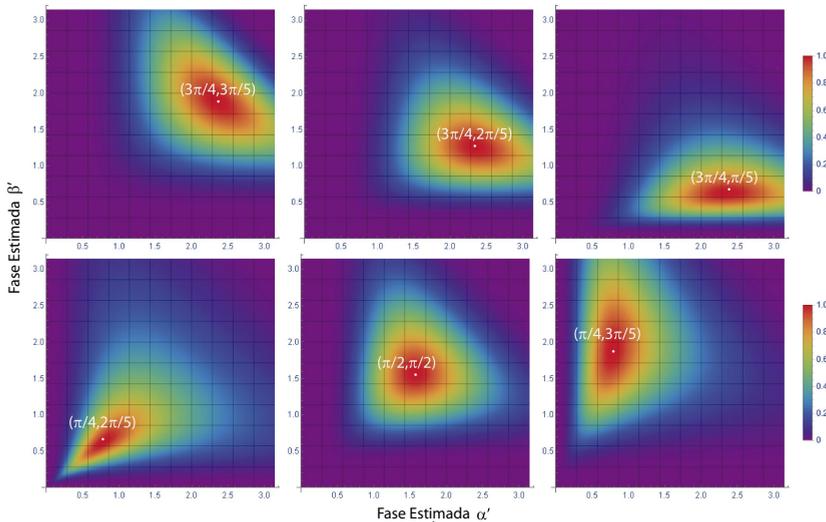


Figura 4.17: Superficies de picos de intensidad normalizados analíticas. Superficies teóricas $\epsilon(\alpha', \beta')$ para diferentes desplazamientos del patrón reales α y β . Los puntos marcados representan los valores máximos de cada superficie, los cuales coinciden con la estimación de las fases.

En esta Fig. 4.17 se puede observar que las superficies muestran un máximo cuando tanto la fase estimada como la real son

completamente iguales. De este modo, $\epsilon(\alpha', \beta')$ puede considerarse la función de mérito óptima. Cuanto mayor es el valor de la función de mérito más próxima será la estimación de las componentes a la solución del sistema.

A continuación vamos a ratificar este estudio. Primero simularemos un conjunto de nanoesferas en condiciones extremas de ruido, contraste del patrón de iluminación y alta frecuencia de modulación del patrón. Ante estas condiciones estudiaremos como se comporta la técnica propuesta en la determinación de la fase real del desplazamiento del patrón. A continuación realizaremos capturas y reconstrucciones con muestras reales para validar el método en este caso bidimensional.

4.5.2 Simulación

En esta sección vamos a validar el método propuesto utilizando para ello simulaciones en las que se determinan los desplazamientos de fase del patrón asimétricos, es decir, en los que, el desplazamiento real sea $\phi = (-\alpha, 0, \beta)$. Para este fin se generó un objeto que consiste en un conjunto de objetos puntuales donde el tamaño de cada objeto es 5 veces inferior a la PSF del sistema. En la Fig. 4.18 se puede ver el objeto, su distribución de intensidades en el espacio imagen del sistema óptico y el espectro de frecuencias de la imagen elemental.

Con este objeto se simula el proceso de captura. Para ello se simula una iluminación estructurada cuya frecuencia de modulación espacial es del 95 % de la frecuencia de corte de la OTF del sistema. El espectro resultante se filtra con una OTF simulada y se realiza la pertinente transformada de Fourier para generar la distribución de intensidades en el plano del sensor, como se describe en la Ec. 3.10. Para estudiar la tolerancia del método a la presencia de ruido se tuvo en cuenta factores determinantes como la ganancia del sensor, el ruido electrónico debido también al sensor, el ruido fotónico que no procede de los emisores incoherentes de la muestra y el número máximo procedente de la muestra directamente relacionado con la intensidad que se ilumina la muestra o con la emisión de los fluoroforos. Para

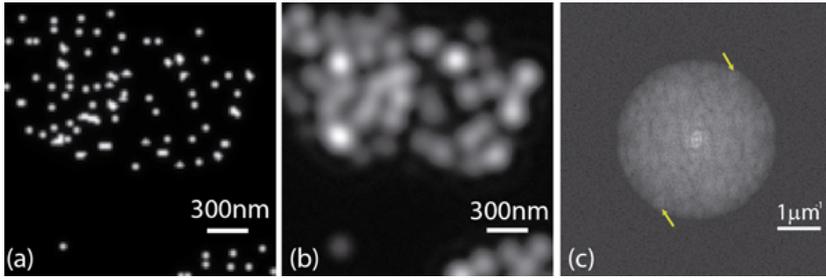


Figura 4.18: Proceso de simulación en un Microscopio por Iluminación Estructurada. (a) Objeto sintético que consiste en un conglomerado de puntos cuyo tamaño es 5 veces inferior a la PSF del sistema óptico. (b) Distribución de intensidades de la imagen elemental del objeto sintético simulado. (c) Transformada de Fourier. Las flechas muestran las posiciones de los distintos picos de las componentes.

ello se usó la siguiente expresión para simular las componentes experimentales [34]

$$I(\mathbf{x}) = g [I_p(\mathbf{x}) + n_p(\mathbf{x})] + n_r(\mathbf{x}), \quad (4.22)$$

donde $I_p(\mathbf{x}) = \bar{I}(\mathbf{x}) \cdot n_{max}$, siendo $\bar{I}(\mathbf{x})$ la versión normalizada de la irradiancia imagen teórica dada por la Ec. 3.7, y n_{max} el número máximo de fotones que llega de un punto de la muestra. En este modelo, g es la ganancia del sensor (se considera igual a la unidad para simplificar el análisis realizado), $n_p(\mathbf{x})$ fotones de ruido de detección y $n_r(\mathbf{x})$ el ruido de fondo de la cámara. Así, las imágenes elementales en términos del número de fotones se calcularon a partir de la Ec. 4.22. Todas las imágenes simuladas se verán afectadas tanto por ruido Gaussiano ($n_r(\mathbf{x})$) como de Poisson ($n_p(\mathbf{x})$). Para realizar una validación del método, se simuló la adquisición de 3 grupos de imágenes elementales con un número máximo de fotones proveniente de la muestra de $n_{max} = 2000$ y para unos desplazamientos de fase de $(\frac{3\pi}{4}, 0, \frac{3\pi}{5})$, $(\frac{3\pi}{4}, 0, \frac{\pi}{5})$ y $(\frac{\pi}{4}, 0, \frac{2\pi}{5})$. En la Fig. 4.18 se puede observar el campo capturado para una de las imágenes elementales simulada, así como de su transformada de Fourier. Se calculó la superficie de nuestra función de mérito $\epsilon(\alpha', \beta')$ para cada simulación con el

mismo paso utilizado en el cálculo unidimensional, $\Delta\alpha = \Delta\beta = 10^{-4}$. Las superficies obtenidas se pueden ver en la Fig. 4.19.

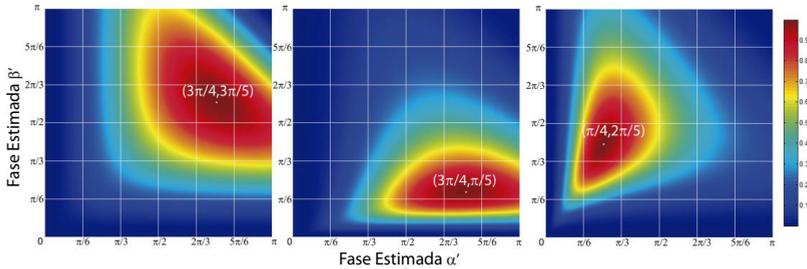


Figura 4.19: Superficies simuladas de los picos de intensidad normalizados. $\epsilon(\alpha', \beta')$ superficies calculadas a partir de la simulación para diferentes valores del desfase reales. Las superficies presentan un máximo absoluto cuando las posiciones de las fases estimadas coinciden con los valores reales de los desfases.

Mediante un simple análisis visual se puede comprobar la gran similitud existente entre estas últimas representaciones con los resultados analíticos obtenidos en la Fig. 4.17. Para confirmar este análisis visual, se midieron los valores máximos de cada superficie y se compararon con las fases simuladas. Como resultado, la fase estimada coincidía con la simulada con una imprecisión $\sigma(\alpha)$, $\sigma(\beta)$ que dependía estrictamente del paso aplicado en la determinación de la fase estimada ($\Delta\alpha$ y $\Delta\beta$), tal y como muestra la Tabla 4.2.

A continuación vamos a estudiar la validez del método en función del número máximo de fotones provenientes de la muestra, n_{max} . La idea de este estudio es reducir el número de fotones para ponernos en condiciones muy desfavorables en las cuales la muestra emite muy poco o en las que no se puede iluminar la muestra con altas exposiciones de luz debido al posterior *photobleaching* de ésta. En la Fig. 4.20 se pueden observar algunos ejemplos de este estudio en condiciones de bajo número de fotones en las imágenes elementales ($n_{max}=\{30, 100, 200\}$) con sus respectivas distribuciones de intensidad en el dominio frecuencial. De esta figura podemos concluir que, incluso en el caso más desfavorable

Tabla 4.2: Valores de las fases estimadas (α' , β') calculadas mediante el método propuesto para diferentes pasos en la determinación de la fase $\Delta\alpha$, $\Delta\beta$. Todos los valores están expresados en radianes.

$\Delta\alpha, \Delta\beta$	α	α'	$\sigma(\alpha)$	β	β'	$\sigma(\beta)$
0.01	$3\pi/4$	2.36	0.01	$3\pi/5$	1.88	0.01
0.001	$3\pi/4$	2.356	0.001	$3\pi/5$	1.885	0.001
0.0001	$3\pi/4$	2.3562	0.0001	$3\pi/5$	1.8849	0.0001

en el que la cantidad de fotones de ruido es del mismo orden de magnitud que la cantidad de fotones procedentes de la muestra, el algoritmo es capaz de detectar los picos de las componentes y determinar con exactitud la fase del desplazamiento para realizar la posterior reconstrucción. Es evidente que la baja cantidad de fotones procedentes de la muestra generan una reconstrucción final muy pobre. Como dato clarificador cabe decir que una captura típica en condiciones normales suele darse con un número de fotones provenientes de la muestra de 10^5 fotones.

Para comprobar la eficacia de nuestro método en condiciones de baja emisión de fotones procedentes de la muestra, lo comparamos con otros métodos ya existentes. Para ello, se aplicó el método propuesto (DIPN) y, paralelamente, el método de la correlación cruzada (MCC) [29] y el método basado en la medida de la fase en los picos (MFP) [27]. Para dicha comparación, se varió el número máximo de fotones proveniente de la muestra entre 10 y 3000 fotones añadiendo el correspondiente ruido de Poisson y un número máximo de 10 fotones de ruido Gaussiano. Se realizó el cálculo del error en la determinación del desplazamiento de fase a partir de las fases estimadas y las simuladas. Esta medida se repitió 30 veces para cada valor de los fotones máximos emitidos por la muestra n_{max} para tener un resultado promedio de las desviaciones, ya que para cada una de las medidas el ruido es aleatorio. Una media de las 30 medidas, así como

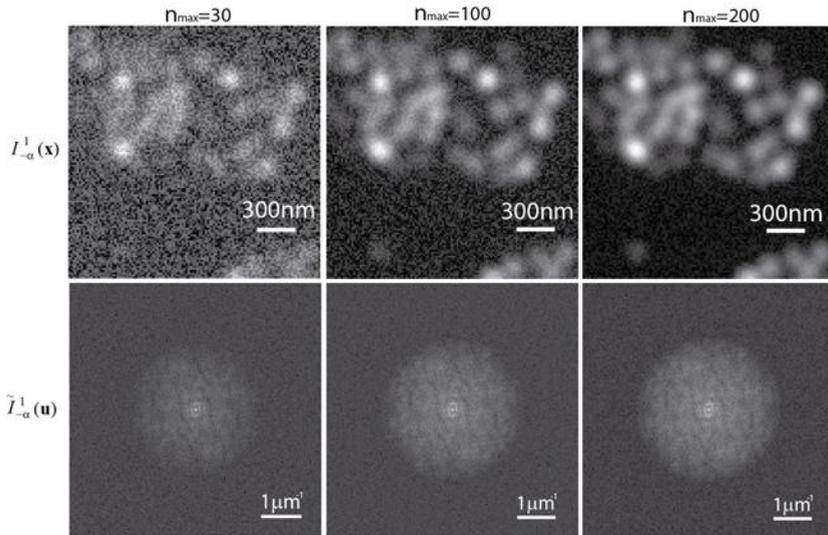


Figura 4.20: Simulación de imágenes elementales en presencia de ruido. (arriba) Distribuciones de intensidad de las imágenes elementales de la conglomeración de puntos para diferentes valores del máximo número de fotones procedente de la muestra ($n_{max} = \{30, 100, 200\}$). (abajo) Sus correspondientes transformadas de Fourier.

las desviaciones estandar, se representan en la parte izquierda de la Fig. 4.21

Como se puede observar, el error obtenido en la estimación del desplazamiento de fase para el método de MFP [27], en el que mide la fase en los picos frecuenciales secundarios, es relativamente alto en comparación con cualquiera de los otros dos. Además podemos ver que la precisión del algoritmo de MFP permanece constante en el rango de error de 10^{-2} rad. Por otro lado, tanto nuestro algoritmo como el algoritmo de la correlación cruzada MCC, muestran un comportamiento similar para un número de fotones emitido por la muestra relativamente bajo, $n_{max} > 500$. Adicionalmente, en la parte derecha de la Fig. 4.21 se ve una ampliación de la figura adyacente en la que se muestra el comportamiento de nuestro algoritmo y el algoritmo de las correlaciones cruzadas para condiciones de bajo número de fotones de la muestra, $n_{max} < 250$. En esta figura se puede ver como el com-

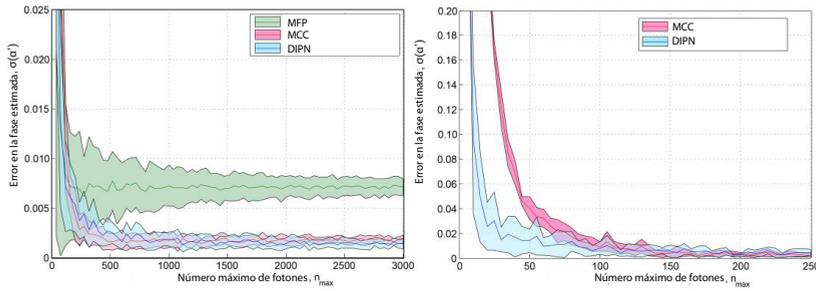


Figura 4.21: Comparación en la tolerancia al ruido. Comparación en el error de la fase estimada en función del número máximo de fotones entre los tres métodos: el de la determinación de la fase en los picos secundarios (MFP), el método de la correlación cruzada (MCC) y nuestro método propuesto (DIPN). Adicionalmente al ruido electrónico se ha añadido un ruido de fondo Gaussiano de 10 fotones a cada imagen simulada. Las bandas coloreadas representan la desviación estándar de errores.

portamiento de ambos algoritmos es muy similar para $n_{max} > 100$ fotones, en cambio, cuando el número de fotones proveniente de la muestra es menor a este valor el único algoritmo que devuelve una fase del desplazamiento satisfactoria es el DIPN. Este método proporciona estimaciones del desplazamiento del patrón precisas incluso cuando la relación entre el número máximo de fotones provenientes de la muestra y el número de fotones de ruido son muy similares ($n_{max}=30$). En estos casos la reconstrucción de las imágenes estaba muy afectada por el ruido pero el algoritmo propuesto era capaz de determinar el desfase introducido para la descomposición de las componentes y su posterior reubicación dentro de la OTF del sistema. En la Fig. 4.22 se muestran algunos ejemplos de reconstrucciones completas con el método propuesto para 3 orientaciones distintas del patrón giradas en intervalos de 60° con el fin de conseguir un resultado final con una resolución aproximadamente isótropa.

