

VNIVERSITAT Æ VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Física



Tesis doctoral

Técnicas de microscopía para la
mejora en resolución, obtención de
seccionado óptico y medida
cuantitativa de fase

Emilio Sánchez Ortiga

Directores: Dr. Genaro Saavedra Tortosa
Dr. Manuel Martínez Corral
Dr. Jorge I. García Sucerquia

Abril 2014

D. Genaro SAAVEDRA TORTOSA y D. Manuel MARTÍNEZ CORRAL, Catedráticos de Universidad del Departamento de Óptica de la Universitat de València, y D. Jorge I. GARCÍA SUCERQUIA, Profesor Asociado de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

CERTIFICAN que la presente memoria, *Técnicas de microscopía para la mejora en resolución, obtención de seccionado óptico y medida cuantitativa de fase*, resume el trabajo de investigación realizado, bajo su dirección, por D. Emilio SÁNCHEZ ORTIGA 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 veinticuatro de diciembre de dos mil trece.

Fdo. Dr. Genaro Saavedra Tortosa

Fdo. Dr. Manuel Martínez Corral

Fdo. Dr. Jorge I. García Sucerquia

A mi familia

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.

M. Gandhi

Agradecimientos.

Esta sección está dedicada a todos aquellos que han compartido su tiempo, su esfuerzo y su amistad conmigo en estos últimos años. Aunque unas pocas palabras no puedan resumir todo el aprecio y la admiración que siento hacia las personas citadas aquí, espero que al menos sirvan como una pequeña muestra de ambos.

Debo agradecer en primer lugar a mis directores Genaro Saavedra Tortosa y Manuel Martínez Corral por haberme permitido realizar aquello que hace unos años tan sólo parecía un sueño para mí. Siempre han estado cuando les he necesitado, tanto disfrutando de los buenos momentos como apoyándome en los malos. Especialmente con Genaro he compartido el amor al trabajo y a la Ciencia en general. Él me ha enseñado que mucho a veces no es suficiente y que el conocimiento y la inquietud por aprender cosas nuevas mantienen el espíritu del investigador vivo y a su mente despierta. Del mismo modo, hemos compartido muy buenos ratos juntos que quedarán siempre en mi memoria y aparecerán cada vez que recuerde esta etapa de mi vida. Admiro su constante esfuerzo por aprender y enseñar, siendo un ejemplo inmejorable para cualquier estudiante. Igualmente a Manolo le doy las gracias por todo su apoyo, tanto laboral como emocional, enseñándome con su experiencia a mantener la calma en tiempos de estrés. Hemos compartido la pasión por la investigación (las buenas ideas pueden llegar en el momento más inesperado) y una colección de grandes anécdotas. Siempre le estaré agradecido por su cercanía y los buenos consejos que me ha dado y que han hecho que la vida de investigador sea mucho más llevadera. A ambos, de corazón, un millón de gracias.

Gracias también a mi tercer director (y no por ello menos importante) Jorge Iván García Sucerquia. Con su visita no sólo gané un codirector de Tesis, además, conocí a un incansable científico y a un gran amigo. Cuando las fuerzas flaqueaban, él consiguió darme el empujón que necesitaba. Todo el esfuerzo que realizamos juntos tuvo, tiene y tendrá su recompensa.

Tengo mucho que agradecer a otros miembros importantes del Departamento de Óptica de la Universidad de Valencia. En primer lugar a Juan Carlos Barreiro, no olvido que en parte empecé este camino gracias a él y que su ayuda fue fundamental para descubrir lo mucho que me gustaba la Óptica. Gracias a Amparo Pons y a Pedro Andrés, por su insuperable dedicación y por cuidar siempre de los más jóvenes y recién llegados, haciéndoles sentir parte de una gran familia.

Durante este periodo he conocido y compartido mi tiempo con un gran número de compañeros, a los cuales quisiera mostrar mi agradecimiento personal. En primer lugar, gracias a mi compañero de batallas Héctor. Ambos seguimos el mismo camino desde el principio, compartimos risas y algunas lágrimas. Después de tantos años nuestros caminos se separan (tan sólo espero que el destino vuelva a juntarlos en el futuro). A Ana le deseo la mejor de las suertes, estoy seguro de que su constancia y perseverancia darán grandes frutos y le permitirán llegar hasta donde se proponga. No puedo olvidarme de los “chicos plenópticos”, Adrián y Anabel. Estáis empezando lo que yo terminé y sólo les puedo dar un consejo: “Seguid así!”. Aunque su estancia con nosotros fue breve, Josué dejó una gran huella en el grupo. No sólo por su gran hacer reanimando y manteniendo con vida los sistemas informáticos, sino por su honradez y la amistad que, a pesar del paso del tiempo y de la distancia, tratamos igualmente de mantener viva. Al recién llegado Jorge le animo a seguir este camino que, a pesar de ser largo y tortuoso, puede conducirnos en cierto modo a la felicidad.

Gracias a los compañeros de fatigas del grupo DIOG, Laura, Sento, Manu y, especialmente, a Arnau con quien he compartido mucho tiempo (dentro y fuera del laboratorio) y de quien sólo puedo decir que es una de las mejores personas que he conocido. Agradezco también a mis compañeros de Teledetección, Vicent y Carol, por sacarme de vez en cuándo del laboratorio y hacerme siempre reír con su gran sentido del humor.

Debo recordar también el apoyo que tuve cuando empecé mi carrera inves-

tigadora por parte de aquellos que ya tenían años de experiencia. Raúl siempre me dio grandes consejos, sólo espero haberlos seguido en medida de mis posibilidades. Isa me llevó de la mano en mis primeros pasos, “ahora es el turno de tu pequeño”. Gracias a los dos por vuestro tiempo y vuestras enseñanzas.

I would like to thank Prof. Colin Sheppard for permitting me to share some ideas with him. His knowledge and contributions to the Microscopy field are just outstanding. It is impossible to recap how much I learnt from his papers.

Thanks to Prof. Pietro Ferraro (INOA) for his help in the very first step of my research Career. I will be always grateful to him.

Thanks to Prof. Peter Török (Imperial College) for his effort and his kind treatment given to me. Without a doubt he gave me great advices that I always will take into account. It was an honor to work with such remarkable researcher and to spend good times with him in different places around the world.

A Patricia debo decirle que, a pesar de lo que nos depara el futuro, ha sido una de las personas más importantes para mí en estos años. “Sé que has pasado muchas horas esperando tener el tiempo del que al final yo nunca disponía. Gracias por soportarme y por darme siempre todo tu apoyo”.

Por último, quiero agradecer a mi familia por todo lo que me han dado y enseñado en esta vida, sin lo cual no sería la persona que soy. Gracias a mi hermana Ruth y a Fran, y todo mi cariño para el recién llegado a este mundo Javier (a pesar de la distancia intentaré ser un buen tío). A mis padres únicamente les puedo decir que espero poder devolverles una minúscula parte de lo que han hecho por mí. “De momento tenéis todo mi amor”.

A todos vosotros (y a aquellos que olvidé), muchas gracias.

Índice

Agradecimientos.....	ix
Índice	1
1. Introducción.....	5
2. Fundamentos de la microscopía óptica convencional	13
2.1. Formación de imágenes a través de una lente simple	16
2.2. Formación de imágenes en un sistema afocal-telecéntrico.....	19
2.3. Resolución transversal y axial	25
2.4. Capacidad de seccionado óptico	31
2.5. Funciones de transferencia coherente e incoherente.....	32
2.6. Límites de la microscopía óptica convencional	39
3. Microscopia confocal de barrido	41
3.1. Formación de imágenes en un microscopio confocal	42
3.2. Influencia de la geometría del detector.....	45
3.3. Capacidad de seccionado óptico	48
3.4. Muestreo espacial del plano del detector	50
3.5. Imagen substractiva a partir de combinaciones de <i>pinholes</i> virtuales: mejora en resolución 3D.....	56

3.6. Generalización del método	61
4. Microscopía por iluminación estructurada	63
4.1. Generación de iluminación estructurada 2D.....	64
4.2. Respuesta del sistema al patrón estructurado.....	67
4.3. Descomposición de las componentes	69
4.4. Composición de la imagen sintética a partir de las componentes de Fourier de la iluminación estructurada	73
4.5. Generalización para cualquier ángulo del patrón.....	78
4.6. Software de reconstrucción.....	79
4.7. 2D-SIM de frecuencia variable y alta eficiencia luminosa	88
4.8. Extensión a iluminación estructurada 3D	99
5. Microscopía Holográfica Digital	103
5.1. Fundamentos de la holografía clásica.....	104
5.2. Fundamentos de la holografía digital.....	106
5.3. Holografía digital aplicada a la microscopía	114
5.4. Sistema afocal-telecéntrico en DHM.....	118
5.5. Optimización de los parámetros de captura.....	119
5.6. Aplicación de la optimización de parámetros a la medida cuantitativa de fase de muestras biológicas.....	136

6. Microscopía holográfica digital por iluminación estructurada	141
6.1. Iluminación estructurada aplicada a DHM	141
6.2. Reconstrucción en SI-DHM.....	145
6.3. Reconstrucción para un corrimiento de fase desconocido	149
6.4. SI-DHM empleando un biprisma de Fresnel	151
7. Conclusiones.....	159
ANEXO 1	165
ANEXO 2	167
ANEXO 3	175
Bibliografía.....	179

1. Introducción

Whenever I found out anything remarkable, I have thought it my duty to put down my discovery on paper, so that all ingenious people might be informed thereof.

Antonie van Leeuwenhoek (1770)

La microscopía óptica comenzó a esbozarse a principios del siglo XVII^{1,2}. Desde entonces se ha recorrido un largo camino para mejorar las prestaciones de los microscopios ópticos, los cuales representan una herramienta fundamental para diversos campos de la Ciencia, como son la Biología, la Medicina o la Bioquímica, y para cualquier otra rama que precise de la observación de detalles en muestras a escala micrométrica. Su evolución en las últimas dos décadas ha sido vertiginosa. Tanto es así que podríamos decir que la forma de entender la microscopía óptica ha cambiado radicalmente. Si bien en un principio los microscopios no eran más que una herramienta con la que observar muestras microscópicas con el ojo desnudo, hoy en día son sistemas mucho más complejos que incorporan ordenadores de última generación, medios de captura de alta sensibilidad, láseres, mecanismos motorizados y un largo etcétera de herramientas tecnológicas según cuál sea su aplicación. Detrás de este derroche de medios hay, ciertamente, más de un argumento.