Hasta ahora, hemos considerado un patrón ideal cuyo contraste es igual a la unidad. En la práctica este valor puede estar afectado por la coherencia de la fuente de iluminación, por una distribución asimétrica de la potencia de cada una de las ondas

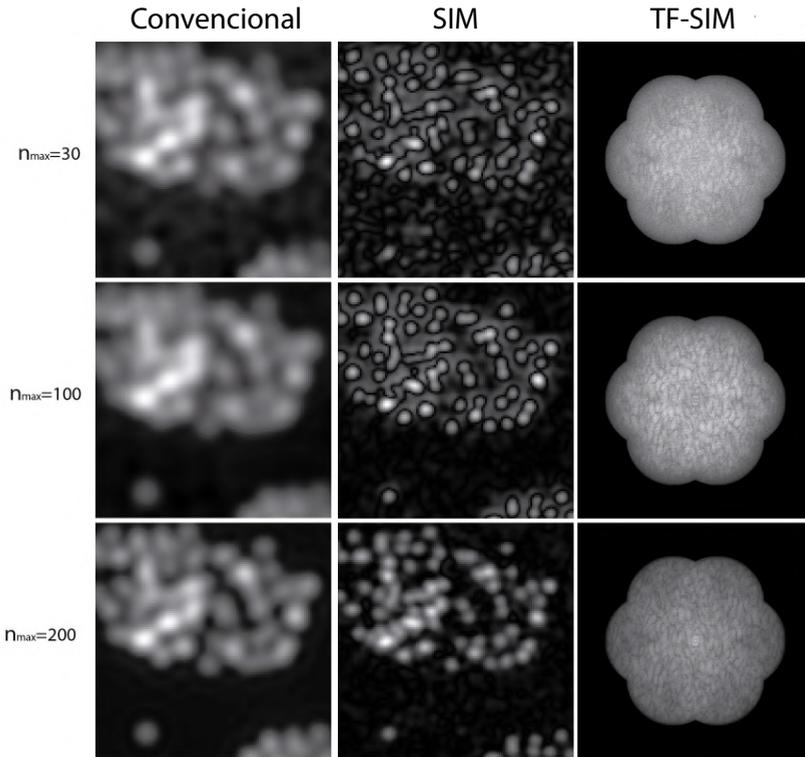


Figura 4.22: Simulaciones de imágenes convencionales y SIM en función del número máximo de fotones emitidos por la muestra. Comparación entre la simulación de imágenes reconstruidas convencionales y SIM para diferentes valores del número máximo de fotones emitidos por la muestra ($n_{max} = \{30, 100, 200\}$). Se representa adicionalmente el espectro frecuencial. Aunque las imágenes estén afectadas por el ruido en gran medida, en el peor de los casos ($n_{max} = 30$) el algoritmo es capaz de devolver una fase estimada con un error inferior al 5% respecto de la fase real.

que generan el patrón interferencial, o por cualquier tipo de intensidad procedente de planos fuera de foco. Vamos a estudiar el comportamiento del algoritmo para distintos contrastes del patrón utilizando el algoritmo de MCC y el nuestro. Al estudio de la sección anterior vamos a añadir el ruido medio ya

comentado y el número máximo de fotones procedentes de la muestra (n_{max}). Los resultados mostraban un comportamiento similar para contrastes superiores a 0.2 en el que determinaban con precisión la fase del desplazamiento. En la Fig. 4.23 se puede ver la comparación del error en la determinación de la fase utilizando nuestro algoritmo en comparación a utilizar el algoritmo de la correlación cruzada. Como podemos observar

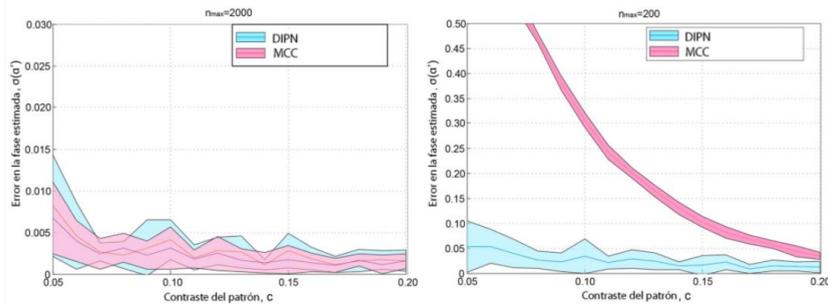


Figura 4.23: Comparación en función del contraste del patrón de iluminación. Valor promedio de los errores en la estimación de la fase como función del contraste del patrón de iluminación para un número máximo de fotones procedentes de la muestra igual a 200 y a 2000 fotones. Las bandas coloreadas representan la desviación standard de las 30 medidas realizadas para cada valor del contraste.

en la parte izquierda de la Fig. 4.23 ambos algoritmos funcionan correctamente para casi cualquier tipo de contraste en condiciones en las que el número de fotones emitidos por la muestra es de $n_{max}=2000$. En cambio, si nos fijamos en la subfigura que se encuentra en el panel derecho de Fig. 4.23 podemos ver que para un número relativamente bajo de fotones, $n_{max}=200$, el método de las correlaciones cruzadas empieza a fallar drásticamente cuando el contraste cae por debajo de 0.2. Cabe comentar que las curvas representadas en la Fig. 4.23 son el producto de haber ejecutado un valor promedio tras capturar 30 curvas distintas para cada valor del contraste promediando así el ruido de fondo aleatorio, así como las desviaciones standard, como se realizó en el análisis anterior.

En la Fig. 4.24 se puede observar una reconstrucción completa utilizando nuestro método para $n_{max} = 200$ con contrastes del patrón de 0.1 y 0.5. Ambas reconstrucciones muestran el aumento en resolución lateral esperado con una mayor influencia del ruido en aquella en la cual el patrón tiene un menor contraste.

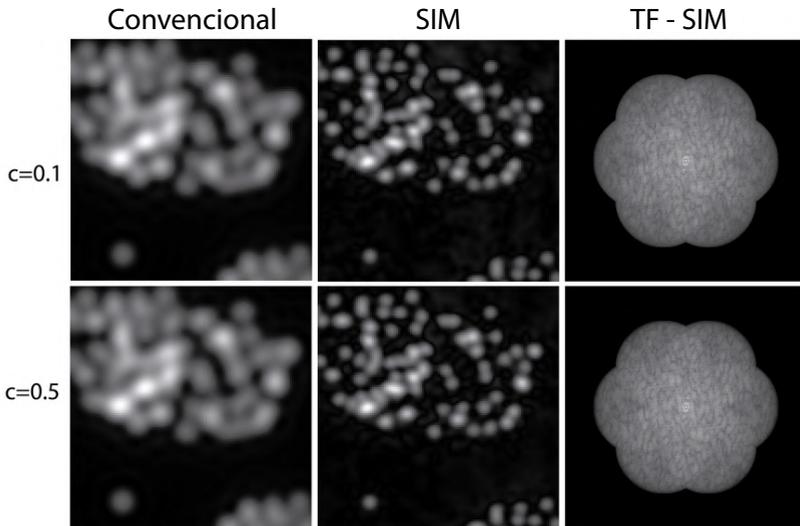


Figura 4.24: Tolerancia al contraste del patrón. Simulaciones convencional y SIM para contrastes del patrón de 0.1 y 0.5. El valor máximo del número de fotones procedentes de la muestra era de 200 fotones. Incluso en estas condiciones tan desfavorables, nuestro algoritmo devuelve una fase estimada con un error inferior al 1 % respecto de la fase real.

Podemos concluir que en condiciones no extremas (alto número de fotones procedentes de la muestra, bajo nivel de ruido y alto contraste del patrón) ambos métodos presentan resultados similares en términos de precisión. En este sentido, el método propuesto en este trabajo representa una simplificación computacional frente al método MCC. Consecuentemente, el método presentado puede realizar los cálculos computacionales con mayor rapidez que el método estándar para la determinación del desfase introducido por el patrón. Para imágenes superiores a

1024×1024 píxeles el método MCC se hace más lento de manera exponencial.

4.5.3 Estudio Experimental

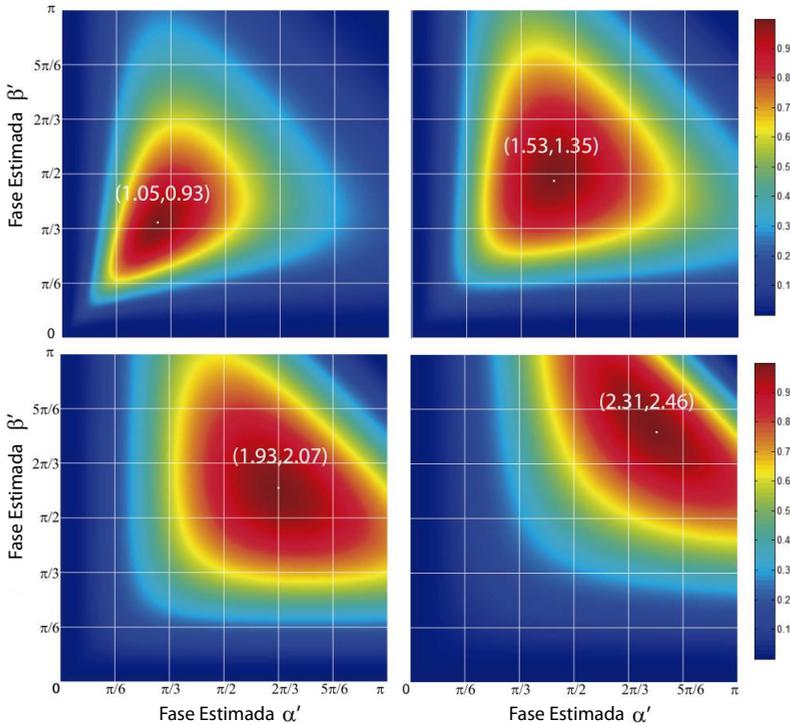


Figura 4.25: Superficies para la determinación de la fase mediante nuestro método para distintos valores reales del desfase. El desfase del patrón fue generado mediante un desplazamiento lateral de la red de difracción a través de un motor de precisión.

En esta sección vamos a realizar algunas reconstrucciones experimentales con las que demostraremos dos aspectos: la validez del método comparando los resultados experimentales con los analíticos y teóricos, y la mejora al utilizar la búsqueda de la fase asimétrica respecto de la simétrica.

Utilizando las mismas capturas del objeto utilizado en el caso unidimensional, una solución de fibras de algodón tintadas con Rodamina 123, se aplicó el algoritmo de búsqueda ahora utilizando la asimetría en el desplazamiento de fase. Una de las imágenes elementales capturada y su respectiva transformada de Fourier se muestran en la Fig. 4.13 de la sección unidimensional. En la Fig. 4.25 se pueden observar los resultados devueltos por nuestro algoritmo en unos pocos casos mostrados como ejemplo. Una vez realizada esta última representación, podemos comparar las figuras que hemos ido mostrando a lo largo de este bloque de Iluminación Estructurada y darnos cuenta de la similitud existente entre las gráficas de los cálculos analíticos, las de las simulaciones y estas últimas, de los resultados experimentales. La alta correlación entre estas figuras confirma la robustez de este exhaustivo estudio.

Por último, se realizó la misma reconstrucción de los archivos publicados por el *Proyecto fairSIM* ya usados en las secciones previas, pero en este caso considerando un desplazamiento asimétrico del patrón. La comparación de este resultado Fig 4.26 con la Fig. 4.16 en la cual la búsqueda del desplazamiento se realizó considerando un desplazamiento de la fase simétrico, confirma la sustancial mejora.

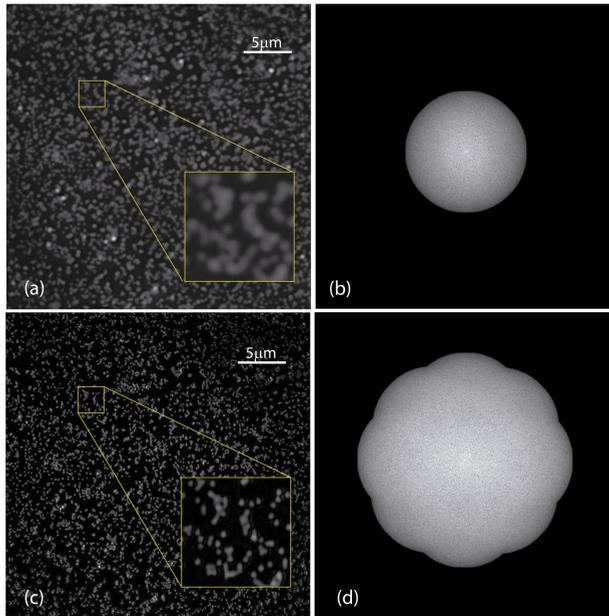


Figura 4.26: Reconstrucción realizada mediante nuestro método para un conjunto de datos publicados por el Proyecto fair-SIM. (a) Imagen convencional y (c) SIM usando como muestra nanopartículas de unos 100 nm de tamaño. Sus respectivas transformadas de Fourier aparecen en (b) y (d).