Por un lado, la microscopía óptica convencional alcanzó el límite en resolución que predice la difracción por medio del empleo de sofisticados objetivos de microscopio, que consiguen la captura de la información espacial en el

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

espacio de la muestra con un ángulo de captura de prácticamente 70° en aire, esto es, aperturas numéricas (NA) de 0.9 (y mayores si existe un medio de inmersión). Existe la posibilidad de sobrepasar dicho límite o, mejor dicho, encontrar otro límite en resolución siempre que el microscopio que se emplee no pueda entenderse como un microscopio convencional.

Por otro lado, los microscopios convencionales carecen de capacidad de seccionado óptico ya que, cuando se tiene una muestra tridimensional, no sólo se obtiene la imagen de la zona enfocada dentro de la misma sino que se recibe luz de todos los planos que se encuentren fuera del plano de foco. Este efecto perturba la calidad de las imágenes bidimensionales obtenidas con el microscopio reduciendo notablemente el contraste y, además, impide la realización de imágenes tridimensionales a partir de la compilación de pilas de secciones ópticas obtenidas para distintos planos de foco. Nuevamente, es posible obtener la mencionada capacidad de seccionado óptico por medio del empleo de algunos microscopios ópticos no convencionales.

Además en los últimos años se han desarrollado una serie de técnicas alternativas a la microscopia convencional que son capaces de proporcionar información de fase de las muestras, esto es, información de las variaciones de índice de refracción en su interior o del espesor de las mismas. Como veremos, dicha información de fase puede ser relevante en el estudio y la caracterización de distintos tipos de muestras.

A pesar de que para alcanzar las prestaciones arriba mencionadas se debe aumentar la complejidad tecnológica con respecto a los microscopios convencionales, los beneficios que ello reporta justifica con creces dicha complejidad.

Resulta difícil atribuir el desarrollo de nuevas técnicas en microscopía óptica a un único hecho. Sin embargo, quizá resulte justo mencionar que la microscopía confocal de barrido láser (CLSM) (del inglés, *Confocal Laser Scanning Microscopy*) fue la primera técnica en mostrar una forma alternativa para la adquisición de imágenes en microscopía óptica. El principio de fun-

cionamiento de esta técnica es relativamente sencillo: en lugar de iluminar la muestra de manera uniforme, se proyecta sobre la misma el *spot* de iluminación producido por un objetivo de microscopio. La luz reflejada por la muestra es colectada a través del mismo objetivo y se proyecta sobre un estenope de dimensiones micrométricas al que llamaremos *pinhole* (de su traducción literal al inglés, cuyo uso es común en Óptica). La luz que atraviesa dicho *pinhole* se integra en una señal que se corresponde con un pixel de la imagen confocal. Para poder obtener una imagen bidimensional es necesario realizar un barrido transversal de la muestra de tal forma que las señales obtenidas para cada uno de los pasos del barrido se relacionen con un pixel de la imagen final. Además de mejorar ligeramente la resolución transversal con respecto a la microscopía convencional, la CLSM proporciona, gracias al empleo del *pinhole*, una característica que hasta su desarrollo era desconocida: la capacidad de seccionado óptico. De esta forma, es posible obtener “cortes” ópticos de muestras tridimensionales, eliminando la luz proveniente de planos de la muestra que están fuera foco y haciendo posible llevar a cabo una representación tridimensional de éstas. Aunque fuese propuesta hace más de 50 años^{3,4}, las primeras implementaciones prácticas se llevaron a cabo hace apenas 15 años⁵. En un principio, los microscopios confocales eran sistemas coherentes, es decir, iluminaban la muestra con luz coherente espacial y temporalmente que era directamente reflejada por el espécimen y colectada por un objetivo de microscopio. Más tarde, se demostró su funcionamiento para muestras fluorescentes, denominándose CSFM⁶ (del inglés, *Confocal Scanning Fluorescence Microscopy*). Una de las mayores desventajas en este caso es el blanqueo que sufre el tinte fluorescente debido a la fuerte focalización del haz sobre la muestra que afecta no sólo a la zona de foco si no a todas las partes que se encuentren dentro de los conos de luz producidos antes y después de dicha zona. Una forma de solucionar este problema, además de eliminar la necesidad del uso de un estenope, es la microscopía a dos fotones⁷ (2PEM, *Two-Photon Excitation Microscopy*). En este caso, la emisión de fluorescencia basada en la absorción por parte del medio de dos fotones y la emisión de

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

un único fotón es mucho menos probable que la absorción y emisión lineal. Por ello, la fluorescencia se produce exclusivamente en la zona donde hay mayor concentración energética, es decir, en la zona próxima al foco objeto del objetivo de microscopio. De esta manera la luz colectada proviene de dicha región, con lo cual no es necesario el empleo de un estenope y, además, el tinte fluorescente no se blanquea en planos anteriores o posteriores a dicha región.

Aproximadamente en la última década han surgido una serie de técnicas que suponen una notable mejora en resolución con respecto a la que proporciona el microscopio convencional. En cuanto a los microscopios de barrido, la técnica STED⁸ (*Stimulated Emission Depletion Microscopy*) se basa en el principio confocal, consiguiendo reducir el *spot* de iluminación por medio del agotamiento por saturación de la fluorescencia en un anillo que rodea el *spot* de iluminación. De esta forma, sólo se produce fluorescencia en el interior de dicha región anular y se reduce el tamaño efectivo de la región de emisión.

Por otro lado, gracias al desarrollo de los tintes fotoactivables de emisión intermitente (en la denominación anglosajona, *photoswitchable dyes*) se han desarrollado en paralelo dos técnicas, STORM⁹ (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) y PALM¹⁰ (*Photoactivated Localization Microscopy*), basadas en el mismo principio y con una sutil diferencia en cuanto a los tintes usados para marcar la muestra. En ambos casos, el principio de funcionamiento es el mismo: el marcador empleado garantiza que cuando se ilumine la muestra se excitarán moléculas del tinte fluorescente que, con una alta probabilidad, estarán separadas una distancia mayor al tamaño del *spot* de difracción generado por cada una de ellas. Esto se debe a que la probabilidad de excitación es realmente baja y, además, una vez excitadas dichas moléculas o bien se blanquean o bien decaen al estado fundamental rápidamente. Teóricamente es posible demostrar que la precisión en la localización de cada una de las moléculas emisoras en el espacio objeto es en realidad mucho menor al *spot* de difracción emitido (siempre que no se tenga la emisión simultánea de

dos moléculas separadas una distancia menor a la capacidad resolutive del objetivo de microscopio). Para realizar una imagen se requiere de un gran número de capturas ya que por cada captura se localiza la posición de un pequeño número de moléculas.

Otra de las técnicas modernas en microscopía capaz de mejorar la resolución proporcionada por los objetivos de microscopio empleados y que, además, ofrece la posibilidad de obtener seccionado óptico es la conocida como microscopía por iluminación estructurada (SIM)¹¹ (de la denominación anglosajona, *Structured Illumination Microscopy*). En este caso, la muestra se ilumina con un patrón periódico unidimensional en la dirección transversal que, como veremos en el Capítulo 4, permite recuperar frecuencias espaciales de la muestra que no son transmitidas a través de un sistema convencional¹¹. Dicha información aparece mezclada y para poder recuperarla es necesario realizar la captura sucesiva de imágenes desplazando el patrón de iluminación. Aplicando algoritmos de reconstrucción y técnicas de procesado de imágenes, la técnica SIM es capaz de doblar la resolución proporcionada por el objetivo de microscopio cuando éste se emplea bajo iluminación uniforme. Existe a su vez la posibilidad de dotar al microscopio con capacidad de seccionado óptico.

Las distintas técnicas que hemos mencionado hasta ahora requieren tinter las muestras bien con un colorante o con un tinte fluorescente. Sin embargo, debido a su espesor y composición, la mayoría de las muestras biológicas sin tinter se pueden considerar en primera aproximación objetos puros de fase. En muchas ocasiones existe la necesidad de estudiar dichas muestras con la menor perturbación posible, es decir, sin introducir agentes externos en las mismas, o bien de obtener información no proporcionada por las técnicas de microscopía óptica que precisan el tinte de las muestras. Bajo este razonamiento surgieron una serie de técnicas, denominadas técnicas de contraste de fase, que obtienen información cualitativa de las diferencias de índice de refracción en el interior de las muestras o de su espesor. Todas ellas se basan en transfe-

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

rir la información de variaciones del camino óptico en el interior de las muestras en variaciones de la distribución de intensidades en el plano imagen. Dentro de estas técnicas, quizá la más popular actualmente sea la conocida como DIC (del inglés, *Differential Interference Contrast*)¹². En este caso se obtiene una distribución de intensidades que es proporcional a la derivada de la fase en una dirección determinada, es decir, lo que se obtiene es una imagen de gradiente de fase. Este tipo de imágenes es útil para la visualización de muestras no tintadas o de detalles de la muestra que no son visibles en presencia de un tinte, pero la información cuantitativa de las variaciones de fase en el interior de la muestra no es accesible de un modo directo. Por ello, una alternativa a este tipo de técnicas es la conocida como microscopía holográfica digital (DHM)¹³ (del término anglosajón, *Digital Holographic Microscopy*), que desarrollaremos en el Capítulo 5. Como veremos, a partir de los principios de la holografía en conjunción con métodos de procesado de digital de imágenes, esta técnica permite recuperar la información de la distribución del frente de onda complejo difractado por un cierto objeto, esto es, su amplitud y su fase, mediante una sola toma. Con ello se consigue tener acceso no sólo a la medida cuantitativa de las variaciones de fase en el objeto sino que también es posible realizar un reenfoque numérico *a posteriori* por medio del empleo de algoritmos de propagación numérica. Por ello la DHM se presenta como una técnica dentro de la microscopía óptica realmente útil para la inspección y caracterización de muestras, especialmente en el caso de que no se quiera emplear un tinte para la observación de éstas.