5

OPTIMIZACIÓN DEL CONTRASTE EN EL PATRÓN

5.1 INTRODUCCIÓN

En SIM, la muestra se ilumina típicamente con un patrón cosenoidal generado bien por la proyección incoherente de una serie de rendijas [35-37] o bien por la interferencia de 2 ó 3 ondas planas [21-25]. La primera propuesta fue publicada por Gustafsson [22] y se basaba en la generación del patrón cosenoidal mediante la interferencia de dos ondas planas monocromáticas procedentes de una red de difracción. Para ello, se basó en la idea del experimento de Young para separar una fuente puntual en dos fuentes puntuales coherentes entre sí. Cabe la posibilidad de utilizar dispositivos con cualidades ópticas características como pueden ser el biprisma de Fresnel [21, 25] o el prisma de Wollaston [38]. Estos elementos tienen la capacidad de generar dos réplicas iguales y coherentes entre sí, a partir de una única fuente puntual [17]. Una vez generadas las réplicas coherentes de la fuente puntual solo hay que situarlas en el plano focal objeto de una lente para tener, al otro lado de esta, la interferencia de dos ondas planas. La utilización de un biprisma de Fresnel (o un prisma de Wollaston) tiene la ventaja de producir un patrón puramente cosenoidal al hacer interferir únicamente dos ondas planas. Sin embargo, el tamaño finito de los elementos del sistema de iluminación genera en la práctica una función envolvente que modula y limita transversalmente este coseno a un cierto *campo de observación* (FoV, del inglés *Field of View*). Si bien es cierto que el peso de esta función en comparación con el peso del coseno no es demasiado relevante en muchos casos, en determinadas circunstancias puede ser una peculiaridad que nos impida desenvolvernos en la técnica SIM utilizando todo su potencial.

Por otro lado, el ruido coherente asociado al empleo de una fuente puntual monocromática puede suponer una distorsión importante en el patrón de iluminación teórico. El empleo de fuentes espacialmente incoherentes ha sido ya explorado con éxito en la generación de patrones de iluminación estructurada con bajo ruido a partir de estos elementos [39, 40]. Sin embargo, en la práctica el uso de fuentes extensas genera una modulación axial de la visibilidad V de los patrones de iluminación que no aparece (idealmente) en el caso de iluminación coherente [41].

La idea principal de este capítulo es estudiar dos de las propiedades de un sistema SIM como el indicado anteriormente, como son la visibilidad del patrón de iluminación, V , y la extensión lateral del FoV. Para ello empezaremos por el caso más sencillo y avanzaremos hacia casos más complejos para una comprensión más profunda de los detalles del estudio. Analizaremos teóricamente tanto la V como el FoV en un sistema SIM iluminado por una fuente puntual. Posteriormente introduciremos una fuente de iluminación incoherente y veremos cómo se modifican estas propiedades, así como las ligaduras existentes entre ellas y cómo optimizar el diseño del sistema.

5.2 CAMPO Y VISIBILIDAD EN UN SISTEMA SIM COHERENTE

Vamos a introducir la generación de la iluminación en un sistema SIM que usa un biprisma de Fresnel. El biprisma de Fresnel es un dispositivo formado por la unión por su base de dos prismas ópticos delgados, que tiene la capacidad de generar dos réplicas iguales y coherentes entre sí, a partir de una única fuente puntual tal como se puede apreciar en la Fig. 5.1.

Cuando se ilumina el biprisma con una onda esférica procedente de la fuente puntual original, éste genera dos fuentes gemelas en el mismo plano en el que se encuentra la fuente original. Estas fuentes virtuales se sitúan simétricamente respecto de la posición de la fuente original en la dirección ortogonal a la arista central del biprisma. La separación entre estas dos fuentes virtuales ($2a$)

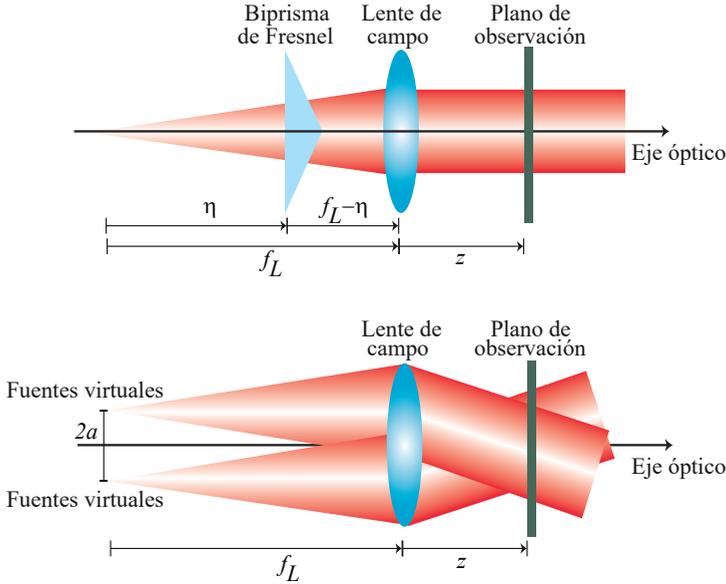


Figura 5.1: Esquema representativo de las propiedades del biprisma de Fresnel. (a) Esquema real dónde se representan las posiciones de los distintos elementos y la forma del haz de iluminación en el espacio objeto. **(b)** Esquema que representa las posiciones de los distintos elementos y las distribuciones de amplitudes una vez ha actuado el biprisma de Fresnel.

es proporcional a la distancia que existe entre la fuente original y el biprisma de Fresnel (η). Esta separación se puede expresar de la siguiente forma

$$2a = 2(n - 1)\eta \tan \delta, \quad (5.1)$$

donde n , η y δ son, respectivamente, el índice de refracción del biprisma de Fresnel, la distancia entre la fuente puntual y el biprisma, y el ángulo de refringencia del biprisma de Fresnel.

Una vez generadas las réplicas coherentes de la fuente puntual las situamos en el plano focal objeto de una lente para tener, al otro lado de ésta, la interferencia de dos ondas planas. En el caso en el que el centro geométrico entre las dos fuentes virtuales coincida con el eje óptico del sistema, tendremos dos ondas

que viajan con unos ángulos de propagación que son iguales en módulo y opuestos en signo, y podemos decir que la *dirección de propagación* del patrón de franjas coincide con el eje óptico. En cambio, si el centro geométrico de las dos fuentes virtuales no coincide con el eje óptico, tendremos una *dirección de propagación* del patrón que formará un cierto ángulo con el eje óptico. Por tanto, la proyección de dicho patrón sobre un plano transversal se desplaza lateralmente a medida que nos desplazamos axialmente por el eje óptico.

El sistema que aparece en la Fig. 5.2 es similar al descrito en capítulos anteriores con la salvedad de que ahora generaremos el haz de iluminación mediante un biprisma de Fresnel en lugar de usar una red de difracción. El sistema óptico está formado por un biprisma de Fresnel, 2 lentes convergentes que componen un relay (L_1 y L_2), un espejo dicróico, un objetivo de microscopio, una lente de tubo (TL) y un sensor.

La Ec. 5.1 muestra que la separación entre las fuentes virtuales puntuales puede ser variada cambiando la posición axial del biprisma, η . Dado que estas dos réplicas proceden de la misma fuente puntual, son coherentes entre sí. Tras la lente L_1 nos encontramos con la interferencia coherente de ambas ondas planas. Así que la distribución de amplitudes compleja tras la lente L_1 tomará la siguiente forma,

$$U(\mathbf{x}, z) = U^{a-}(\mathbf{x}, z) + U^{a+}(\mathbf{x}, z), \quad (5.2)$$

donde z representa la distancia desde la lente L_1 . Podemos expresar cada una de los dos ondas planas de la siguiente manera,

$$U^{a+}(\mathbf{x}, z) = -\frac{i}{\lambda f_{L1}} e^{ik(f_{L1}+z)} e^{ik \frac{f_{L1}-z}{2f_{L1}^2} \frac{a^2}{4}} e^{-i \frac{2\pi}{\lambda f_{L1}} ax}$$

$$U^{a-}(\mathbf{x}, z) = -\frac{i}{\lambda f_{L1}} e^{ik(f_{L1}+z)} e^{ik \frac{f_{L1}-z}{2f_{L1}^2} \frac{a^2}{4}} e^{+i \frac{2\pi}{\lambda f_{L1}} ax}, \quad (5.3)$$

siendo f_{L1} la focal imagen de L_1 . La distribución de amplitudes tras la interferencia en cualquier plano transversal tendrá la siguiente forma,

$$U(\mathbf{x}, z) = -\frac{i}{\lambda f_{L1}} e^{ik(f_{L1}+z)} e^{ik \frac{f_{L1}-z}{2f_{L1}^2} \frac{a^2}{4}} 2 \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda f_{L1}} ax\right), \quad (5.4)$$

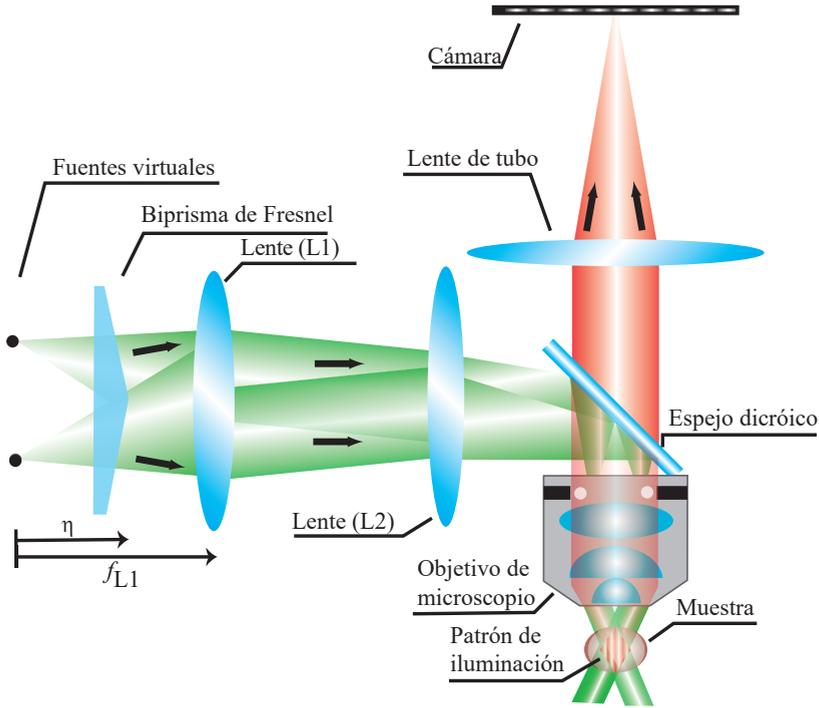


Figura 5.2: Esquema SIM. Esquema completo de un sistema de iluminación y captura SIM utilizando un biprisma de Fresnel como elemento generador del patrón interferencial en el brazo de iluminación.

y la distribución de intensidades se obtiene calculando el módulo cuadrado de la distribución de amplitudes,

$$I(\mathbf{x}, z) = |U(\mathbf{x}, z)|^2 = \frac{4}{\lambda^2 f_{L1}^2} \cos^2 \left(\frac{2\pi}{\lambda f_{L1}} ax \right) = \frac{2}{\lambda^2 f_{L1}^2} \left[1 + \cos \left(2\pi \frac{2a}{\lambda f_{L1}} x \right) \right], \quad (5.5)$$

siendo el periodo de las franjas

$$p = \frac{\lambda f_{L1}}{2a} = \frac{\lambda f_{L1}}{2\eta(n-1) \tan \delta'}, \quad (5.6)$$

Con este resultado, la variación del período del patrón de franjas como función de la posición axial del biprisma (η) es evidente. Es importante darse cuenta que en la configuración de la Fig. 5.2,

la visibilidad permanece constante y con valor máximo ($V = 1$) independientemente del plano transversal en el que nos encontremos. Adicionalmente, dado que las dos fuentes virtuales gemelas completamente coherentes entre sí se proyectan sobre la pupila a través del sistema de iluminación compuesto por L_1 y L_2 en la Fig. 5.2, la visibilidad del patrón estructurado creado por el biprisma se transmite sin ninguna pérdida al espacio de la muestra.

El razonamiento anterior no tiene en cuenta el tamaño finito de los elementos ópticos del sistema. Sin embargo, ésta es una consideración importante, ya que esto conlleva una limitación en la extensión del FoV del patrón estructurado en diferentes planos transversales. Aunque en rigor sería necesario estudiar el efecto difractivo del tamaño de todos los elementos del sistema, realizaremos aquí un aproximación simplificada. En primer lugar, despreciaremos este efecto en todos los elementos salvo en el que sea más restrictivo desde el punto de vista de la extensión del haz de rayos de luz que atraviesa el sistema, en el contexto de la Óptica Geométrica. En particular, supondremos que el elemento que más restringe dicho haz es la lente L_1 . Por otro lado, consideraremos que el efecto del recorte del haz por este elemento se puede aproximar a la limitación generada por su *sombra geométrica*.

La Fig. 5.3 ilustra el trazado de rayos sobre el sistema que estamos describiendo y muestra la extensión del FoV, $\Delta(s)$, en función del plano de observación indicado por la distancia $z = s$ a la que se encuentra de la lente L_1 . El patrón de franjas se encuentra confinado lateralmente dentro de un cono cuya proyección bidimensional se aprecia en la Fig. 5.3 pintado interiormente en color rosáceo, y que corresponde a la región de solapamiento de las ondas planas recortadas por la lente. El vértice (B') de este cono está situado a una distancia $-s'_B$ a la que se sitúa el plano imagen de la arista real del biprisma (B) a través de la lente L_1 . Para conseguir obtener una expresión que relacione el FoV con las características geométricas del sistema óptico, vamos a

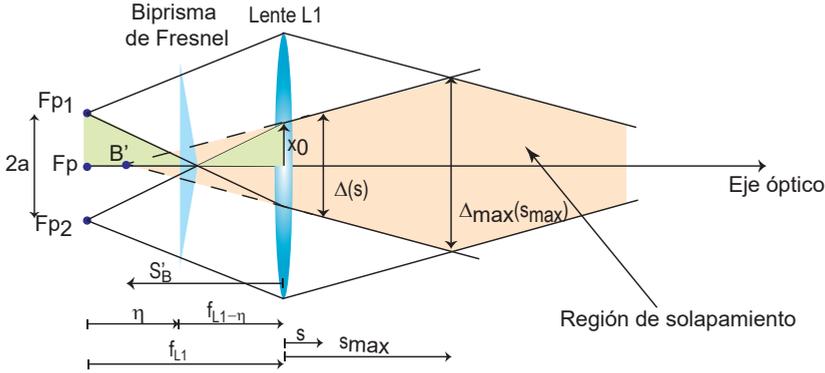


Figura 5.3: Ilustración del FoV del patrón de franjas interferencial creado por el biprisma de Fresnel en el sistema óptico propuesto.