Los objetivos de esta Memoria son múltiples. En primer lugar, se pretende aunar en un mismo marco teórico distintas técnicas pertenecientes a la microscopía óptica no convencional, en concreto, CLSM, SIM y DHM. Asimismo se mostrarán algunas de las limitaciones prácticas de las mismas. Para cada una de estas técnicas se presentarán propuestas de implementaciones alternativas así como las ventajas que representa el empleo de estos nuevos sistemas.

Para llevar a cabo los objetivos arriba señalados, se comenzará tratando desde un punto de vista teórico la microscopía convencional en el Capítulo 2. Con ello, no sólo se presentará el tipo de cálculos que se requieren para la comprensión de las distintas técnicas de microscopía aquí recogidas, sino que también se podrán entender las limitaciones de la microscopía convencional de una manera estricta. En el Capítulo 3 se hará, en primer lugar, una introducción teórica acerca de la microscopía confocal de barrido. En éste realizaremos una propuesta de un sistema de adquisición de imágenes confocales alternativo que, además, permitirá mejorar la calidad de las imágenes obtenidas. En el Capítulo 4 introduciremos la técnica SIM de manera rigurosa, presentando los cálculos necesarios para la obtención de imágenes mediante este tipo de sistema. En este capítulo, distinguiremos entre los distintos sistemas que se pueden implementar y propondremos un novedoso sistema para generar iluminación estructurada en el que la frecuencia del patrón de iluminación se pueda variar de una manera muy sencilla. Además, propondremos un algoritmo de reconstrucción alternativo para la obtención de imágenes. En el Capítulo 5 nos centraremos en la microscopía holográfica digital. Para llegar a entender el funcionamiento de este tipo de técnica, haremos una pequeña introducción teórica sobre holografía clásica y holografía digital. Esto nos permitirá entender las limitaciones de la técnica, a partir de lo cual realizaremos tanto una propuesta para mejorar sus prestaciones como un desarrollo teórico con el fin de optimizar los parámetros de captura. Por último, en el Capítulo 6, aunaremos las técnicas SIM y DHM en lo que llamaremos microscopía holográfica digital por iluminación estructurada (SI-DHM) en una propuesta novedosa para mejorar la resolución de un DHM convencional. Asimismo, presentaremos un algoritmo mediante el cual se facilita la implementación práctica de esta técnica.

2. Fundamentos de la microscopía óptica convencional

Since the invention of lasers, great change has taken place in optical microscopy. Modern optical microscopy has become a multi-dimensional technology; it can provide not only high-resolution spatial information of a sample under inspection but also temporal, spectral and other physical properties¹⁴.

Min Gu, Advanced optical imaging theory. (2000)

La microscopía óptica convencional, como hemos comentado en la Introducción, posee una serie de limitaciones físicas que afectan a la calidad de las imágenes que se obtienen mediante la misma. Aun así, sigue siendo una herramienta muy útil y de fácil empleo para la inspección de muestras, ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Además, para poder comprender la base de las ya mencionadas limitaciones físicas, así como los principios físicos de las técnicas modernas derivadas de la microscopía óptica convencional, resulta necesario presentar los fundamentos teóricos de ésta técnica es sus distintas variantes.

Cabe distinguir entre las distintas modalidades que pueden presentarse¹⁵:

- *Microscopía convencional de campo claro*: Típicamente, una muestra tintada se ilumina por transmisión mediante una fuente de luz blanca. La luz transmitida a través de la muestra es recogida por un objetivo de microscopio que realiza la imagen de la misma.

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

- *Microscopía convencional por fluorescencia (a un fotón)*: Una muestra tintada con un tinte fluorescente se ilumina por medio de un objetivo de microscopio con luz monocromática. Dicha luz excita los fluoróforos incluidos en la muestra, que emiten una cierta distribución de irradiancia incoherente en una longitud de onda mayor a la de excitación. La luz emitida por la muestra se colecta empleando el mismo objetivo de microscopio, que realiza la imagen de ésta.

Ambas modalidades son sistemas puramente incoherentes, ya sea por el empleo de una fuente extensa, como es el caso de la microscopía de campo claro, o porque la respuesta de la muestra a la excitación es incoherente espacialmente, es decir, cada punto de la muestra emite luz de manera independiente al resto de puntos como ocurre en la microscopía por fluorescencia. Un ejemplo de imágenes obtenidas con estas técnicas se muestran en la Fig. 1. Cabe mencionar que en el desarrollo de esta tesis también tendremos en cuenta el caso puramente coherente, esto es, el caso en que la muestra se ilumina de manera coherente y se recoge la luz transmitida o reflejada por la misma.

Dentro de este marco, consideraremos que un microscopio óptico puede denominarse convencional siempre que cumpla las siguientes tres condiciones¹⁶:

- i) La observación tiene lugar en la geometría convencional en la que la luz es colectada a través de un único objetivo de microscopio.
- ii) La iluminación es uniforme en toda la muestra.
- iii) La fluorescencia ocurre de manera lineal por medio de la absorción y emisión de un único fotón.

Como veremos, bajo estas tres imposiciones, existe un límite teórico para la resolución tridimensional alcanzable, que se puede calcular a partir de la Teoría de la Difracción teniendo en cuenta la apertura numérica finita del objetivo del microscopio. Debemos hacer notar que la calidad de las imágenes obtenidas mediante los sistemas formadores de imágenes no está exclusivamente

limitada por dicha apertura. De hecho, en el caso de la presencia de aberraciones tales como la aberración esférica^{17,18}, el *spot* de difracción se ve claramente distorsionado, impidiendo alcanzar el límite teórico predicho por la difracción para un sistema ideal. A su vez, existen otras características que afectan al contraste de las imágenes bidimensionales obtenidas tales como la profundidad de foco del objetivo de microscopio¹⁹ y su capacidad de seccionado óptico⁵.

En la práctica existen dos tipos de objetivos de microscopio: los corregidos a distancia finita y los corregidos al infinito. Los primeros se pueden considerar como una única lente compuesta en configuración telecéntrica (en el espacio objeto), es decir, cuyo diafragma de apertura se encuentra en su plano focal imagen. Este tipo de objetivos de microscopio están diseñados para colocar el objeto en un plano situado a una cierta distancia, conocida como *distancia de trabajo*, y formar la imagen de éste en el espacio imagen a la *distancia de tubo*. Ambas distancias son proporcionadas por el fabricante, siendo la primera considerablemente menor a la segunda (dependiendo del aumento del objetivo en cuestión).

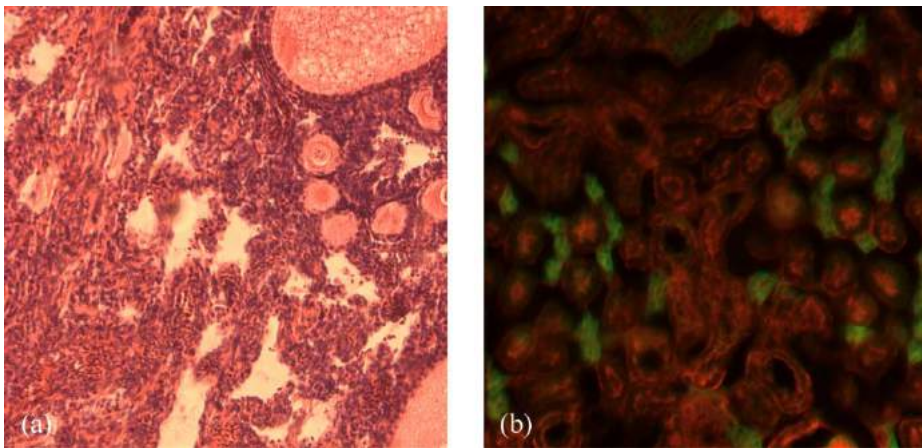


Fig. 1 (a) Imagen de campo claro de un ovario de ave tomada (10 \times , NA=0.45)(b) Imagen por fluorescencia de células de riñón de muntjac (50 \times , NA=0.55).

Los objetivos corregidos al infinito son igualmente telecéntricos, pero están diseñados para colocar la muestra en su plano focal objeto de tal forma que su imagen se forma en el infinito. Por tanto, para poder realizar la imagen se precisa de una segunda lente, conocida como lente de tubo, cuya distancia focal depende de las especificaciones del fabricante.

2.1. Formación de imágenes a través de una lente simple

Comenzaremos este capítulo estudiando un caso sencillo como ejemplo del tipo de cálculos que realizaremos a lo largo de toda la Memoria. Se trata de la formación de imágenes a través de una lente simple. Tendremos en cuenta este resultado cuando empleemos un objetivo de microscopio corregido a distancia finita. Consideremos un cierto objeto bidimensional de transmitancia o reflectancia en amplitud $o(\mathbf{x})$, siendo $\mathbf{x}=(x,y)$ las coordenadas espaciales en un plano transversal al eje óptico, iluminado por una onda plana de luz monocromática de longitud de onda λ . Los cálculos los realizaremos teniendo en cuenta la aproximación escalar paraxial del campo electromagnético, esto es, ignoraremos el carácter vectorial de las distribuciones de amplitud de los campos y consideraremos que la propagación de éstos sucede para ángulos relativamente pequeños con respecto al eje óptico. De esta forma, la propagación en el espacio libre de una distribución de amplitudes compleja del campo $U(\mathbf{x})$ a una cierta distancia z será considerada mediante el operador²⁰

$$W\{U(\mathbf{x})\} \equiv U(\mathbf{x}) \otimes_2 \frac{\exp[ikz]}{i\lambda z} \exp\left[\frac{ik}{2z}|\mathbf{x}|^2\right], \quad (2.1)$$

siendo \otimes_2 la operación de convolución bidimensional y $k = 2\pi/\lambda$ el número de onda de la radiación. La acción de una lente de focal f sobre la distribución de amplitudes compleja del campo, esto es, su transmitancia en amplitud, se tendrá en cuenta mediante el factor multiplicativo $\exp[-ik/2f|\mathbf{x}|^2]$ y su tamaño finito se considerará a través de la función apertura de salida de la lente, $p(\mathbf{x})$.

Consideramos, pues, un sistema formador de imágenes compuesto por una única lente. Es fácil ver que aplicando el propagador en el espacio libre, teniendo en cuenta el tamaño finito de la lente y su transmitancia en amplitud, en un plano posterior a la lente la distribución compleja de amplitudes del campo puede expresarse como

$$\begin{aligned}
 U(\mathbf{x}') = & \exp\left[\frac{ik(d_1+d_2)}{\lambda^2 d_1 d_2}\right] \times \\
 & \times \left\{ o(\mathbf{x}') \otimes_2 \exp\left[\frac{ik}{2d_1}|\mathbf{x}'|^2\right] \right\} p(\mathbf{x}') \exp\left[-\frac{ik}{2f}|\mathbf{x}'|^2\right] \otimes_2 \exp\left[\frac{ik}{2d_2}|\mathbf{x}'|^2\right],
 \end{aligned} \tag{2.2}$$

siendo d_1 y d_2 la distancia del objeto a la lente y de la lente al plano de observación, respectivamente. Si asumimos que los planos objeto e imagen se encuentran conjugados, se cumplirá la ecuación de conjugación de Gauss de la Óptica Geométrica²¹, es decir

$$\frac{1}{d_1} + \frac{1}{d_2} = \frac{1}{f}, \tag{2.3}$$

y el aumento lateral del sistema vendrá dado por $M = -d_2/d_1$. Omitiendo factores constantes irrelevantes, reescribiendo la Ec.(2.2) en términos de d_1 y expresando los productos de convolución en forma integral se llega a

$$\begin{aligned}
 U(\mathbf{x}') = & \frac{M}{\lambda^2 d_1^2} \exp[ikL] \exp\left[\frac{ikM}{2d_1}|\mathbf{x}'|^2\right] \times \\
 & \times \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} d^2\mathbf{x}_0 d^2\mathbf{x}_p p(\mathbf{x}_p) o(\mathbf{x}_0) \exp\left[\frac{ik}{2d_1}|\mathbf{x}_0|^2\right] \exp\left[\frac{i2\pi}{\lambda d_1} \mathbf{x}_p \cdot (\mathbf{x}_0 + M \mathbf{x}')\right],
 \end{aligned} \tag{2.4}$$

donde $L=d_1-d_1/M$. En la ecuación anterior es posible identificar la transformada de Fourier 2D en las coordenadas de la pupila \mathbf{x}_p , por lo que podemos reescribirla en la forma

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

$$U(\mathbf{x}') = \frac{M}{\lambda^2 d_1^2} \exp[ikL] \exp\left[\frac{ikM}{2d_1} |\mathbf{x}'|^2\right] \int \int_{-\infty}^{\infty} d^2\mathbf{x}_0 o(\mathbf{x}_0) \exp\left[\frac{ik}{2d_1} |\mathbf{x}_0|^2\right] h(\mathbf{x}_0 + M \mathbf{x}'), \quad (2.5)$$

donde

$$h(\mathbf{x}) = \tilde{p}\left(\frac{\mathbf{x}}{\lambda d_1}\right), \quad (2.6)$$

no es más que la transformada de Fourier 2D de la función pupila apropiadamente escalada. Identificando el producto de convolución en la Ec.(2.5) tenemos que

$$U(\mathbf{x}') = \frac{M}{\lambda^2 d_1^2} \exp[ikL] \exp\left[\frac{ikM}{2d_1} |\mathbf{x}'|^2\right] \left\{ o\left(\frac{\mathbf{x}'}{M}\right) \exp\left[\frac{ik}{2d_1 M^2} |\mathbf{x}'|^2\right] \right\} \otimes_2 h(\mathbf{x}'). \quad (2.7)$$

En la ecuación anterior vemos que la distribución compleja de amplitud posee un factor de fase cuadrático añadido tanto fuera de la convolución como en el interior del término que representa la imagen geométrica de la distribución compleja de amplitudes objeto. Si bien normalmente realizamos la captura de la distribución de intensidades, es decir, del módulo al cuadrado de la Ec.(2.7) en cuyo caso dichos factores desaparecen, éstos pueden tener un efecto indeseado en sistemas capaces de obtener la información de fase de la distribución compleja de amplitudes objeto. Además, si propagamos el campo a otras distancias el aumento lateral cambiará según la Ec.(2.3), produciendo un espacio imagen que no presenta la misma distribución tridimensional que el espacio objeto. De hecho, se produce una distorsión tal que el aumento es mayor conforme nos alejamos del plano imagen. Esto hace que este tipo de sistemas basado en una única lente objetivo no pueda considerarse como un sistema formador de imágenes 3D en sentido estricto.

2.2. Formación de imágenes en un sistema afocal-telecéntrico

Consideremos ahora el caso en el que se emplea un objetivo corregido al infinito en conjunción con una lente de tubo dispuestos en configuración afocal-telecéntrica, tal como muestra la Fig. 2. Un punto emisor cualquiera situado en las coordenadas espaciales (\mathbf{x}_0, z_0) dará lugar a una cierta distribución compleja de amplitudes en el espacio imagen. Para calcular dicha distribución de amplitudes, en primer lugar propagamos el campo desde el punto emisor al plano focal objeto del objetivo de microscopio, esto es

$$U(\mathbf{x}, z = 0) = \frac{\exp[ikz_0]}{i\lambda z_0} \exp\left[\frac{ik}{2z_0}|\mathbf{x} - \mathbf{x}_0|^2\right], \quad (2.8)$$

donde z_0 y z son las distancias orientadas[†] del foco objeto del microscopio al plano transversal que contiene al punto fuente y del foco objeto al plano de observación en el espacio objeto, respectivamente. La relación entre las distribuciones complejas de amplitud del plano focal objeto y del plano focal imagen para una lente delgada viene dada por la transformada de Fourier 2D de la primera con los correspondientes factores de escala²⁰. Además, para este tipo de sistema el plano focal imagen del objetivo de microscopio es a su vez el plano en el que se encuentra la pupila física (diafragma de apertura) del sistema formador de imágenes. Teniendo esto en cuenta, la distribución compleja de amplitudes en dicho plano viene dada por

$$U_p(\mathbf{x}_p) = \frac{\exp[i2kf_1]}{i\lambda f_1} \tilde{U}\left(\frac{\mathbf{x}_p}{\lambda f_1}, z = 0\right) p(\mathbf{x}_p), \quad (2.9)$$

donde f_1 es la distancia focal del objetivo de microscopio, siendo $p(\mathbf{x})$ la transmitancia en amplitud de la pupila del mismo, a la que llamaremos genéricamente *función pupila*. Haciendo uso nuevamente de la relación entre la amplitud del campo en los planos focales de la lente de tubo, calculamos la

[†] Es decir, si el punto emisor se encuentra en un plano anterior al plano focal objeto del objetivo de microscopio será positiva mientras que si está localizado un plano posterior tomará un valor negativo.

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

distribución compleja de amplitudes en el plano focal imagen de dicha lente, dada por

$$U'(\mathbf{x}') = \frac{\exp[i2kf_2]}{i\lambda f_2} \tilde{U}_p \left(-\frac{f_2}{f_1} \mathbf{x}', z' = 0 \right). \quad (2.10)$$

siendo z' la distancia orientada del foco imagen de la lente de tubo al plano de observación en el espacio imagen. Escribiendo de manera explícita la transformada de Fourier 2D e identificando el factor de aumento lateral del sistema telecéntrico $M = -f_2/f_1$, la Ec.(2.10) puede escribirse en la forma

$$U'(\mathbf{x}') = \frac{\exp[i2kL]}{M} U \left(\frac{\mathbf{x}'}{M}, 0 \right) \otimes_2 \tilde{p} \left(\frac{\mathbf{x}'}{\lambda f_2} \right), \quad (2.11)$$

siendo $L=f_1+f_2$. Como era de esperar, el sistema tiene la capacidad de formar imágenes bidimensionales (al igual que un sistema de una única lente). En este caso el aumento lateral en el plano imagen depende exclusivamente de la relación entre las focales del objetivo y la lente de tubo. El empleo de sistemas afocales-telecéntricos en microscopía se justifica cuando consideramos la formación de imágenes de estructuras tridimensionales. Si sustituimos la Ec.(2.8) dentro de la Ec.(2.11) obtenemos cómo se comporta el sistema cuando se considera la formación de imágenes tridimensional, es decir, la respuesta a un punto emisor localizado en cualquier punto del espacio, dada por

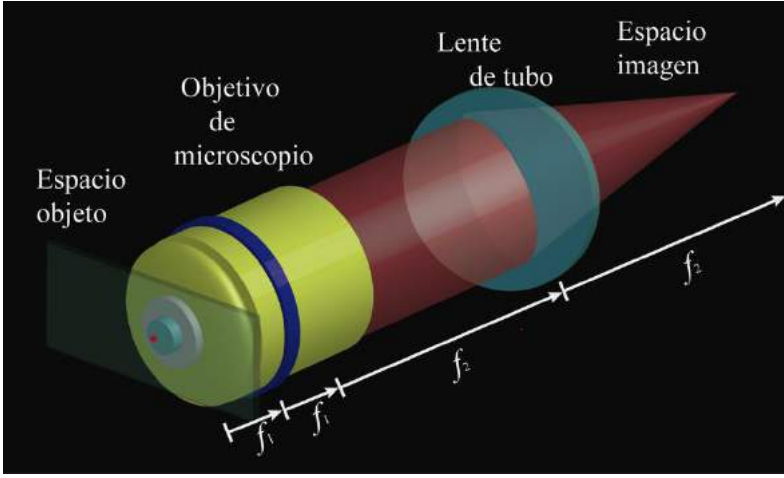


Fig. 2 Esquema de un sistema afocal-telecéntrico en el que se representa la conjugación de un punto en el foco objeto del objetivo de microscopio y un punto en el foco imagen de la lente de tubo.

$$U'(\mathbf{x}', z' = 0) = \frac{\exp\left[ik(2L + M^2 z_0)\right]}{i\lambda M z_0} \tilde{p}\left(\frac{\mathbf{x}'}{\lambda f_2}\right) \otimes_2 \exp\left[\frac{ik}{2M^2 z_0} |\mathbf{x}' - \mathbf{x}'_0|^2\right]. \quad (2.12)$$

Identificando la relación de aumentos en la coordenada axial para el sistema afocal-telecéntrico como $z_0' = -M^2 z_0$, la distribución compleja de amplitudes en el plano focal imagen de la lente de tubo se puede escribir como

$$U'(\mathbf{x}', z' = 0) = -\frac{M \exp\left[ik(2L - z_0')\right]}{i\lambda z_0'} \tilde{p}\left(\frac{\mathbf{x}'}{\lambda f_2}\right) \otimes_2 \exp\left[-\frac{ik}{2z_0'} |\mathbf{x}' - \mathbf{x}'_0|^2\right]. \quad (2.13)$$

Nótese que el signo de las coordenadas axiales en el espacio imagen cambia con respecto al espacio objeto. Esto debe ser así para mantener la consistencia matemática entre los sistemas de coordenadas del espacio imagen y del espacio objeto, ya que las coordenadas transversales cambian su signo. Es fácil de entender pues, que si se tiene una onda esférica divergente en el plano focal objeto ésta converja en el plano focal imagen y viceversa.