realizar una serie de cálculos trigonométricos. Apoyándonos en la Fig. 5.3, se puede definir la siguiente relación

$$\frac{a}{\eta} = \frac{x_0}{f_{L1} - \eta} \longrightarrow x_0 = \frac{f_{L1} - \eta}{\eta} a, \quad (5.7)$$

siendo $x_0 = \Delta(0)/2$. Hacemos uso de la ecuación de conjugación de Gauss para determinar la imagen de la arista del biprisma a través de la lente L_1 (B')

$$s'_B = \frac{f_{L1}s_B}{s_B - f_{L1}}, \quad (5.8)$$

y dado que $s_B = f_{L1} - \eta$, entonces

$$s'_B = -\frac{f_{L1}^2 - \eta f_{L1}}{\eta}. \quad (5.9)$$

Teniendo en mente estos resultados, podemos obtener la siguiente relación de la Fig. 5.4

$$-\frac{x_0}{s'_B} = \frac{\Delta(s)/2}{s - s'_B} = \frac{\Delta_{max}/2}{s_{max} - s'_B}, \quad (5.10)$$

donde hemos restringido el análisis a los valores $s \in (s'_B, s_{max}]$ (región sobreada en azul en la Fig. 5.4), siendo $\Delta_{max} = \Delta(s_{max})$ el

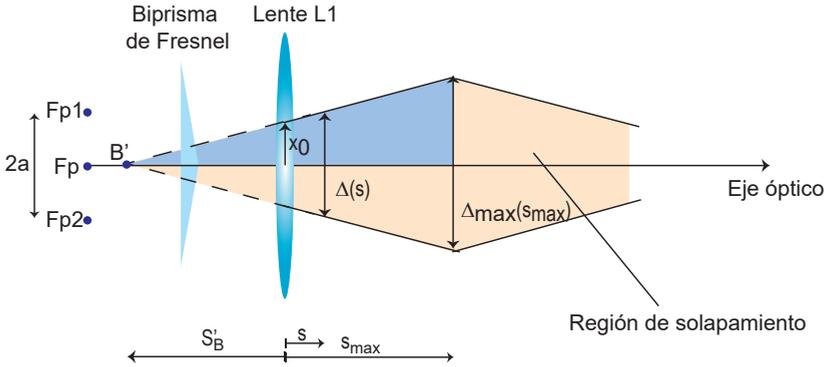


Figura 5.4: Ilustración del FoV del patrón de franjas interferencial creado por el biprisma de Fresnel en el sistema óptico propuesto.

máximo valor de la extensión del FoV es este intervalo. A partir de este resultado, deducimos que

$$\Delta(s) = \frac{s'_B - s}{s'_B} 2x_0 = \frac{-\frac{f_{L1}^2 - \eta f_{L1}}{\eta} - s}{-\frac{f_{L1}^2 - \eta f_{L1}}{\eta}} 2x_0 = \frac{f_{L1}^2 - \eta(f_{L1} - s)}{f_{L1}^2 - \eta f_{L1}} 2x_0. \tag{5.11}$$

Recordando las relaciones 5.7 y 5.1 entonces obtenemos

$$\Delta(s) = 2 \frac{f_{L1}^2 - \eta f_{L1} + \eta s}{f_{L1}} (n - 1) \tan \delta, \tag{5.12}$$

La Ec. 5.12 nos proporciona la extensión del campo lateral del patrón de iluminación estructurado en términos de las distancias η , f_{L1} y la posición del plano de observación s considerando que el elemento limitante del sistema es la lente $L1$. Dado que la distancia η puede ser variada a voluntad para modificar el período del patrón de iluminación, como consecuencia, Δ también varía. Recordemos que esta expresión es válida para valores $s \in (s'_B, s_{max}]$. Como se puede ver en la Fig. 5.3 y Fig. 5.4 la distancia s_{max} en la cual podemos encontrar el máximo campo de franjas viene dada por

$$s_{max}(\eta) = \frac{f_{L1}L}{4a} - \frac{f_{L1}^2 - \eta f_{L1}}{2\eta}, \tag{5.13}$$

donde L es el diámetro de la lente L_1 . Nos encontraremos pues con una expresión para el campo máximo de iluminación de la siguiente forma

$$\Delta_{max}(\eta) = \frac{1}{2}[L + 2(f_{L1} - \eta)(n - 1) \tan \delta]. \quad (5.14)$$

Hay que tener en cuenta que ambas ecuaciones Ec. 5.13 y Ec. 5.14 dependen de la posición axial del biprisma (η). Es interesante darse cuenta de que la extensión del FoV variará linealmente desde un valor nulo para $s = s'_B$ hasta el valor dado por la Ec. 5.14 que se alcanza para la distancia s fijada por la Ec. 5.13. A partir de este plano, para valores $s > s_{max}$ el valor de Δ decrece también linealmente al mismo ritmo, hasta volver a anularse para $s = 2s_{max} - s'_B$, como puede deducirse de la Fig. 5.3. Con todo, la extensión axial de la región de franjas, es decir, la longitud del intervalo de valores de s para los que se obtiene un patrón de franjas de extensión no nula, vendrá dada por

$$\Delta s = 2s_{max} - 2s'_B = \frac{f_{L1}}{\eta} \left(\frac{L}{2(n-1) \tan \delta} + f_{L1} - \eta \right). \quad (5.15)$$

5.3 CAMPO Y VISIBILIDAD EN UN SISTEMA SIM INCOHERENTE

En la situación descrita hasta ahora teníamos dos fuentes puntuales coherentes entre sí que generan, en el plano objeto del microscopio, un patrón interferencial cosenoidal en la dirección x , como se muestra en la Fig. 5.5(a).

Supongamos ahora, que en lugar de tener una fuente puntual con su réplica, lo que tenemos son dos fuentes puntuales con sus respectivas réplicas. La línea imaginaria que une dichas fuentes reales es perpendicular al eje óptico y además al eje x , y por tanto paralela al eje y , tal como se aprecia en la Fig. 5.5(b). En este supuesto, la fuente que aparece marcada con un 1 en la Fig. 5.5(b), interferirá con la 2 de la misma forma que hemos explicado anteriormente, ya que es su réplica y por tanto son coherentes entre sí. Por otro lado no existe la interferencia entre

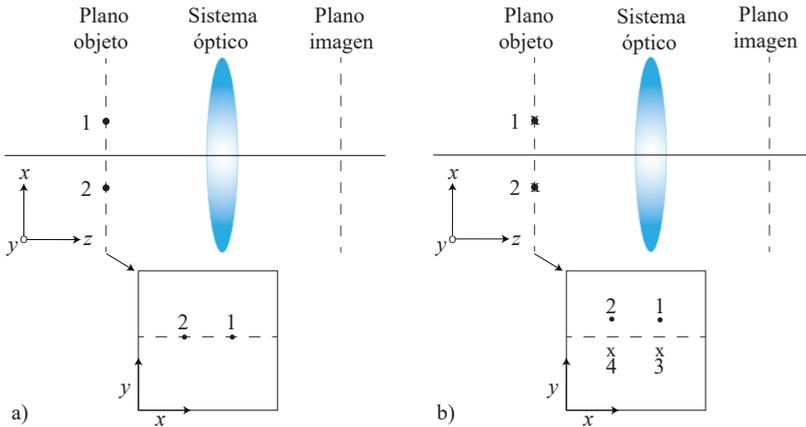


Figura 5.5: Esquema ilustrativo. Esquema que refleja las posiciones de las coordenadas espaciales de **(a)** las fuentes virtuales, 1 y 2, generadas por una fuente puntual, situada sobre el eje óptico, y **(b)** las fuentes virtuales, 1 y 2, generadas por una fuente puntual y las fuentes virtuales, 3 y 4, generadas por otra fuente puntual incoherente con la anterior.

1 y 3 o entre 1 y 4 por la falta de coherencia entre las fuentes. Del mismo modo, existirá interferencia entre 3 y 4, generando un patrón que espacialmente se sitúa en la misma posición que el generado por 1 y 2. Esto es así porque, tal y como indicamos anteriormente, un desplazamiento de la fuente puntual respecto del eje óptico genera una inclinación adicional en la dirección de las ondas planas que interfieren tras L_1 tal que produce una *deriva* progresiva de los patrones transversales en esa misma dirección. Al tratarse de patrones sin variación de irradiancia en la dirección y (que es la dirección de desplazamiento considerada en este caso), de modo efectivo se produce la misma distribución de franjas que en el caso de la fuente en eje. El hecho de que ambos patrones se sitúen en la misma posición espacial, hace que el resultado en intensidad no sea más que la suma de las distribuciones en intensidad de ambos patrones. Esto hace que el posible ruido que aparezca en un único patrón, se promedie y el patrón final muestre una forma cosenoidal con mejor relación señal-ruido. Este ruido puede provenir del ruido electrónico del sensor, del ruido coherente proveniente de fuentes de luz

indeseadas o de aberraciones debidas a la difracción generada por suciedad o motas de polvo, entre otros motivos. Si en lugar de tener dos fuentes puntuales, disponemos de muchas más, es decir una rendija extensa en la dirección y , e infinitesimal en la dirección x , este promedio reducirá en gran medida este ruido y tendremos un patrón de iluminación cosenoidal casi carente de ruido. Por este motivo vamos a estudiar el mismo sistema SIM que hemos estado viendo hasta ahora, pero en lugar de utilizar una fuente puntual vamos a utilizar una rendija infinitesimal orientada en la dirección y .

A continuación vamos a describir la implementación incoherente del sistema propuesto. Ahora, el biprisma de Fresnel está iluminado por la radiación que emerge de una rendija espacialmente incoherente en lugar de provenir de una fuente puntual. Recordemos que, en esta configuración, la rendija está orientada paralela al eje del biprisma. Una propiedad de este sistema incoherente de iluminación estructurada es que los patrones de iluminación de la Ec. 5.5 son invariantes a lo largo tanto de la dirección y como de la dirección z . Así, cada una de las fuentes puntuales de la rendija, genera el mismo patrón interferencial de alto contraste en cualquier plano donde exista la interferencia de las ondas planas. De este modo, en ausencia de ruido, dado que cada punto incoherente produce la misma distribución de irradiancia (Ec. 5.5), el resultado final será simplemente una señal de intensidad reforzada comparada con el caso de una fuente puntual. Sin embargo, en presencia de ruido, aunque el patrón de franjas es el mismo para todos los puntos en la rendija, cada uno de ellos está distorsionado de manera diferente por el ruido coherente. Así, la implementación de la rendija proporciona el mismo patrón cosenoidal que la fuente puntual pero con mayor relación señal-ruido (SNR).

Sin embargo, en una situación más realista, la anchura de la rendija a lo largo de la dirección x no puede ser despreciada. En este caso, el uso de una rendija de tamaño finito da lugar a patrones cosenoidales cuya visibilidad no permanece constante para diferentes planos transversales de observación. De hecho, si una fuente lineal incoherente cuya anchura es Ω , se usa en el montaje SIM propuesto, entonces la distribución de irradiancias para cada

uno de los planos de interferencias ($I^{rendija}(\mathbf{x}, z)$) se determina como la convolución entre la distribución de irradiancias de una versión escalada de la irradiancia de la fuente ($I_s^{rendija}(\mathbf{x})$) y la distribución de irradiancias generada en el plano de observación por una fuente puntual axial localizada en el plano transversal que contiene la rendija ($I(\mathbf{x}, z)$ de la Ec. 5.5) [41]. De este modo, la distribución de irradiancia a una distancia $z = s$ de la lente L_1 viene dada por

$$I^{rendija}(\mathbf{x}, s) = I_s^{rendija} \left(\frac{\mathbf{x}}{M_s} \right) \otimes_2 I(\mathbf{x}, s), \quad (5.16)$$

donde

$$M_s = \frac{f_{L1}^2 + \eta(s - f_{L1})}{\eta f_{L1}}. \quad (5.17)$$

Considerando en este caso $I_s^{rendija}(\mathbf{x}) = \text{rect}(x/\Omega)$, la operación anterior se puede escribir como

$$I^{rendija}(\mathbf{x}, s) = 2\Omega M_s \left\{ 1 + \text{sinc} \left(\frac{M_s \Omega}{p} \right) \cos \left(2\pi \frac{x}{p} \right) \right\}, \quad (5.18)$$

que corresponde a una distribución cosenoidal, con periodo p dado por la Ec. 5.6, con visibilidad

$$V(s, \eta) = \left| \text{sinc} \left(2\Omega u_0 \frac{f_{L1}^2 + \eta(s - f_{L1})}{f_{L1}^2} \right) \right|, \quad (5.19)$$

donde $u_0 = \frac{(n-1) \tan \delta}{\lambda}$. A partir de esta última expresión es directo darse cuenta que la visibilidad del patrón de iluminación depende tanto de la posición del biprisma η como de la posición axial del plano de observación s .

5.4 COMPROMISO ENTRE LA VISIBILIDAD Y EL CAMPO

Podemos observar a partir de las ecuaciones Ec. 5.12 y Ec. 5.19 que la distancia s óptima para lograr el máximo FoV no

es la misma que para obtener la máxima visibilidad del patrón interferencial de iluminación. De hecho, es importante resaltar que cuando el patrón de franjas alcanza la máxima visibilidad, la extensión del FoV es nula. Esto significa, que nuestro sistema está sujeto a un compromiso entre la visibilidad y el campo de iluminación del patrón interferencial. Para lograr la optimización de estos dos parámetros, es necesario llegar a un compromiso entre ellos.

Como ya se ha comentado, los valores tanto de la visibilidad como del campo de iluminación cambian con el plano de observación. Para optimizar estos dos parámetros nos fijaremos en el patrón que se proyecta sobre el plano focal objeto del objetivo del microscopio en el espacio de la muestra. A partir de la Fig. 5.2 es fácil darse cuenta que el plano focal objeto de la lente L2 está conjugado con dicho plano, dada la configuración afocal telecéntrica del sistema. De este modo, para analizar el compromiso entre el campo y la visibilidad fijamos nuestro plano de observación en el plano focal objeto de la lente L2. La forma de hacer esto es variando la distancia existente entre las dos lentes L1 y L2, mientras mantenemos fija la posición de la rendija en el plano focal objeto de la lente L1 y el biprisma entre la salida de la fuente y la lente L1. Es importante tener en mente que el valor de η cambia la frecuencia espacial del patrón de iluminación.

Vamos ahora a estudiar la configuración óptica óptima de nuestro sistema de iluminación propuesto modificando apropiadamente estas dos distancias. Para una comprensión más simplificada de los conceptos posteriores vamos a realizar una serie de cambio de variables. Las ecuaciones de la visibilidad y del campo (Ec.5.19 y Ec.5.12) se pueden reescribir de la siguiente manera,

$$\Delta(r, \alpha) = 2(f_{L1} - r\alpha)(n - 1) \tan \delta, \quad (5.20)$$

$$V(r, \alpha) = \left| \text{sinc} \left(2\Omega u_0 \left(1 + \frac{r\alpha}{f_{L1}} \right) \right) \right|, \quad (5.21)$$

donde $r = \eta / f_{L1}$ (siendo el rango de r entre 0 y 1) y $\alpha = s - f_{L1}$. El parámetro r representa cada una de las posibles posiciones

del biprisma entre la fuente ($r = 0$) y la lente L1 ($r = 1$), mientras que α varía con la distancia e entre las lentes, ya que se considera siempre $s = e - f_{L2}$ y por tanto $\alpha = e - (f_{L1} + f_{L2})$. Por simplicidad, variaremos esta distancia empezando por la situación en la cual ambas lentes (L1 y L2) están pegadas entre sí ($\alpha = -f_{L1} - f_{L2}$), pasando la configuración afocal ($\alpha = 0$) y acabando cuando las lentes se encuentran al doble de distancia que en la configuración afocal ($\alpha = f_{L1} + f_{L2}$).