Consideremos ahora la distribución de amplitudes compleja del campo ge-

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

nerado por el punto emisor en un plano transversal cualquiera del espacio imagen. Para estudiar este caso no tenemos más que emplear el propagador en el espacio libre de la Ec.(2.1). Así, después de algunas operaciones matemáticas, puede obtenerse que la distribución compleja de amplitudes en cualquier plano del espacio imagen viene dada por

$$U'(\mathbf{x}', z') = \tilde{p}\left(\frac{\mathbf{x}'}{\lambda f_2}\right) \otimes_2 \frac{\exp[ik(z' - z'_0)]}{z' - z'_0} \exp\left[-\frac{ik}{2(z' - z'_0)}|\mathbf{x}' - \mathbf{x}'_0|^2\right], \quad (2.14)$$

donde hemos omitido factores constantes sin relevancia. Es fácil ver que esta distribución compleja de amplitudes no es más que la convolución tridimensional entre dos funciones: una delta de Dirac en el espacio imagen, cuya posición está relacionada con la del punto emisor mediante las leyes de la Óptica Geométrica, y una función que tiene en cuenta las propiedades difractivas de los elementos que forman el sistema óptico, esto es

$$U'(\mathbf{x}', z') = \delta(\mathbf{x}' - \mathbf{x}'_0, z' - z'_0) \otimes_3 \left\{ \tilde{p}\left(\frac{\mathbf{x}'}{\lambda f_2}\right) \otimes_2 \frac{\exp[ikz']}{z'} \exp\left[-\frac{ik}{2z'}|\mathbf{x}'|^2\right] \right\}. \quad (2.15)$$

De esta forma, es fácil identificar la respuesta impulsional en amplitudes 3D del sistema o APSF3D (del inglés, 3D *Amplitude Point Spread Function*)

$$h'(\mathbf{x}', z') = \tilde{p}\left(\frac{\mathbf{x}'}{\lambda f_2}\right) \otimes_2 \frac{\exp[ikz']}{z'} \exp\left[-\frac{ik}{2z'}|\mathbf{x}'|^2\right]. \quad (2.16)$$

Podemos ver que los sistemas afocales-telecéntricos preservan la estructura tridimensional del espacio objeto. A partir de ahora, a no ser que lo especifiquemos, supondremos siempre que los microscopios están compuestos por un objetivo de microscopio y una lente de tubo dispuestos en dicha configuración.

Formación de imágenes coherente

Cuando se considera el caso en el cual se ilumina un objeto de transmitancia (o reflectancia) en amplitud $o(\mathbf{x}, z)$ de manera coherente y la luz transmiti-

da (o reflejada) se recoge mediante un sistema afocal-telecéntrico, en el espacio imagen se tiene la superposición coherente de cada uno de los puntos del objeto ya que estos pueden ser considerados como emisores secundarios del frente de onda según el principio de Huygens²⁰. Es directo ver, por tanto, que la distribución compleja de amplitudes generada en el espacio imagen viene dada por

$$o'(\mathbf{x}', z') = \int \int_{-\infty}^{\infty} d^2\mathbf{x}_0 dz_0 o(\mathbf{x}_0, z_0) h(\mathbf{x}' - M \mathbf{x}_0, z' - M^2 z_0). \quad (2.17)$$

Identificando la operación de convolución en su forma integral y escribiendo ésta en función de las coordenadas en el espacio imagen la ecuación anterior se obtiene

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

Por tanto, el sistema es lineal e invariante a desplazamientos tridimensionales (LSI-3D, del inglés 3D *Linear and Shift Invariant*) ya que la distribución de amplitudes compleja en el espacio imagen puede expresarse como la distribución compleja de amplitudes en el espacio objeto apropiadamente escalada y convolucionada por una cierta función, en este caso, la APSF3D.

Si situamos un detector bidimensional en el plano imagen, idealmente infinito y continuo, capturaremos la distribución de intensidades del campo, es decir

$$I'(\mathbf{x}', z' = 0) = \left| \left\{ \frac{1}{M^2} o\left(\frac{\mathbf{x}'}{M}, \frac{z'}{M^2}\right) \otimes_3 h(\mathbf{x}', z') \right\}_{z'=0} \right|^2. \quad (2.19)$$

De la ecuación anterior se concluye que los sistemas afocales-telecéntricos son sistemas formadores de imágenes en sentido estricto, es decir, que reproducen la distribución tridimensional de la distribución de intensidades objeto en el espacio imagen, con un cierto factor de escala, estando ésta distorsionada por el efecto de la difracción tenido en cuenta por medio de la APSF-3D

del sistema.

Formación de imágenes incoherente

A continuación tendremos en cuenta la formación de imágenes incoherente a través de un sistema afocal-telecéntrico. Por ejemplo, consideraremos que el objeto ha sido tintado con un tinte fluorescente. Dicho tinte es excitado mediante la iluminación coherente con una cierta longitud de onda produciendo una emisión en una longitud de onda mayor con una distribución espacial de irradiancia $O(\mathbf{x}, z)$, que no es más que la distribución de los fluoroforos en el interior de la muestra. Nótese que la respuesta a la excitación, considerando la aproximación de Born a primer orden²¹ es incoherente espacialmente ya que cada punto emisor situado en el interior de la muestra es independiente del resto. Bajo esta aproximación, la distribución de irradiancia en el espacio imagen viene dada por la superposición incoherente de la distribución de intensidades generada por cada uno de los puntos emisores en el interior del objeto. La respuesta en intensidades a un único punto emisor en el espacio objeto no es más que el módulo cuadrado de la Ec.(2.15) , es decir

$$I'(\mathbf{x}', z') = \left| \delta(\mathbf{x}' - \mathbf{x}'_0, z' - z'_0) \otimes_3 \left\{ \tilde{p}\left(\frac{\mathbf{x}'}{M}, \frac{z'}{M^2}\right) \otimes_2 \frac{\exp[ikz']}{z'} \exp\left[-\frac{ik}{2z'}|\mathbf{x}'|\right] \right\} \right|^2. \quad (2.20)$$

Teniendo en cuenta ahora la emisión producida por la distribución de fluoroforos e identificando la APSF3D nos queda

$$I'_{inc}(\mathbf{x}', z') = \int \int_{-\infty}^{\infty} d^2\mathbf{x}_0 dz_0 O(\mathbf{x}_0, z_0) \left| h(\mathbf{x}' - M\mathbf{x}_0, z' - M^2z_0) \right|^2, \quad (2.21)$$

y, por tanto,

$$I'_{inc}(\mathbf{x}', z') = \frac{1}{M^2} O\left(\frac{\mathbf{x}'}{M}, \frac{z'}{M^2}\right) \otimes_3 h_{inc}(\mathbf{x}', z'), \quad (2.22)$$

donde $h_{inc}(\mathbf{x}', z') = |h(\mathbf{x}', z')|^2$ es la respuesta impulsional 3D del sistema afocal-telecéntrico cuando la respuesta de la muestra es incoherente. A esta función la llamaremos genéricamente respuesta impulsional en irradiancia 3D del

sistema o PSF3D (de la denominación anglosajona, *3D Point Spread Function*). Nuevamente, el sistema es LSI 3D. Cuando se coloca un detector en el plano focal imagen del sistema tenemos que

$$I'_{inc}(\mathbf{x}', z' = 0) = \frac{1}{M^2} \left\{ O\left(\frac{\mathbf{x}'}{M}, \frac{z'}{M^2}\right) \otimes_3 h_{inc}(\mathbf{x}', z') \right\}_{z=0}. \quad (2.23)$$

Como vemos, en el caso de la formación de imágenes incoherente la distribución de intensidades 3D de los fluoroforos objeto se reproduce fielmente en el espacio imagen, teniendo en cuenta el factor de escala predicho por la Óptica Geométrica. En este caso, el efecto de la difracción se tiene en cuenta por medio de la convolución de cada punto de la distribución de intensidades objeto con la PSF3D del sistema.

A pesar de que la diferencia entre la formación de imágenes coherente e incoherente parece sutil, como veremos, tiene importantes implicaciones cuando se comparan la resolución y las características de las imágenes proporcionadas para ambos sistemas.

2.3. Resolución transversal y axial

En este apartado estudiaremos la resolución transversal para los casos coherente e incoherente, partiendo de los resultados obtenidos en el apartado anterior. Antes de entrar en detalle debemos hacer notar una importante diferencia entre ambos sistemas. Comparando las Ecs.(2.18) -(2.23) podemos relacionar las distribuciones objeto (en el caso ideal en el que tuvieran estrictamente la misma composición) de la forma

$$O(\mathbf{x}, z) = K |o(\mathbf{x}, z)|^2, \quad (2.24)$$

siendo K una constante que relaciona la transmitancia en amplitudes objeto con la intensidad de emisión de los fluoroforos en el interior del objeto. Esta relación implica que, como habíamos supuesto, para el caso coherente cualquier punto situado en el espacio objeto afecta al resto de puntos. Esto puede entenderse ya que $o(\mathbf{x}, z)$ es en general una función compleja que puede ex-

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

presarse como

$$o(\mathbf{x}, z) = |o(\mathbf{x}, z)| \exp[i\phi(\mathbf{x}, z)], \quad (2.25)$$

donde es $\phi(\mathbf{x}, z)$ la fase acumulada por la distribución de amplitudes compleja del campo al atravesar la muestra. Como resultado la formación de imágenes coherente posee intrínsecamente un ruido característico que no es más que la interferencia (o los patrones de difracción) de los emisores secundarios del frente de onda de una distribución tridimensional. Sin embargo, en la formación de imágenes incoherente la emisión de cada punto es independiente del resto, o lo que es lo mismo, no se conserva información de las fases relativas entre distintos emisores proporcionando una imagen que carece del posible ruido debido a la fuente de iluminación. La comparación entre imágenes por transmisión proporcionadas para ambos casos empleando como muestra un ala de mosca común y un objetivo $4\times$ de apertura numérica 0.25 puede verse en la Fig. 3.

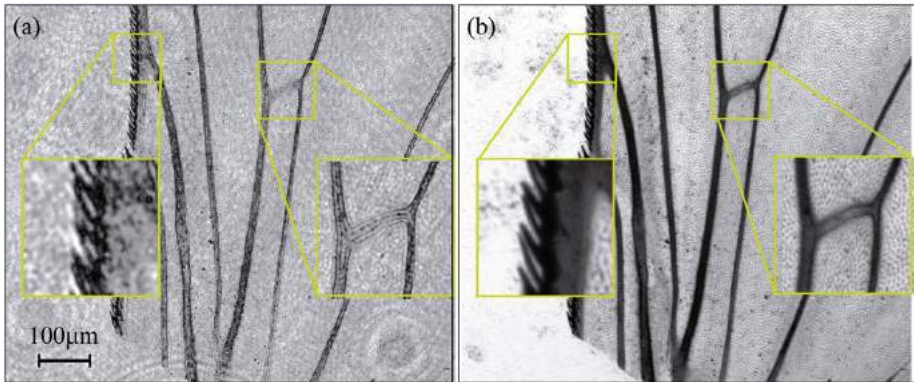


Fig. 3 Imagen por transmisión de un ala de mosca empleando un objetivo $4\times$ y apertura numérica 0.25 para: (a) iluminación coherente obtenida a partir de un láser He-Ne ($\lambda=632.8$ nm) y; (b) iluminación incoherente por medio de un LED ($\lambda=634\pm 14$ nm).

Teniendo en cuenta la importante diferencia entre formación de imágenes

coherente e incoherente destacada en el párrafo anterior, pasemos a estudiar la resolución transversal en ambos casos. Cabe destacar que la definición de resolución a partir de la distribución de intensidades detectada en el plano imagen del sistema formador de imágenes puede resultar algo ambigua. De hecho, para poder llevarla a cabo es necesario establecer un criterio. Típicamente, se emplea el criterio de Rayleigh²¹ en la definición de resolución de un sistema óptico a partir de la distribución de intensidades en el plano imagen:

“Dos fuentes puntuales pueden considerarse como resueltas por el sistema formador de imágenes cuando el máximo principal del *spot* de difracción en la imagen de uno de ellos coincide con el mínimo del *spot* de difracción generado por el otro. Si la distancia es mayor, ambos puntos seguirán estando resueltos mientras que si es menor no se podrá distinguir uno del otro y, por tanto, no lo estarán.”

Bajo este criterio estamos considerando que ambos puntos producen exactamente la misma distribución de intensidad en el plano imagen lo cual estrictamente no tiene por qué producirse en la formación de imágenes 3D. Sin embargo, es un buen punto de partida para poder entender las limitaciones físicas de los sistemas formadores de imágenes desde el punto de vista de su capacidad resolutive.

Para evaluar la resolución transversal a partir de la distribución de intensidades detectada en el plano imagen debemos calcular la APSF2D. Considerando que el sistema posee una pupila circular y con el fin de obtener unas expresiones que no dependan de los parámetros del sistema óptico pero que podamos relacionarlas con éste de manera sencilla, definimos las coordenadas ópticas normalizadas¹⁴

$$\bar{x} = \frac{r_m}{\lambda f} \mathbf{x} \quad \bar{z} = \frac{r_m^2}{\lambda f^2} z, \quad (2.26)$$

siendo r_m y f el radio de la pupila del objetivo de microscopio y su focal imagen, respectivamente. De esta forma, la Ec.(2.16) puede expresarse como

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

$$h(\bar{\mathbf{x}}, \bar{z}) = i\lambda r_m^2 e^{i2\pi\bar{z}\bar{\omega}_0} \int_{-1}^1 d^2\bar{\mathbf{x}}_p p(\bar{\mathbf{x}}_p) \exp\left[-i\pi\bar{z}|\bar{\mathbf{x}}_p|^2\right] \exp\left[-i2\pi\bar{\mathbf{x}}_p \cdot \bar{\mathbf{x}}\right], \quad (2.27)$$

donde es fácil ver que las coordenadas ópticas normalizadas en el plano de la pupila se relacionan con las coordenadas reales en la forma $\bar{\mathbf{x}}_p = \mathbf{x}_p/r_m$, y que $\bar{\omega}_0 = (f/r_m)^2$. Si realizamos el cambio a coordenadas cilíndricas, es decir,

$$\begin{aligned} \bar{r}_p^2 &= |\bar{\mathbf{x}}_p|^2, \\ \bar{x}_p &= \bar{r}_p \cos \theta, \\ \bar{y}_p &= \bar{r}_p \sin \theta, \end{aligned} \quad (2.28)$$

la Ec.(2.27) queda como

$$h(\bar{r}, \bar{z}) = i\lambda r_m^2 e^{i2\pi\bar{z}\bar{\omega}_0} \int_0^1 \int_0^{2\pi} d\theta d\bar{r}_p \bar{r}_p \exp\left[-i\pi\bar{z}r_m^2\right] \exp\left[-i2\pi\bar{r}_p(\cos\theta + \sin\theta) \cdot \bar{r}\right]. \quad (2.29)$$

Recordando la definición de las funciones de Bessel de primera especie en su forma integral

$$J_n(x) = \frac{i^{-n}}{2\pi} \int_0^{2\pi} d\alpha \exp\left[i(x \cos \alpha + n\alpha)\right], \quad (2.30)$$

la APSF3D queda como

$$h(\bar{r}, \bar{z}) = i2\pi\lambda r_m^2 e^{i2\pi\bar{z}\bar{\omega}_0} \int_0^1 d\bar{r}_p \bar{r}_p \exp\left[-i\pi\bar{z}\bar{r}_p^2\right] J_0(2\pi\bar{r}_p\bar{r}), \quad (2.31)$$

en la que es sencillo relacionar las coordenadas normalizadas con el sistema óptico por medio del cambio $\bar{r}_p = r_p/r_m$, $\bar{r} = (r_m/\lambda f)r$.

Podemos ahora evaluar la resolución transversal realizando un corte transversal de la APSF-3D en $\bar{z} = 0$, es decir,

$$h(\bar{\mathbf{x}}, \bar{z} = 0) = i2\pi\lambda r_m^2 \int_0^1 d\bar{r}_p \bar{r}_p J_0(2\pi\bar{r}_p\bar{r}). \quad (2.32)$$

A partir de la relación de derivación de las funciones de Bessel

$$\frac{d}{dx} \{x^{n+1} J_{n+1}(x)\} = x^{n+1} J_n(x) \quad (2.33)$$

identificamos

$$h(\bar{x}, \bar{z} = 0) = K \frac{J_1(2\pi\bar{r})}{2\pi\bar{r}} \quad (2.34)$$

donde K es una constante irrelevante. La función anterior es la APSF2D del sistema. Típicamente, dado que los detectores capturan la intensidad del campo, tendremos el módulo cuadrado de la función anterior

$$|h(\bar{x}, \bar{z} = 0)|^2 = K^2 \left| \frac{J_1(2\pi\bar{r})}{2\pi\bar{r}} \right|^2, \quad (2.35)$$

que no es más que la forma para la PSF2D de un sistema óptico con pupila circular clara conocida como disco de Airy. Si tenemos en cuenta ahora el criterio de Rayleigh, la resolución transversal del sistema será

$$\bar{r}_0 / J_1(2\pi\bar{r}_0) = 0. \quad (2.36)$$

donde nos estamos refiriendo exclusivamente al primer cero de la función de Bessel de primera especie de orden 1. Esto ocurre para $\bar{r}_0 \approx 0.61$. Si lo expresamos en términos de los parámetros del sistema $r = 0.61(\lambda f / r_m)$. Es posible relacionar dichos parámetros con la apertura numérica NA (del inglés, *numerical aperture*) del objetivo de microscopio de forma que $r_m / f = NA$. Teniendo en cuenta que r es el radio del disco de Airy generado en el foco imagen a partir de un punto situado en el foco objeto podemos decir que el sistema óptico, bajo el criterio de Rayleigh, posee una resolución transversal tal que es capaz de distinguir detalles separados una distancia igual o superior a

$$D = 1.22 \frac{\lambda}{NA}. \quad (2.37)$$

Como puede verse, aplicando este criterio tendríamos la misma resolución en un sistema coherente y uno incoherente, ya que ésta vendría dada por la posición del primer cero de la función de Bessel de orden 1 con respecto a su

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

máximo. Sin embargo, este criterio no puede aplicarse directamente al caso coherente ya que cuando se superponen dos APSF2D coherentemente el resultado no solo depende de la distancia entre ellas, sino que es un factor crucial la diferencia de fase que exista entre los puntos fuente que las generaron. Una discusión detallada sobre este punto puede encontrarse en las Refs.[20-21].

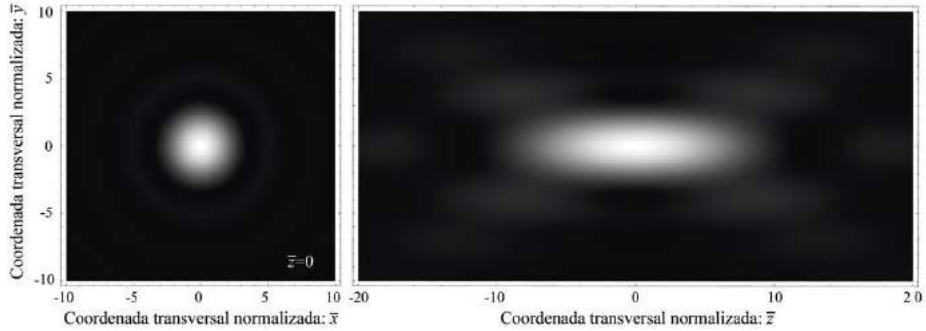


Fig. 4 Simulación de los cortes transversal y meridional del módulo cuadrado de la APSF3D de un sistema con pupila circular transparente.