Para optimizar conjuntamente la extensión lateral de franjas del campo y la visibilidad, es necesario encontrar una función de mérito que combine, de alguna manera, ambas funciones. Dado que el mejor escenario es encontrar el valor máximo posible para ambos, FoV y visibilidad, la función de mérito elegida se basará en el producto normalizado de ambas funciones. Por otro lado, una de las características más interesantes del sistema SIM de la Fig. 5.2 es su capacidad de generar diferentes frecuencias de modulación variando el parámetro r . Así pues, acumularemos todos los valores del producto de funciones citado para todas estas situaciones y definiremos la función de mérito a optimizar como [42, 43]

$$\Phi(\alpha) = \int_0^1 \frac{V(r, \alpha) \Delta(r, \alpha)}{\Delta_{max}(r)} dr. \quad (5.22)$$

La disposición óptima de las lentes se fijará, entonces, a partir de la obtención del valor α_{max} que maximiza la función de mérito, es decir

$$e_{opt} = \alpha_{max} + f_{L1} + f_{L2} \left/ \frac{d\Phi}{d\alpha}(\alpha_{max}) = 0. \quad (5.23)$$

A modo de ejemplo de aplicación del método propuesto, obtendremos el diseño óptimo de un sistema SIM para un caso particular, en el que las focales de las lentes L1 y L2 son respectivamente $f_{L1} = 100$ mm y $f_{L2} = 250$ mm, $u_0 = 0,0484 \mu\text{m}^{-1}$, $\lambda = 0,488 \mu\text{m}$ y $L = 25,4$ mm. La Fig. 5.6 muestra una representación de la correspondiente función de mérito. En este caso se obtuvo numéricamente un valor $\alpha_{max} = 92,5$ mm, que corresponde a una distancia óptima entre L1 y L2 de $e_{opt} = 442,5$ mm.

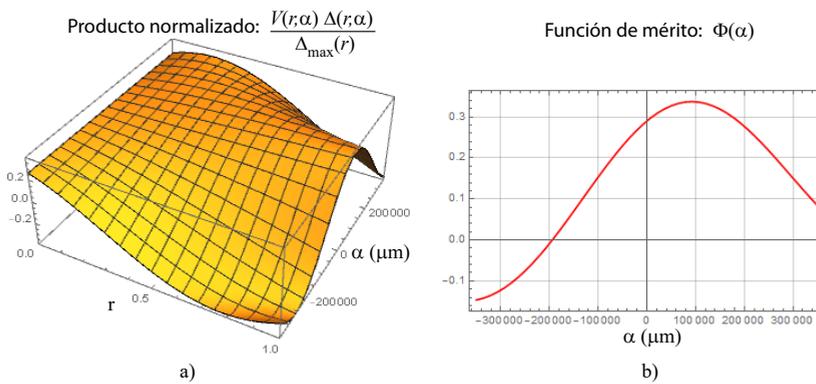


Figura 5.6: (a) Producto normalizado sugerido para la optimización de la visibilidad y el FoV en el sistema propuesto de rendija incoherente SIM. (b) Medida del área de cada uno de los cortes de la función anterior respecto al parámetro r (función de mérito $\Phi(\alpha)$).

6

MICROSCOPIA POR ILUMINACIÓN ESTRUCTURADA ESCANEADA

6.1 INTRODUCCIÓN

A lo largo de este trabajo ha quedado patente que una de las propiedades ópticas más importantes en un sistema de captura óptico es la resolución lateral de la imagen final. Para conseguir alcanzar el mejor resultado posible en términos de resolución, rompiendo la barrera impuesta por la difracción de la luz, han ido apareciendo diversas técnicas [22, 24, 44-56]. Podemos diferenciar estas técnicas separándolas entre las que necesitan de un escaneo lateral de la muestra y las que no lo necesitan. Las técnicas que necesitan un escaneo de la muestra adquieren la capacidad de conjugar un único punto de la muestra con el sensor mediante la acción de un estenope que bloquea la luz de planos fuera de foco, facilitando la capacidad de seccionado óptico así como el aumento en resolución lateral por ser capaces de reducir la PSF del sistema. La microscopía por agotamiento de emisión estimulada (Stimulated Emission Depletion, STED) [44] se encuentra entre las técnicas derivadas de la microscopía confocal [20, 56-59]. En el otro grupo se encuentran técnicas que utilizan una iluminación extensa de la muestra. Entre ellas está la ampliamente abordada en este trabajo SIM [22, 24, 45-52], la microscopía de localización fotoactivada (Photo-activated Localization Microscopy, PALM) [53, 54] o la microscopía por reconstrucción óptica estocástica (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM) [55]. Estas técnicas que necesitan de un post procesado pueden verse afectadas por errores en la reconstrucción.

A continuación vamos a presentar una técnica de microscopía tan innovadora que hoy día está bajo trámites de patente [60]. La técnica puede ser considerada como una técnica híbrida entre SIM y microscopía confocal. El microscopio construido para realizar esta técnica utiliza un patrón de iluminación estructurada

para iluminar la muestra y , al mismo tiempo, requiere de un estenope para la detección de la luz, tras el escaneo lateral de la muestra. Este microscopio es capaz de conseguir resoluciones que duplican la resolución de un microscopio convencional, y al mismo tiempo tiene la capacidad de aportar seccionado óptico de la muestra. Ya vimos que con la técnica SIM somos capaces de obtener resoluciones que duplican la resolución de un microscopio convencional o multiplican por 1.5 la resolución y aportan seccionado óptico. Esta técnica es capaz de proporcionarnos estas dos mejoras simultáneamente lo que la convierte en una de las técnicas más potentes que existen. Veamos con detalle el análisis teórico de esta técnica así como sus validaciones simuladas y experimentales.

6.2 ANÁLISIS TEÓRICO

Consideremos un microscopio en el cual tenemos una muestra tridimensional formada por una distribución de fluoroforos $O(\mathbf{r})$ iluminada por un patrón de intensidad $S(\mathbf{r})$. La distribución de intensidades 3D en el espacio imagen del sistema óptico tiene la siguiente forma, de acuerdo con la Ec. 3.7

$$I(\mathbf{r}) = [O(\mathbf{r})S(\mathbf{r})] \otimes_3 h_{inc}(\mathbf{r}), \quad (6.1)$$

donde por sencillez hemos considerado el aumento $M = 1$, $\mathbf{r} = (x, y, z)$ representa las coordenadas espaciales y $h_{inc}(\mathbf{r})$ representa la respuesta impulsional tridimensional del sistema.

Es inmediato observar que cuando la iluminación ($S(\mathbf{r})$) es una función armónica, por ejemplo un patrón interferencial cosenoidal, la expresión de la Ec. 6.1 no es más que la ecuación inicial que utilizamos para describir la técnica SIM. Con el mero hecho de realizar la transformada de Fourier de la Ec. 6.1 obtenemos la distribución de intensidades en el dominio de Fourier contenida en la imagen, la cual viene dada por

$$\tilde{I}(\boldsymbol{\rho}) = [\tilde{O}(\boldsymbol{\rho}) \otimes_3 \tilde{S}(\boldsymbol{\rho})]H(\boldsymbol{\rho}), \quad (6.2)$$

donde $\boldsymbol{\rho} = (\mathbf{u}, w)$ representa las coordenadas frecuenciales y $H(\boldsymbol{\rho})$ es la OTF 3D del microscopio. En el caso de la técnica SIM

el término que se encuentra dentro de los corchetes representa el conjunto de réplicas del espectro del objeto, el cual está recortado por el soporte compacto de la OTF del sistema óptico. Aunque este conjunto de réplicas está entremezclado, la técnica SIM utiliza los desplazamientos de fase para generar un sistema de ecuaciones con las imágenes capturadas y poder separar la información de las distintas componentes espectrales. Para este fin, la técnica SIM necesita la captura, al menos, del mismo número de imágenes que el número de órdenes de frecuencias espaciales, cada una de ellas con un desplazamiento del patrón apropiado. Además, el patrón de iluminación ha de ser rotado al menos 3 veces para conseguir un aumento en la resolución final prácticamente isótropo. De esta forma, el proceso de captura completo se traduce en la captura de 9 imágenes en el caso en que estemos usando dos ondas planas de iluminación, y este número aumenta a 15 imágenes en el caso de iluminar con 3 ondas. A continuación, se procesan las imágenes y recombinan de la manera adecuada, es decir, haciendo uso de un algoritmo computacional que, entre otros cálculos, necesita procesar deconvoluciones para recuperar las componentes de alta resolución para reducir las imperfecciones en la reconstrucción final, tal y como se presentó en el capítulo anterior.

Con el fin de aligerar la tasa de imágenes necesarias y la reducción tanto del tiempo de cómputo como del esfuerzo computacional, proponemos una nueva técnica de microscopía 3D innovadora. Esta propuesta es en esencia diferente a la técnica SIM pero basada en el mismo principio de iluminación estructurada. Hemos llamado a esta técnica microscopía por iluminación estructurada escaneada (SISM del inglés *Structured Illumination Scanning Microscopy*). La principal diferencia radica en el hecho de que en este nuevo caso la iluminación permanece fija sin necesidad de realizar ningún desplazamiento del patrón de iluminación. La muestra se escanea, es decir, se desplaza sucesivamente de modo controlado, y solo la luz que pasa por un estenope situado, típicamente, en el centro de la imagen en el plano del sensor, es capturada. Así pues, para cada una de las posiciones del objeto escaneadas (\mathbf{r}_s), la intensidad de una pequeña porción de la imagen es medida al igual que se ejecuta en un microscopio

confocal. Así pues, para un desplazamiento dado del objeto (\mathbf{r}_s), la intensidad registrada en el sensor sería

$$I_{SISM}(\mathbf{r}_s) = \iiint_{-\infty}^{+\infty} \{ [O(\mathbf{r} + \mathbf{r}_s)S(\mathbf{r})] \otimes_3 h_{inc}(\mathbf{r}) \} \delta(\mathbf{r}) d^3 \mathbf{r}, \quad (6.3)$$

En esta ecuación $\delta(\mathbf{r})$ es la función delta de Dirac que tiene en cuenta el efecto del estenope. Se puede escribir la operación de convolución en su forma integral para llegar a

$$I_{SISM}(\mathbf{r}_s) = \iiint_{-\infty}^{+\infty} O(\mathbf{r}_s - \boldsymbol{\alpha}) S(-\boldsymbol{\alpha}) h_{inc}(\boldsymbol{\alpha}) d^3 \boldsymbol{\alpha}, \quad (6.4)$$

siendo $\boldsymbol{\alpha}$ las coordenadas tridimensionales de la convolución. En el caso en el que el patrón de iluminación sea simétrico respecto del origen de coordenadas, podemos reescribir la Ec. 6.4 como una nueva convolución,

$$I_{SISM}(\mathbf{r}_s) = O(\mathbf{r}_s) \otimes_3 [S(\mathbf{r}_s) h_{inc}(\mathbf{r}_s)]. \quad (6.5)$$

A partir de esta última Ec. 6.5, se muestra que tras el escaneo tanto transversal como axial, el proceso es lineal e invariante a desplazamientos. En otras palabras, la imagen 3D es el resultado de la convolución entre el objeto 3D y la nueva PSF 3D. Dicha PSF no es más que el producto entre el patrón de iluminación y la PSF del sistema. Este efecto se puede comprender mejor en el dominio de Fourier,

$$\tilde{I}_{SISM}(\boldsymbol{\rho}_s) = \tilde{O}(\boldsymbol{\rho}_s) [\tilde{S}(\boldsymbol{\rho}_s) \otimes_3 H(\boldsymbol{\rho}_s)], \quad (6.6)$$

siendo $\boldsymbol{\rho}_s = (\mathbf{u}_s, w_s)$ las coordenadas espacio-frecuenciales de la imagen producida por un escaneo 3D de la muestra. Los términos que aparecen en el interior de los corchetes representan la nueva OTF (H_{SISM}), la cual es el resultado de la convolución entre la antigua OTF y el espectro frecuencial del patrón de iluminación.

Consideremos ahora un patrón de iluminación generado por la interferencia de 4 ondas planas que viajan respetando una simetría, 2 a 2, en términos de ángulos respecto del eje óptico. En términos matemáticos, supondremos una generalización de la iluminación propuesta en 3.5 tal que ahora tenemos

$$s(\mathbf{x}, z) \propto 2 \cos(\pi Ax) + \cos(\pi Ay). \quad (6.7)$$

Una vez interactúa con los fluoroforos de la muestra, este patrón de iluminación se puede expresar de la siguiente manera,

$$S(\mathbf{x}, z) = |e^{i\pi Ax} + e^{-i\pi Ax} + e^{i\pi Ay} + e^{-i\pi Ay}|^2. \quad (6.8)$$

Desarrollando esta expresión, obtenemos

$$\begin{aligned} S(\mathbf{x}, z) = & 4 + e^{i2\pi Ax} + e^{-i2\pi Ax} + e^{i2\pi Ay} + e^{-i2\pi Ay} + \\ & + e^{i\pi A(x+y)} + e^{i\pi A(x-y)} + e^{i\pi A(y-x)} + e^{-i\pi A(x+y)}. \end{aligned} \quad (6.9)$$

Teniendo en cuenta este tipo de iluminación en la Ec. 6.6, podemos expresar

$$\tilde{I}_{SISM}(\boldsymbol{\rho}_s) = \tilde{O}(\boldsymbol{\rho}_s) H_{SISM}(\boldsymbol{\rho}_s), \quad (6.10)$$

donde

$$\begin{aligned} H_{SISM}(\boldsymbol{\rho}_s) = & 4H(\boldsymbol{\rho}_s) + \\ & + H(u_s - A, v_s, w_s) + H(u_s + A, v_s, w_s) + \\ & + H(u_s, v_s - A, w_s) + H(u_s, v_s + A, w_s) + \\ & + H(u_s - \frac{A}{2}, v_s - \frac{A}{2}, w_s) + H(u_s + \frac{A}{2}, v_s - \frac{A}{2}, w_s) + \\ & + H(u_s - \frac{A}{2}, v_s + \frac{A}{2}, w_s) + H(u_s + \frac{A}{2}, v_s + \frac{A}{2}, w_s). \end{aligned} \quad (6.11)$$

Como puede verse esto significa que la técnica SISM genera una OTF 3D que está compuesta por la superposición de varias OTF convencionales, las cuales están desplazadas del origen a posiciones dadas por los órdenes de difracción de la iluminación. En particular, si la frecuencia de modulación del patrón de iluminación (A) coincide con la frecuencia de corte del sistema óptico, entonces la OTF resultante dobla la resolución en ambas direcciones x e y simultáneamente, además de incrementar la resolución en la dirección diagonal en 1.5 veces. A estas alturas la potenciabilidad de esta nueva técnica ya quedaría patente, pero esta técnica proporciona otras propiedades ópticas como el seccionado óptico. Como se puede ver en la Fig. 6.1, la OTF 3D resultante es capaz de rellenar el cono de pérdidas en el

dominio de Fourier, lo cual indica que este nuevo microscopio tiene la capacidad de generar seccionado óptico similar al que se obtendría con un microscopio confocal. Este resultado no solo aporta el máximo aumento en resolución capaz de generar un sistema SIM, sino que además posee la capacidad de proporcionar seccionado óptico simultáneamente. Nótese que en un SIM por interferencia de dos ondas no es posible duplicar la resolución de la reconstrucción y obtener seccionado óptico simultáneamente.