De la misma manera podemos estimar la resolución axial del microscopio considerando exclusivamente el comportamiento de la APSF3D en la dirección axial, es decir

$$h(\bar{r} = 0, \bar{z}) = i2\pi\lambda r_m^2 e^{i2\pi\bar{z}\bar{\alpha}_0} \int_0^1 d\bar{r}_p \bar{r}_p \exp[-i\pi\bar{z}\bar{r}_p^2]. \quad (2.38)$$

Es fácil ver que si omitimos los factores constantes y resolvemos la integral, el comportamiento axial de la APSF3D viene dado por

$$h(0, \bar{z}) = \frac{\sin(\bar{z}/8\pi)}{\bar{z}/8\pi}, \quad (2.39)$$

por tanto, se rige por la variación de la función seno cociente. Si siguiésemos el criterio de Rayleigh nuevamente podríamos concluir que la resolución axial del sistema es

$$D_z = \frac{2\lambda}{(NA)^2}. \quad (2.40)$$

De nuevo, hemos de considerar que este resultado no es directamente trasladable al caso de tener dos fuentes coherentes, como hemos indicado previamente. Además, como veremos en las siguientes secciones, las frecuencias puramente axiales en un microscopio convencional no son transmitidas, lo que afecta radicalmente a la capacidad de distinguir secciones axiales contiguas en muestras 3D extensas.

2.4. Capacidad de seccionado óptico

Hasta ahora hemos analizado la formación de imágenes 3D desde el punto de vista de la resolución que proporcionan, es decir, analizando su PSF3D. Sin embargo, una característica muy importante en la formación de imágenes 3D es el contraste de las imágenes 2D proporcionadas por el sistema para distintas posiciones axiales de una muestra 3D. El efecto que poseen los planos desenfocados de la muestra sobre el plano de foco se puede analizar de una manera sencilla estudiando el contenido espacio-frecuencial de la imagen proporcionada por el sistema. Imaginemos un microscopio convencional que proporciona una imagen 3D de una cierta muestra, cuya distribución de intensidades viene dada por $I(\mathbf{x}, z)$. Si realizamos la transformada de Fourier 3D se obtiene la información de las frecuencias espaciales contenidas en dicha distribución, es decir

$$\tilde{I}(\mathbf{u}, w) = \int \int_{-\infty}^{\infty} d^2\mathbf{x} dz I(\mathbf{x}, z) \exp(-i2\pi\mathbf{x} \cdot \mathbf{u}) \exp(-i2\pi zw), \quad (2.41)$$

donde $\mathbf{u}=(u, v)$ y w son las frecuencias espaciales en el plano transversal y la dirección axial, respectivamente. Centremos nuestra atención en las frecuencias espaciales únicamente en la dirección axial, es decir

$$\tilde{I}(\mathbf{u} = 0, w) = \int \int_{-\infty}^{\infty} d^2\mathbf{x} dz I(\mathbf{x}, z) \exp(-i2\pi zw). \quad (2.42)$$

En la ecuación anterior podemos identificar la potencia transportada por el campo en un cierto plano del espacio imagen

$$P(z) = \int_{-\infty}^{\infty} d^2\mathbf{x} I(\mathbf{x}, z). \quad (2.43)$$

Por conservación de la energía, dicha potencia debe ser una constante para todo plano del espacio imagen, es decir, es independiente de z . De esta forma, la Ec.(2.42) queda en la forma

$$\tilde{I}(\mathbf{u} = 0, w) = P \delta(w). \quad (2.44)$$

Por tanto, la imagen de una muestra 3D en un microscopio convencional no contiene información de frecuencias espaciales en el eje axial de las mismas. Definiremos la capacidad de seccionado óptico de un sistema como su aptitud para transmitir frecuencias espaciales en la dirección axial y, en consecuencia, diremos que un microscopio convencional no posee dicha capacidad.

2.5. Funciones de transferencia coherente e incoherente

En el apartado anterior hicimos un estudio basado en la transformada de Fourier 3D de una cierta distribución de intensidades imagen proporcionada por un microscopio convencional. Sin embargo, nos centramos exclusivamente en el comportamiento sobre el eje axial. Para poder extender dicho estudio a un espacio 3D de frecuencias espaciales es necesario definir la función de transferencia de nuestro sistema, es decir, la función que nos permite relacionar las frecuencias espaciales transmitidas a través del mismo con las existentes en el objeto. Esto nos permitirá llevar a cabo una definición de resolución en el espacio recíproco a partir de lo que denominaremos el ancho de banda de la función de transferencia en cuestión. Dicho ancho de banda no es más que la extensión en el espacio de las frecuencias espaciales de la función de transferencia. Además, con ello se consigue una definición de resolución que no depende de la muestra empleada si no que se refiere unívocamente al sistema óptico (recordemos que bajo el criterio de Rayleigh consideramos dos puntos emitiendo con la misma intensidad para poder establecer una definición de resolución).

Cabe diferenciar nuevamente entre los sistemas coherente e incoherente. Distinguiremos entre la función de transferencia coherente (CTF, del inglés *Coherent Transfer Function*) y la correspondiente para un sistema incoherente, a la que llamaremos función de transferencia óptica (OTF, de la denominación anglosajona *Optical Transfer Function*). La función de transferencia 3D de un sistema se define como la transformada de Fourier 3D de su PSF3D.

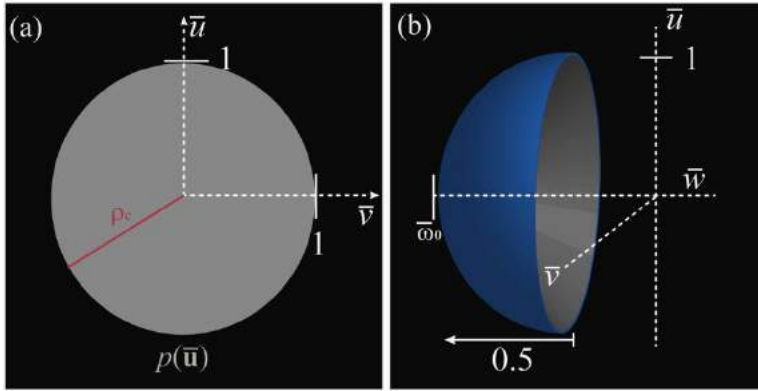


Fig. 5 Representación de las funciones de transferencia (a) 2D y (b) 3D de un microscopio convencional bajo iluminación y colección coherentes.

Función de transferencia coherente (CTF)

Realicemos pues la transformada de Fourier 3D de la respuesta impulsional de un sistema coherente

$$H_c(\bar{\mathbf{u}}, \bar{\mathbf{w}}) = \int \int_{-\infty}^{\infty} d^2\mathbf{x} dz h(\bar{\mathbf{x}}, \bar{z}) \exp(-i2\pi\bar{\mathbf{x}} \cdot \bar{\mathbf{u}}) \exp(-i2\pi\bar{z} \bar{w}), \quad (2.45)$$

donde las frecuencias espaciales normalizadas se relacionan dimensionalmente con las frecuencias espaciales de la siguiente manera

$$\bar{\mathbf{u}} = \frac{\lambda f}{r_m} \mathbf{u} \quad \bar{w} = \frac{\lambda f^2}{r_m^2} w \quad (2.46)$$

Omitiendo factores constantes, introducimos la Ec.(2.31) en la Ec.(2.45) para obtener la expresión de la CTF 3D

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

$$H_c(\bar{\mathbf{u}}, \bar{w}) = \int_{-\infty}^{\infty} d^2\bar{\mathbf{x}}_p p(\bar{\mathbf{x}}_p) \int_{-\infty}^{\infty} d^2\bar{\mathbf{x}} d\bar{z} \exp[-i2\pi\bar{\mathbf{x}} \cdot (\bar{\mathbf{u}} + \bar{\mathbf{x}}_p)] \times \exp[-i2\pi\bar{z}(\bar{w} - \bar{\omega}_0 + 1/2|\bar{\mathbf{x}}_p|^2)]. \quad (2.47)$$

De la ecuación anterior es directo comprobar que la CTF 3D puede expresarse como

$$H_c(\bar{\mathbf{u}}, \bar{w}) = p(\bar{\mathbf{u}}) \delta(w - \bar{\omega}_0 + 1/2|\bar{\mathbf{u}}|^2). \quad (2.48)$$

Por tanto, la CTF 3D es una superficie definida por un casquete parabólico (ver Fig. 5) en el cual la transmisión del espacio objeto al espacio imagen de las frecuencias espaciales en la dirección transversal se produce directamente según la forma de la función pupila del sistema.

De esta forma, conocida la función pupila del sistema resulta directo analizar la resolución transversal del mismo. Dicha resolución vendrá dada por la frecuencia espacial del corte, es decir, aquel valor de la frecuencia espacial a partir del cual la función pupila toma valores nulos. Si deshacemos la normalización de las coordenadas es directo ver que, para un sistema con simetría de revolución entorno al eje óptico y con una pupila circular clara, la frecuencia espacial de corte del sistema es

$$|\mathbf{u}_0| = \frac{r_m}{\lambda f} = \frac{NA}{\lambda}. \quad (2.49)$$

Nótese que si comparamos este valor con el predicho por el criterio de Rayleigh, se obtiene la misma dependencia con la apertura numérica y la longitud de onda del sistema, teniendo en cuenta la relación inversa existente entre la resolución y la frecuencia de corte.

En cuanto al comportamiento del sistema con respecto a las frecuencias espaciales en la dirección axial, es fácil ver que presenta una delta de Dirac sobre dicho eje. Esto implica que, como dedujimos en la sección anterior, el sistema no posee capacidad de seccionado óptico, es decir, que no existe transmisión de frecuencias espaciales en la dirección puramente axial.

Función de transferencia óptica

La OTF 3D de un sistema vendrá dada por

$$H(\bar{\mathbf{u}}, \bar{\mathbf{w}}) = \int \int_{-\infty}^{\infty} d^2\mathbf{x} dz |h(\bar{\mathbf{x}}, \bar{z})|^2 \exp(-i2\pi\bar{\mathbf{x}} \cdot \bar{\mathbf{u}}) \exp(-i2\pi\bar{z} \bar{\mathbf{w}}). \quad (2.50)$$

Aplicando el teorema de la convolución, es directo comprobar que

$$H(\bar{\mathbf{u}}, \bar{\mathbf{w}}) = H_c(\bar{\mathbf{u}}, \bar{\mathbf{w}}) *_3 H_c(\bar{\mathbf{u}}, \bar{\mathbf{w}}), \quad (2.51)$$

donde $*_3$ es la operación de autocorrelación 3D. Como vemos, tenemos la autocorrelación de dos casquetes parabólicos enfrentados (ver Fig. 6).