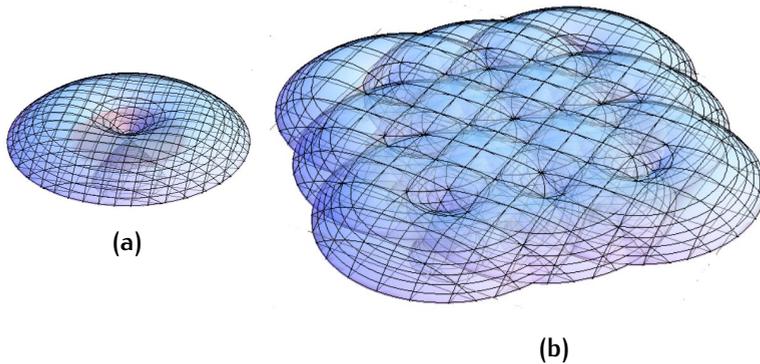


Figura 6.1: Representación gráfica tridimensional de la OTF-3D en un sistema convencional (a) y en el sistema SISIM propuesto (b). La OTF-3D convencional presenta el típico cono de pérdidas de las frecuencias axiales prohibiendo el seccionado óptico de la muestra. Las réplicas en la OTF-3D del sistema SEISM llenan el cono de pérdidas garantizando el seccionado óptico de la muestra en este caso.

Hay que tener en cuenta que en este caso no es necesario un procesamiento adicional tras la captura para lograr un incremento en resolución transversal, con su tiempo de cómputo respectivo. Es de destacar que este sistema se diferencia sustancialmente de un sistema SIM multifocal [57], en el cual se usa un array de puntos focalizados para obtener una reducción sustancial en el tiempo de adquisición.

Para validar esta técnica innovadora primero se relizarán una serie de simulaciones que muestren las mejoras y posteriormente se validará experimentalmente.

6.3 SIMULACIÓN

Para la simulación en primera instancia, se generó computacionalmente una muestra bidimensional uniforme, infinitesimal en la dirección axial, y energéticamente homogénea ($O(\mathbf{r}) = \delta(z)$). Dicha muestra se iluminó con un patrón interferencial como el que aparece en 6.9 y se simuló la formación de imágenes. Se consideró una frecuencia para el patrón sobre la muestra del 98% de la frecuencia de corte de la OTF del sistema de colección. En la Fig. 6.2 se puede observar la distribución de intensidades

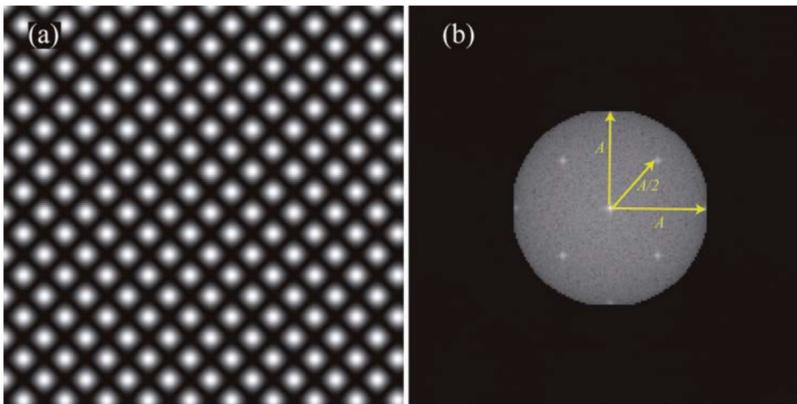


Figura 6.2: (a) Imagen simulada de una muestra fluorescente uniforme de extensión axial infinitesimal, sometida al patrón de iluminación SIMS propuesto. Nótese que éste es invariante con la posición axial considerada. (b) Transformada de Fourier de dicha imagen. La frecuencia del patrón de iluminación se ha ajustado al 98% de la frecuencia de corte de la OTF.

en el espacio imagen del sistema óptico y su correspondiente transformada de Fourier. Para facilitar la visualización de esta última, se añadió a la muestra un ruido blanco de bajo nivel que proporciona un fondo casi uniforme dentro del soporte de la OTF. A continuación, se simuló el escaneo necesario de la imagen midiendo la intensidad capturada por uno de los píxeles correspondiente a un máximo de la iluminación del patrón para cada uno de los pasos, lo que da lugar a la intensidad escaneada

(I_{SISM}). Todos los cálculos fueron realizados usando el programa Matlab®.

En primer lugar, con el fin de estudiar la PSF de este nuevo sistema SISM se generó un objeto puntual, es decir, $O(\mathbf{r}) = \delta(\mathbf{r})$. Las simulaciones generadas y sus comparaciones con un sistema de microscopía convencional se muestran en la Fig. 6.3. La PSF

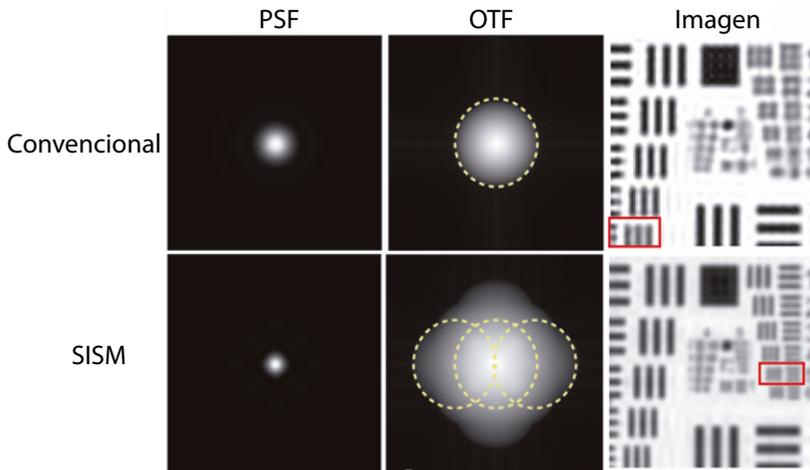


Figura 6.3: Comparación de la OTF en el plano $w_s = 0$. Comparación de la PSF transversal ($z_s = 0$) (primera columna), de la OTF transversal ($w_s = 0$) (columna central) y de la reconstrucción final de un test de resolución USAF 1951® (última columna), entre un microscopio convencional (primera fila) y la propuesta SISM (segunda fila) con la misma frecuencia óptica de corte original. De los círculos discontinuos de igual radio se observa el doble ancho de banda en SISM respecto la convencional.

del sistema SISM llega a ser hasta 2 veces más estrecha que en un sistema convencional. Esta mejora, y en general cualquier concepto dentro de este marco óptico, se puede entender mejor en el dominio de Fourier, el cual corresponde, de hecho, con la OTF del sistema. Como puede verse en la Fig. 6.3, la OTF posee el doble de ancho de banda respecto a la simulación convencional en dos direcciones transversales perpendiculares entre ellas, a la vez que se incrementa en un factor 1.5 en la diagonal. Adicionalmente, se realizó una simulación en SISM usando como objeto la imagen

de un test USAF 1951®. En este resultado se aprecia una mejora en resolución de un grupo en ambas direcciones perpendiculares comparado con la imagen convencional, lo cual corresponde con una mejora en la resolución espacial en un factor cercano a 2.

6.4 VALIDACIÓN EXPERIMENTAL

6.4.1 Montaje experimental

Para la validación experimental, se construyó un sistema SIMS formado por un microscopio convencional de campo claro al que se le injertó un brazo de iluminación el cual nos proporcionaba el patrón de iluminación estructurada con las 4 ondas planas descrito anteriormente. Un esquema del montaje se muestra en la Fig. 6.4.

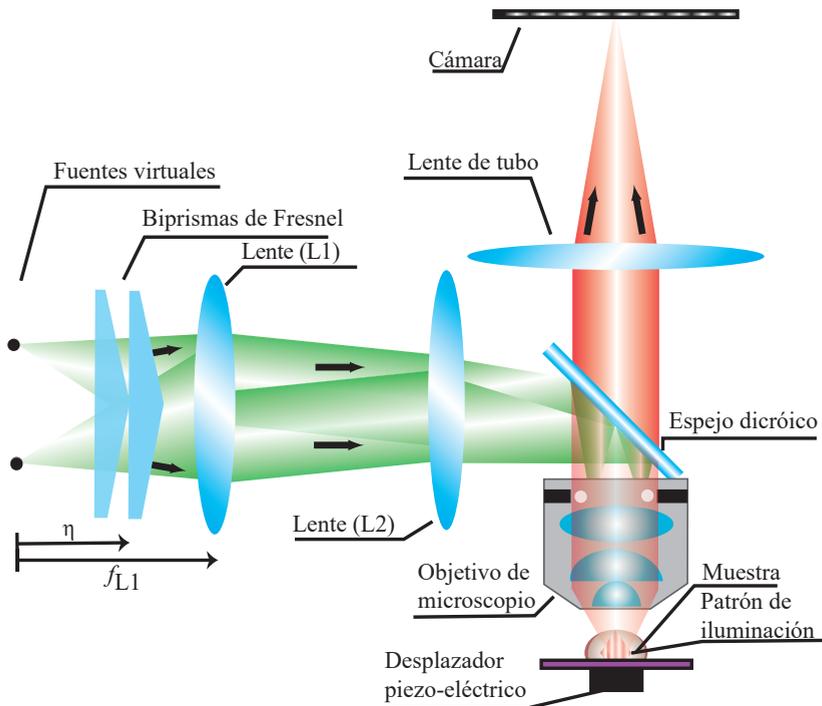


Figura 6.4: Esquema del dispositivo experimental.

Aunque existen diversas formas de generar el patrón de franjas deseado (por ejemplo un modulador espacial de luz o redes de difracción), usamos la combinación de 2 biprismas de Fresnel con diferente ángulo de refringencia (1° y 1.5°) dispuestos de forma que sus aristas estuvieran perpendiculares entre sí. Este elemento ha sido usado anteriormente para generar iluminación estructurada [61] y [21], tal y como indicamos en capítulos previos. Hay que destacar que para nuestro fin, este elemento es especialmente adecuado dado que prácticamente toda la luz que lo atraviesa se emplea en la iluminación. Los biprismas se sitúan entre la salida de la fibra del laser ($\lambda=488$ nm) y la lente colimadora de 100 mm de focal. Este montaje genera 4 fuentes puntuales coherentes entre sí tanto espacial como temporalmente, equidistantes todas ellas respecto del eje óptico, es decir, localizadas en los vértices de un cuadrado. Como ya se comentó, la distancia entre las distintas réplicas de la fuente puntual depende del ángulo del biprisma y de la distancia de estos biprismas con la salida de la fibra óptica.

Es importante la equidistancia de las fuentes virtuales respecto del eje óptico. Para elegir una distancia óptima entre ambos biprismas, las 4 fuentes virtuales debían estar situadas en los vértices de un cuadrado y no de un rectángulo, en cuyo caso la frecuencia de modulación del patrón será distinta en ambas direcciones ortogonales y, por tanto, la resolución de la imagen final también será distinta dependiendo de la dirección. Una vez fijada la distancia entre los biprismas, se podían desplazar estos biprismas entre la salida del láser y la lente colimadora para elegir la frecuencia de modulación del patrón generado a voluntad. La lente de iluminación (L2) de 300 mm de focal genera una imagen de las fuentes virtuales sobre la pupila de un objetivo conjugado con el infinito, generando así el patrón de iluminación deseado en el espacio objeto del objetivo. La luz emitida por la muestra es entonces recogida por el mismo objetivo de microscopio y, a través de la lente de tubo de 300 mm de focal, se genera la focalización de la luz, y consecuentemente la imagen, en el sensor de la cámara. Esta distancia focal de la lente de tubo se escogió de manera que la PSF ocupara suficientes píxeles en el sensor como para poder ser muestreada apropiadamente. La muestra se montó sobre un desplazador piezo-eléctrico (Piezosystem Jena®),

el cual permitía un rango de desplazamiento de $80 \mu\text{m}$ con una precisión de $0.1 \mu\text{m}$. Para obtener el escaneo de la intensidad capturada se usó una interfaz en el programa Labview®. Esta interfaz nos facilitaba la selección de unos pocos píxeles del sensor e integraba su intensidad para cada uno de los pasos del escaneo [58], actuando a modo de pinhole virtual.

6.4.2 Resultados

En una primera etapa de validación, se construyó un experimento como prueba de concepto para validar la mejora en la resolución producida por el sistema propuesto. Se usó un test de resolución USAF 1951® fluorescente como objeto, y un objetivo de microscopio de baja apertura numérica ($M = 10\times$, $NA=0.1$). La distribución de intensidades resultante de la interacción entre la muestra y el patrón de iluminación se puede observar con el mero hecho de capturar el campo del espacio objeto del objetivo de microscopio mediante una captura de campo claro (Fig. 6.5(a)), es decir sin necesidad de escanear la muestra. Este modo

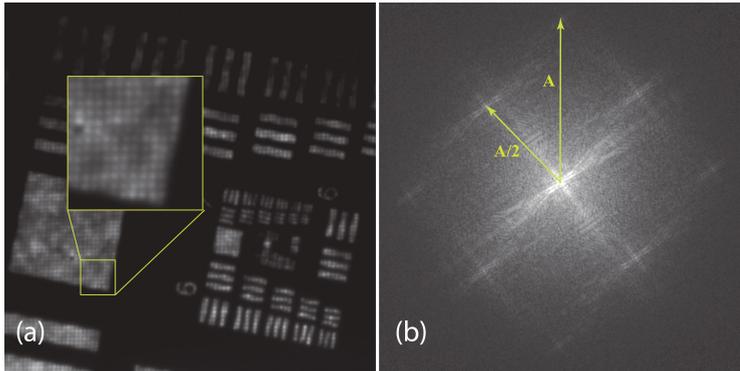


Figura 6.5: (a) Distribución de intensidades en el plano de la cámara como resultado de la interacción entre la muestra y el patrón de iluminación. (b) Transformada de Fourier.

de campo claro es especialmente útil a la hora de seleccionar la frecuencia de modulación del patrón de iluminación, ya que fijándonos en la transformada de Fourier somos capaces de aumentar o disminuir la frecuencia de modulación hasta el momento en

el veamos los órdenes de difracción próximos a los extremos del soporte compacto de la OTF del sistema (Fig. 6.5(b)). Como predice la teoría en Ec. 6.10 y Ec. 6.11, existen 9 componentes en el dominio de Fourier del objeto con el patrón de iluminación. Con el fin de obtener una imagen SISM se seleccionó un estenope sintético de 2×2 píxeles y se llevó a cabo un escaneo transversal de los grupos de mayor frecuencia espacial del test con los que demostraremos el aumento en resolución. Se capturó una segunda imagen tras la retirada de los biprismas de Fresnel, lo que equivale a una captura con un sistema convencional. Tanto la imagen convencional como la realizada con SISM se muestran en la Fig. 6.6. En esta figura se puede apreciar el sustancial aumento en resolución adquirido con esta nueva técnica. En la imagen procesada con SISM, la mínima anchura de línea que se resuelve, tomando el convenio de Rayleigh, es de $1.38 \mu\text{m}$. Esto supone que la imagen obtenida por el sistema SISM posee una resolución igual a la que se obtendría en un sistema convencional que poseyera un objetivo de microscopio cuya apertura numérica fuera de $NA=0.18$, valor muy próximo al $NA=0.2$, límite predicho por la teoría.

Con el fin de comprobar que la frecuencia del patrón de iluminación estructurada proyectado sobre la muestra afecta a la resolución final de la imagen, se llevaron a cabo una serie de medidas utilizando distintas frecuencias de modulación del patrón. Esta variación de la frecuencia espacial puede ser realizada simplemente desplazando los biprismas axialmente entre la salida de la fibra y la lente colimadora. Se realizó una selección representativa de frecuencias de modulación del 20%, 60% y 90% de la frecuencia de corte del objetivo de microscopio. Las imágenes SISM del test y sus respectivas transformadas de Fourier se muestran en la Fig. 6.7. Como se puede ver en la figura, la resolución de las imágenes mejora a medida que la frecuencia espacial del patrón de iluminación incrementa.

Una vez validado el método para una apertura numérica relativamente baja, nuestro objetivo ahora es mostrar la funcionalidad de la técnica SISM haciendo uso de un objetivo de microscopio de mayor apertura numérica. Dado que estamos limitados por el menor paso que nuestro desplazador piezo-eléctrico nos puede

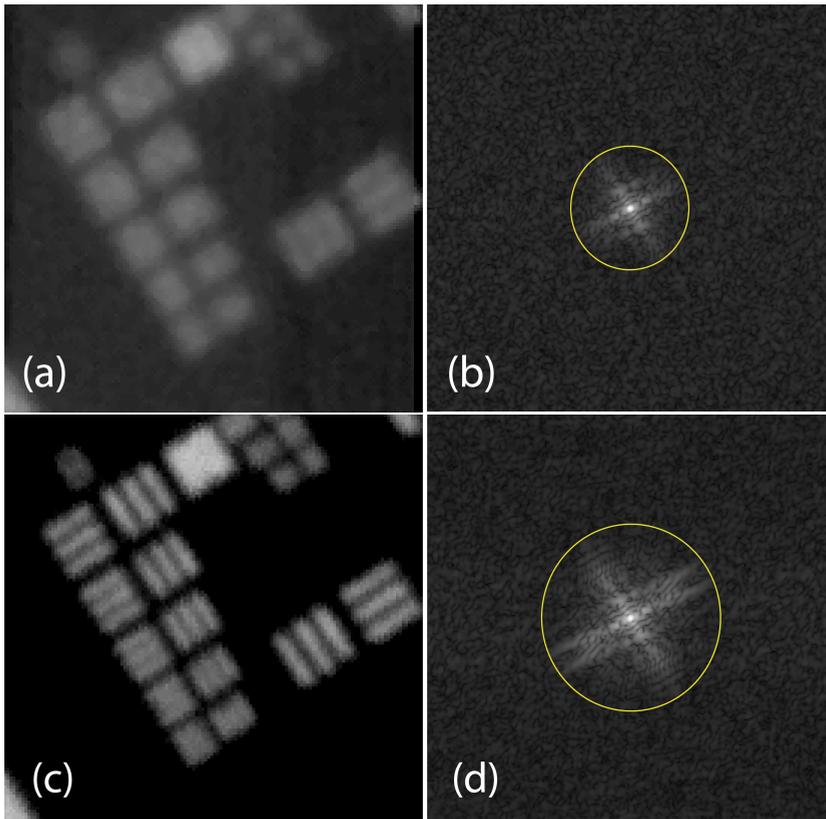


Figura 6.6: (a) Distribución de intensidades tras el escaneo de la muestra en un microscopio convencional y (b) su respectiva transformada de Fourier. (c) Distribución de intensidades tras el escaneo en el SIMS y (d) su transformada de Fourier

proporcionar, usamos un objetivo de microscopio cuya apertura numérica era de $NA=0.6$. Sin embargo, hay que tener presente que no existen límites teóricos o prácticos en términos de la apertura numérica que puede ser usada. Medimos el tamaño transversal del diámetro de la PSF usando una serie de nanoesferas fluorescentes de 100 nm de radio aproximadamente. Como se puede apreciar en la Fig. 6.8, la técnica SIMS proporciona una PSF que transversalmente es menor en tamaño que su homóloga convencional. Se realizó la medida y se calculó el valor medio de una serie de perfiles del diámetro de la nanoesfera, tal como se puede ver en la Fig. 6.8.

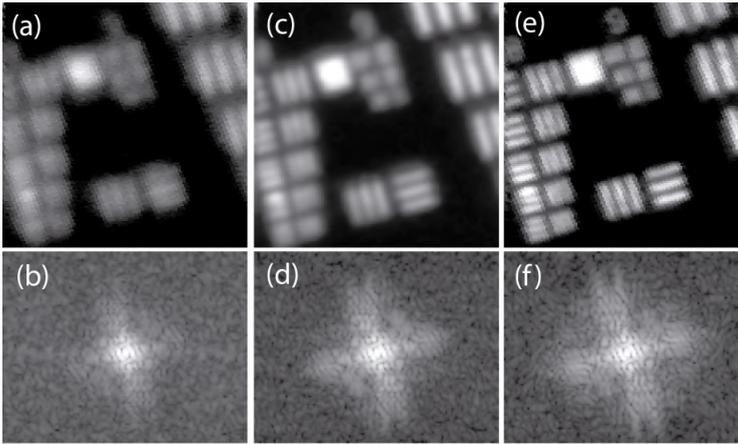


Figura 6.7: Imágenes de un test de resolución USAF 1951® fluorescente y sus correspondientes transformadas de Fourier capturadas utilizando distintas frecuencias de modulación del patrón: con un 20% de la frecuencia de corte de la OTF **(a-b)**, un 60% **(c-d)** y un 90% **(e-f)**.

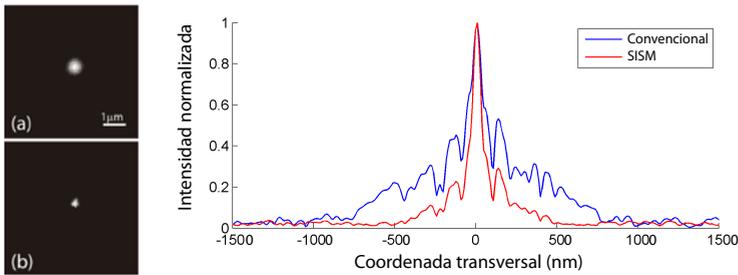


Figura 6.8: Medida de la PSF mediante el escaneo de un objeto puntal fluorescente menor que la PSF del sistema, en un sistema convencional **(a)** y en el SIMS **(b)**. Un perfil de ambas PSFs **(derecha)** muestra la diferencia de tamaños.

A partir de estos perfiles se midió la anchura a media altura (FWHM) de un corte transversal de la PSF. La PSF convencional media $0.59 \mu\text{m}$, coincidiendo con el valor teórico para una apertura numérica de $NA=0.6$, mientras que la anchura a media altura en el SIMS era de $0.31 \mu\text{m}$. Esto se corresponde con una apertura numérica efectiva de 1.1 lo que está próximo a doblar la resolución del objetivo de microscopio. Tengamos en cuenta

que sin un medio de inmersión para la muestra, no es posible alcanzar valores de NA superiores a la unidad en microscopios con sistemas convencionales.

En un tercer experimento se obtuvo la imagen de una solución de fibras de celulosa similar a la utilizada en el capítulo 4.4. Se adquirieron imágenes con un campo en el espacio objeto del objetivo de microscopio de $8 \times 8 \mu\text{m}$ con el sistema convencional y con el SISM, tal como aparecen en la Fig. 6.9.

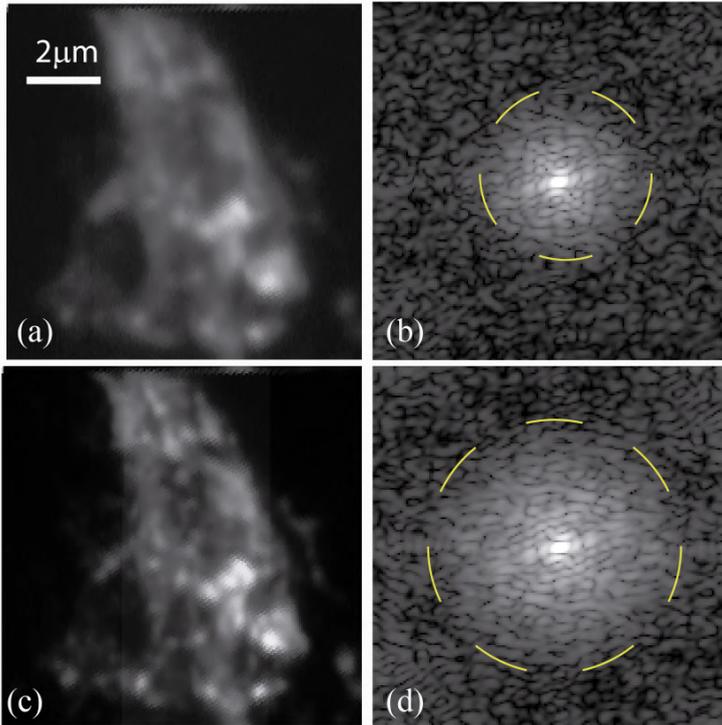


Figura 6.9: Imágenes de muestras de celulosa y sus correspondientes transformadas de Fourier para un microscopio convencional (a-b) y para el SISM (c-d).

En la distribución de intensidades de la muestra, a simple vista podemos reconocer un aumento en la resolución, como podemos ver en la comparación de las subfiguras Fig. 6.9(a) y Fig. 6.9(c). Para realizar una justificación de este aumento de la resolución más fundamentada se realizaron las transformadas de Fourier de ambas imágenes y así se pudo cuantificar este aumento. A

partir del espectro frecuencial, no solo se puede apreciar la forma teórica del SISM, sino que además se puede medir ese aumento doble en el ancho de banda frecuencial entre ambas imágenes. Una medida del valor de la frecuencia de corte del sistema SISM proporcionó un valor de $3,3 \mu\text{m}^{-1}$. Esta frecuencia de corte es equivalente a poseer un objetivo de microscopio cuya $NA=1.1$. De nuevo, este valor está muy próximo al límite teórico de 1.2.

Como último experimento para dicha validación experimental del método se evaluó empíricamente la capacidad de seccionado óptico del sistema. Para este propósito, se llevó a cabo un escaneo axial de una muestra fluorescente delgada en la dirección z , usando para ello el mismo objetivo de microscopio ($NA=0.6$) tanto con iluminación estructurada como uniforme. En la Fig. 6.10 se pueden observar las distribuciones de intensidad escaneadas. Debido a la ausencia de seccionado óptico, la lámina uniforme produce una intensidad integrada prácticamente uniforme en el caso convencional. Por el contrario, el escaneo SISM muestra claramente su capacidad de seccionado óptico dado que la luz fuera de foco ha sido completamente eliminada. La anchura a media altura de la intensidad integrada para este caso es de unas $2 \mu\text{m}$. Este valor está próximo al que se obtiene con un microscopio confocal con la misma apertura numérica cuya resolución axial es de $1.7 \mu\text{m}$ aproximadamente.

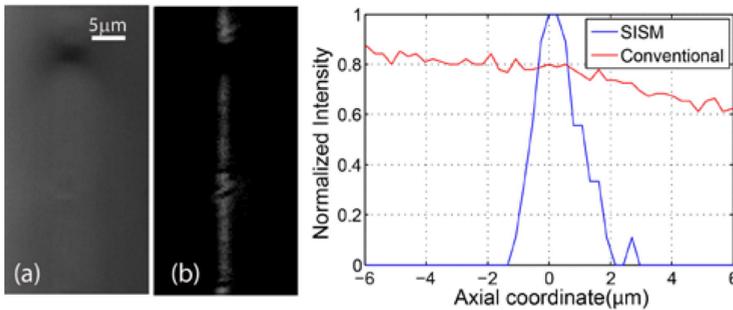


Figura 6.10: Comparación de la medida en intensidad del escaneo axial en una muestra delgada en la dirección axial en un microscopio convencional (a) y en el SISM (b). La gráfica de la derecha representa la intensidad integrada de ambas medidas.

7

CONCLUSIONES

A lo largo del trabajo hemos obtenido resultados que facilitan y mejoran los procesos de captura y reconstrucción de imágenes microscópicas 3D en diferentes ámbitos. Al inicio del estudio hemos presentado cuáles son las propiedades ópticas más importantes en los sistemas de microscopía óptica, como son la resolución, la capacidad de seccionado óptico y la velocidad tanto de captura como de reconstrucción de la información tridimensional. Un detallado estudio del proceso que conlleva la captura de la información 3D en los sistemas SIM ha desembocado en la propuesta de una técnica innovadora para la determinación del desplazamiento automática del patrón de iluminación, con sus respectivas demostraciones teórica, simulada y experimental. A continuación, hemos incorporado el efecto del tamaño finito de los elementos ópticos que conforman un sistema SIM, realizando un análisis de dos de las propiedades del patrón de iluminación generado: la extensión del campo *útil* de iluminación y su visibilidad. Este estudio ha permitido diseñar la disposición de los elementos ópticos del sistema SIM para optimizar ambas características de modo conjunto. Por último, el estudio de diversas técnicas de microscopía nos ha llevado a la invención de un nuevo tipo de microscopio capaz de alcanzar resoluciones laterales por encima del límite impuesto por la difracción y simultáneamente con la capacidad de obtener seccionado óptico de la muestra. Estas características se logran por la correcta combinación entre una iluminación estructurada de la muestra seguida de un escaneo estructurado de la misma. En el caso en el que la frecuencia de modulación espacial del patrón de iluminación esté próxima a la frecuencia de corte de la OTF del sistema, esta técnica es capaz de obtener el doble de resolución lateral que un sistema convencional. Además, la técnica es estable y no requiere la necesidad de un post procesamiento de la información ni de un

desplazamiento del patrón de iluminación sobre la muestra para conseguir imágenes con superresolución, a diferencia de lo que ocurre en la técnica SIM. Con ello se limitan fuertemente los requerimientos computacionales, tanto de velocidad de cálculo como de disponibilidad de memoria. Adicionalmente, el patrón de iluminación es extenso lateralmente al contrario de lo que ocurre en un microscopio confocal, así evitamos el *photobleaching* de la muestra que puede ocurrir en técnicas que requieren un haz de iluminación focalizado. La validación de la técnica se ha realizado tanto teóricamente como mediante simulaciones, así como a través de resultados experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] K. ULUÇ, G. C. KUJOTH y M. K. BAŞKAYA, «Operating microscopes: past, present, and future», *Neurosurgical Focus* **27**, n.º 3 (2009) E4.
- [2] W. J. CROFT, *Under the microscope: a brief history of microscopy*. Singapur, World Scientific (2006).
- [3] J. HOGG, *The microscope: Its history, construction, and applications*. Londres, Illustrated London Library (1854).
- [4] T. C. KRISS y V. M. KRISS, «History of the operating microscope: from magnifying glass to microneurosurgery», *Neurosurgery* **42**, n.º 4 (1998) 899-907.
- [5] H. GEST, «The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society», *Notes and Records of the Royal Society of London* **58**, n.º 2 (2004) 187-201.
- [6] A. J. WOLLMAN, R. NUDD, E. G. HEDLUND y M. C. LEAKE, «From Animaculum to single molecules: 300 years of the light microscope», *Open Biology* **5**, n.º 4 (2015) 150019.
- [7] E. ABBE, «A Contribution to the Theory of the Microscope and the Nature of Microscopic Vision», *Proceedings of the Bristol Naturalists' Society* **1** (1876) 200–261.
- [8] L. RAYLEIGH, «XXXI. Investigations in optics, with special reference to the spectroscope», *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **8**, n.º 49 (1879) 261-274.
- [9] L. SCHERMELLEH, R. HEINTZMANN y H. LEONHARDT, «A guide to super-resolution fluorescence microscopy», *Journal of Cell Biology* **190**, n.º 2 (2010) 165-175.
- [10] T. WILSON, «Optical sectioning in fluorescence microscopy», *Journal of Microscopy* **242**, n.º 2 (2011) 111-116.

- [11] M. G. L. GUSTAFSSON, «Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy», *Journal of Microscopy* **198**, n.º 2 (2000) 82-87.
- [12] J. R. ALLEN, S. T. ROSS y M. W. DAVIDSON, «Structured Illumination Microscopy for Superresolution», *ChemPhys-Chem* **15**, n.º 4 (2014) 566-576.
- [13] M. MINSKY, «Microscopy apparatus», *Patente Estadounidense* **3013467** (1961) .
- [14] J. B. PAWLEY, M. BLOUKE y J. R. JANESICK, «CCDiode: an optimal detector for laser confocal microscopes», *Proceedings of the SPIE* **2655** (1996) 125 -129.
- [15] C. SHEPPARD y D. SHOTTON, *Confocal laser scanning microscopy*. Oxford, BIOS Scientific Publishers (1997).
- [16] J. W. GOODMAN, *Introduction to Fourier optics*. Greenwood Village (CO), Roberts y Company Publishers (2005).
- [17] M. BORN y E. WOLF, *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*. Cambridge, Cambridge University Press, (1999).
- [18] M. MARTÍNEZ CORRAL, W. FURLAN, A. PONS MARTÍ y G. SAAVEDRA TORTOSA, *Instrumentos ópticos y optométricos: Teoría y prácticas*. Valencia, Publicacions de la Universitat de València, (1998).
- [19] A. J. DEN DEKKER y A. VAN DEN BOS, «Resolution: a survey», *Journal of the Optical Society of America A* **14**, n.º 3 (1997) 547-557.
- [20] M. MARTÍNEZ y G. SAAVEDRA, «The resolution challenge in 3D optical microscopy», *Progress in Optics* **53** (2009) 1-67.
- [21] H. SHABANI, A. DOBLAS, G. SAAVEDRA, E. SANCHEZ-ORTIGA y C. PREZA, «Improvement of two-dimensional structured illumination microscopy with an incoherent illumination pattern of tunable frequency», *Applied Optics* **57**, n.º 7 (2018) B92-B101.
- [22] M. G. GUSTAFSSON, «Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy», *Journal of Microscopy* **198**, n.º 2 (2000) 82-87.

- [23] R. FIOŁKA, L. SHAO, E. H. REGO, M. W. DAVIDSON y M. G. GUSTAFSSON, «Time-lapse two-color 3D imaging of live cells with doubled resolution using structured illumination», *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, n.º 14 (2012) 5311-5315.
- [24] M. G. GUSTAFSSON, L. SHAO, P. M. CARLTON, C. J. R. WANG, I. N. GOLUBOVSKAYA, W. Z. CANDE, D. A. AGARD y J. W. SEDAT, «Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination», *Biophysical Journal* **94**, n.º 12 (2008) 4957-4970.
- [25] E. SÁNCHEZ-ORTIGA, A. DOBLAS, G. SAAVEDRA y M. MARTINEZ-CORRAL, «Novel proposals in widefield 3D microscopy», *Proceedings of the SPIE* **7690** (2010) 769005.
- [26] M. A. NEIL, R. JUŠKAITIS y T. WILSON, «Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope», *Optics Letters* **22**, n.º 24 (1997) 1905-1907.
- [27] S. A. SHROFF, J. R. FIENUP y D. R. WILLIAMS, «Phase-shift estimation in sinusoidally illuminated images for lateral superresolution», *Journal of the Optical Society of America A* **26**, n.º 2 (2009) 413-424.
- [28] K. WICKER, O. MANDULA, G. BEST, R. FIOŁKA y R. HEINTZMANN, «Phase optimisation for structured illumination microscopy», *Optics Express* **21**, n.º 2 (2013) 2032-2049.
- [29] K. WICKER, «Non-iterative determination of pattern phase in structured illumination microscopy using auto-correlations in Fourier space», *Optics Express* **21**, n.º 21 (2013) 24692-24701.
- [30] J. SOLA-PIKABEA, A. GARCÍA-RIUS, G. SAAVEDRA, J. GARCÍA-SUCERQUIA, M. MARTINEZ-CORRAL y E. SÁNCHEZ-ORTIGA, «Fast and robust phase-shift estimation in two-dimensional structured illumination microscopy», *PLOS ONE* **14**, n.º 8 (2019) e0221254.
- [31] J. SOLA-PIKABEA, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, G. SAAVEDRA y M. MARTÍNEZ-CORRAL, «Phase-Shift Estimation in Structured Illumination Microscopy by Normalized Peak Intensity Difference», en *Focus on Microscopy*, Londres (Reino Unido) 2019.

- [32] J. SOLA-PIKABEA, E. SÁNCHEZ-ORTIGA, A. GARCÍA-RIUS, G. SAAVEDRA, J. GARCÍA-SUCERQUIA y M. MARTÍNEZ-CORRAL, «Microscopía por iluminación estructurada con determinación iterativa de desplazamiento de fase», en *XII Reunión Nacional de Óptica*, Castellón (España) 2018.
- [33] M. LAHRBERG, M. SINGH, K. KHARE y B. S. AHLUWALIA, «Accurate estimation of the illumination pattern's orientation and wavelength in sinusoidal structured illumination microscopy», *Applied Optics* **57**, n.º 5 (2018) 1019-1025.
- [34] R. HEINTZMANN, P. K. RELICH, R. P. NIEUWENHUIZEN, K. A. LIDKE y B. RIEGER, «Calibrating photon counts from a single image», *arXiv preprint arXiv:1611.05654* (2016) .
- [35] M. A. A. NEIL, T. WILSON y R. JUSKAITIS, «A light efficient optically sectioning microscope», *Journal of Microscopy* **189**, n.º 2 (1998) 114-117.
- [36] T. FUKANO y A. MIYAWAKI, «Whole-field fluorescence microscope with digital micromirror device: imaging of biological samples», *Applied Optics* **42**, n.º 19 (2003) 4119-4124.
- [37] J.-Y. LIN, R.-P. HUANG, P.-S. TSAI y C.-H. LEE, «Wide-field super-resolution optical sectioning microscopy using a single spatial light modulator», *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics* **11**, n.º 1 (2008) 015301.
- [38] A. DOBLAS, H. SHABANI, G. SAAVEDRA y C. PREZA, «Comparison of 3D structured patterns with tunable frequency for use in structured illumination microscopy», *Proceedings of the SPIE* **10070** (2017) 100700H.
- [39] A. DOBLAS, H. SHABANI, G. SAAVEDRA y C. PREZA, «Tunable-frequency three-dimensional structured illumination microscopy with reduced data-acquisition», *Optics Express* **26**, n.º 23 (2018) 30476-30491.
- [40] A. DOBLAS, S. BEDOYA y C. PREZA, «Wollaston prism-based structured illumination microscope with tunable frequency», *Appl. Opt.* **58**, n.º 7 (2019) B1-B8.

- [41] A. DOBLAS, G. SAAVEDRA, M. MARTINEZ-CORRAL, J. C. BARRERO, E. SANCHEZ-ORTIGA y A. LLAVADOR, «Axial resonance of periodic patterns by using a Fresnel biprism», *Journal of the Optical Society of America A* **30**, n.º 1 (2013) 140-148.
- [42] J. SOLA-PIKABEA, A. DOBLAS, G. SAAVEDRA, M. MARTINEZ-CORRAL y C. PREZA, «Optimal design of incoherent tunable-frequency structured illumination microscope scheme», *Proceedings of the IEEE 15th International Symposium on Biomedical Imaging* (2018) 449-452.
- [43] J. SOLA-PIKABEA, A. DOBLAS, G. SAAVEDRA, M. MARTÍNEZ-CORRAL y C. PREZA, «Diseño óptimo de un sistema de iluminación estructurada incoherente con frecuencia variable», en *XII Reunión Nacional de Óptica*, Castellón (España) 2018.
- [44] S. W. HELL y J. WICHMANN, «Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy», *Optics Letters* **19**, n.º 11 (1994) 780-782.
- [45] W. LUKOSZ, «Optical systems with resolving powers exceeding the classical limit», *Journal of the Optical Society of America* **56**, n.º 11 (1966) 1463-1471.
- [46] W. LUKOSZ, «Optical systems with resolving powers exceeding the classical limit. II», *Journal of the Optical Society of America* **57**, n.º 7 (1967) 932-941.
- [47] R. HEINTZMANN y C. G. CREMER, «Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating», *Proceedings of the SPIE* **3568** (1999) 185-196.
- [48] M. G. GUSTAFSSON, «Extended resolution fluorescence microscopy», *Current Opinion in Structural Biology* **9**, n.º 5 (1999) 627-628.
- [49] G. E. CRAGG y P. T. SO, «Lateral resolution enhancement with standing evanescent waves», *Optics Letters* **25**, n.º 1 (2000) 46-48.

- [50] R. FEDOSSEEV, Y. BELYAEV, J. FROHN y A. STEMMER, «Structured light illumination for extended resolution in fluorescence microscopy», *Optics and Lasers in Engineering* **43**, n.º 3-5 (2005) 403-414.
- [51] J. FROHN, H. KNAPP y A. STEMMER, «Three-dimensional resolution enhancement in fluorescence microscopy by harmonic excitation», *Optics Letters* **26**, n.º 11 (2001) 828-830.
- [52] M. G. GUSTAFSSON, D. A. AGARD y J. W. SEDAT, «Doubling the lateral resolution of wide-field fluorescence microscopy using structured illumination», *Proceedings of the SPIE* **3919** (2000) 141-150.
- [53] S. T. HESS, T. P. GIRIRAJAN y M. D. MASON, «Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy», *Biophysical Journal* **91**, n.º 11 (2006) 4258-4272.
- [54] E. BETZIG, G. H. PATTERSON, R. SOUGRAT, O. W. LINDWASSER, S. OLENYCH, J. S. BONIFACINO, M. W. DAVIDSON, J. LIPPINCOTT-SCHWARTZ y H. F. HESS, «Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution», *Science* **313**, n.º 5793 (2006) 1642-1645.
- [55] M. J. RUST, M. BATES y X. ZHUANG, «Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)», *Nature Methods* **3**, n.º 10 (2006) 793.
- [56] C. J. SHEPPARD, «Super-resolution in confocal imaging», *Optik* **80**, n.º 2 (1988) 53-54.
- [57] A. G. YORK, S. H. PAREKH, D. DALLE NOGARE, R. S. FISCHER, K. TEMPRINE, M. MIONE, A. B. CHITNIS, C. A. COMBS y H. SHROFF, «Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy», *Nature Methods* **9**, n.º 7 (2012) 749.
- [58] E. SÁNCHEZ-ORTIGA, C. J. SHEPPARD, G. SAAVEDRA, M. MARTÍNEZ-CORRAL, A. DOBLAS y A. CALATAYUD, «Subtractive imaging in confocal scanning microscopy using a CCD camera as a detector», *Optics Letters* **37**, n.º 7 (2012) 1280-1282.

- [59] S. ROTH, C. J. SHEPPARD, K. WICKER y R. HEINTZMANN, «Optical photon reassignment microscopy (OPRA)», *Optical Nanoscopy* **2**, n.º 1 (2013) 5.
- [60] M. MARTÍNEZ-CORRAL, G. SAAVEDRA, J. SOLA-PIKABEA y E. SÁNCHEZ-ORTIGA, «Microscopio óptico por fluorescencia y método para la obtención de imágenes de microscopía óptica por fluorescencia», *Patente Española P31769ESoo-SOL* (2019).
- [61] E. SÁNCHEZ-ORTIGA, M. MARTÍNEZ-CORRAL, G. SAAVEDRA y J. GARCIA-SUCERQUIA, «Enhancing spatial resolution in digital holographic microscopy by biprism structured illumination», *Optics Letters* **39**, n.º 7 (2014) 2086-2089.