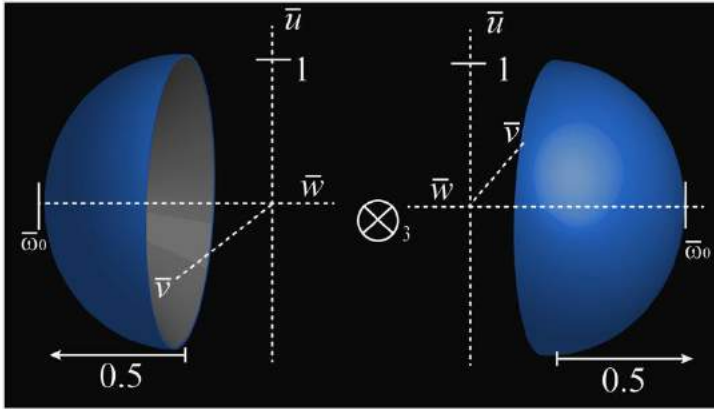


Fig. 6 Representación de la operación de autocorrelación de dos CTFs 3D.

Para poder llevar a cabo la operación de autocorrelación de manera analítica y simplificar los cálculos, consideraremos que la pupila posee simetría de revolución y, por tanto, podemos considerar las frecuencias espaciales transversales en una única dirección y de valor positivo. Con ello, podemos escribir la Ec.(2.51) de la siguiente forma

$$H(\bar{\rho}, \bar{w}) = \iiint_{\mathfrak{R}^3} d\alpha d\beta d\gamma H_c(\alpha, \beta, \gamma) H_c^*(\alpha - \bar{\rho}, \beta, \gamma - \bar{w}), \quad (2.52)$$

o lo que es lo mismo

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

$$H(\bar{\rho}, \bar{w}) = \iiint_{\mathfrak{q}^3} d\alpha d\beta d\gamma H_c\left(\alpha - \frac{\bar{\rho}}{2}, \beta, \gamma - \frac{\bar{w}}{2}\right) H_c^*\left(\alpha - \frac{\bar{\rho}}{2}, \beta, \gamma - \frac{\bar{w}}{2}\right), \quad (2.53)$$

Si sustituimos la Ec.(2.48) en la ecuación anterior obtenemos

$$H(\bar{\rho}, w) = \int_{-\infty}^{\infty} d\alpha P(\bar{\rho}, \alpha) \delta(\bar{w} + \alpha\bar{\rho}), \quad (2.54)$$

siendo

$$P(\bar{\rho}, \alpha) = \int_{-\infty}^{\infty} d\beta p\left(\alpha - \frac{\bar{\rho}}{2}, \beta\right) p^*\left(\alpha - \frac{\bar{\rho}}{2}, \beta\right), \quad (2.55)$$

la proyección en el eje α del producto de dos funciones con simetría radial desplazadas una distancia $\bar{\rho}$ a lo largo de dicho eje.

Tras resolver la integral en la Ec.(2.54), obtenemos que la OTF 3D de un sistema con simetría de revolución entorno al eje óptico con una función pupila cualquiera $p(\mathbf{x})$, puede expresarse de la siguiente forma

$$H(\bar{\rho}, \bar{w}) = \frac{1}{\bar{\rho}} P\left(\bar{\rho}, -\frac{\bar{w}}{\bar{\rho}}\right). \quad (2.56)$$

Si particularizamos para un sistema con una apertura circular clara, la función $P(\bar{\rho}, \alpha)$ vendrá dada por la proyección sobre el eje α del área común de dos círculos separados simétricamente una distancia $\bar{\rho}$. Realizando un razonamiento puramente geométrico se obtiene

$$P(\bar{\rho}, \alpha) = 2 \operatorname{Re} \left\{ \sqrt{1 - (|\alpha| + \bar{\rho}/2)^2} \right\}, \quad (2.57)$$

con lo que

$$H(\bar{\rho}, \bar{w}) = \frac{2}{\bar{\rho}} \operatorname{Re} \left\{ \sqrt{1 - \left(\frac{|\bar{w}|}{\bar{\rho}} + \bar{\rho}/2 \right)^2} \right\}. \quad (2.58)$$

En la Fig. 7 puede observarse la representación 3D de la OTF. Ésta presen-

ta una forma toroidal con simetría de revolución entorno al eje de las frecuencias espaciales en la dirección axial. A partir de esta función podemos obtener la frecuencia espacial de corte en la dirección transversal imponiendo

$$H(\bar{\rho}_0, \bar{w} = 0) = \frac{2}{\bar{\rho}_0} \operatorname{Re} \left\{ \sqrt{1 - (\bar{\rho}_0/2)^2} \right\} = 0. \quad (2.59)$$

Con ello se obtiene que $\bar{\rho}_0 = 2$. Si deshacemos la normalización y dado que existe simetría revolución, obtenemos la siguiente frecuencia espacial de corte en la dirección transversal

$$|\mathbf{u}_0| = 2 \frac{NA}{\lambda}. \quad (2.60)$$

Podríamos concluir a partir de dicho resultado que un microscopio posee el doble de resolución cuando colecta luz incoherente que cuando lo hace de forma coherente. Sin embargo, dicha afirmación requiere algunos matices. Como puede observarse en la Fig. 8(a), la función de transferencia óptica para un sistema con apertura circular clara no otorga el mismo peso a cada una de las frecuencias espaciales transmitidas en la dirección transversal a través del sistema. De hecho, cuanto mayor sea la frecuencia espacial transversal menor es su peso. Esto implica que las frecuencias espaciales más altas en una imagen tendrán un menor contraste que las bajas. Además, de un modo más fundamental, la CTF hace referencia a la transmisión del espectro de la distribución de amplitudes mientras que la OTF hace referencia a la distribución de irradiancia. La comparación de ambas funciones ha de hacerse de un modo cuidadoso y el resultado de la misma depende fuertemente del espécimen considerado.

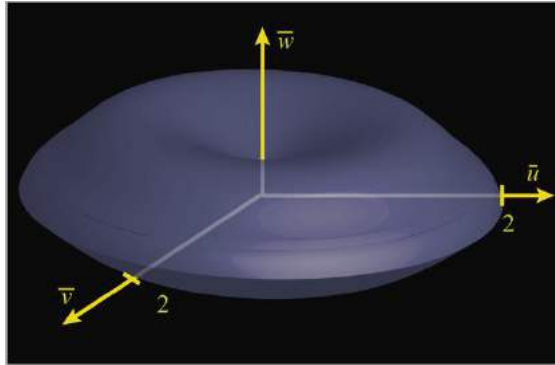


Fig. 7 Representación de la OTF 3D de un microscopio convencional con simetría de revolución con respecto al eje óptico y pupila circular transparente.

Es difícil analizar el comportamiento axial de la OTF 3D a partir de la Ec.(2.58) ya que, en principio, presenta un valor indeterminado en el origen de las frecuencias espaciales. Sin embargo, es directo ver a partir de la Ec.(2.54) que existe una delta de Dirac en el origen de las frecuencias espaciales y que la función es nula en el resto del eje axial. Si se realiza un corte meridional de la OTF 3D, ver Fig. 8(b), puede observarse que existe un cono en la dirección axial de frecuencias espaciales que no se transmiten por el sistema óptico, conocido como cono de pérdidas. En última instancia, dicho cono de pérdidas justifica la ausencia de seccionado óptico en un microscopio convencional que trabaje bien con luz incoherente o con una respuesta incoherente de la muestra debido a la fluorescencia de la misma.

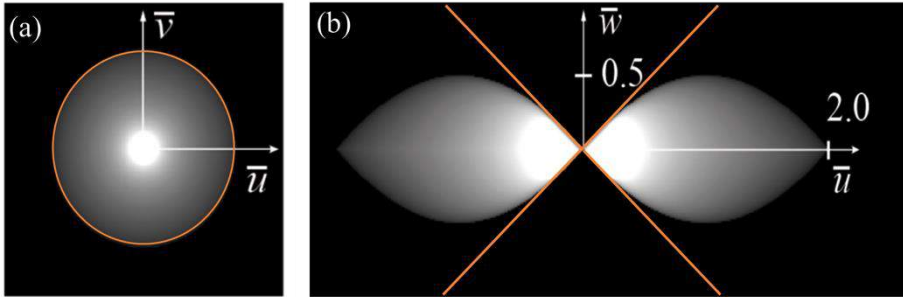


Fig. 8 Representación de un corte (a) transversal, y; (b) axial de la OTF 3D de un microscopio convencional. En color naranja se representan (a) la circunferencia correspondiente a la frecuencia espacial de corte en la dirección transversal, y; (b) el cono de pérdidas de las frecuencias espaciales en la dirección axial.

2.6. Límites de la microscopía óptica convencional

A modo de conclusión, en vista del análisis realizado en este Capítulo, podemos decir que la microscopía óptica convencional posee dos límites fundamentales (entendemos que las aberraciones del sistema óptico no representan un límite fundamental ya que se deben mayormente a defectos de fabricación que, idealmente, pueden ser subsanados). Por un lado, tenemos el límite en resolución transversal. La única forma de mejorar la resolución de un sistema convencional es aumentando la apertura numérica y/o reduciendo la longitud de onda. Si empleamos un objetivo de microscopio de alta apertura, por ejemplo, uno de inmersión en aceite de $NA=1.4$ y una longitud de onda de colección corta dentro del rango visible, digamos $\lambda=480$ nm, la resolución transversal sistema bajo estas condiciones será de aproximadamente 200 nm. Por otro lado, hemos comprobado que este tipo de sistemas no transmiten las frecuencias espaciales en la dirección axial por lo que, estrictamente, no es posible recuperar la información de muestras 3D. Además cabe mencionar que, dado que los detectores capturan la distribución de intensidad del campo, la información de fase contenida en la distribución de amplitudes del campo para un sistema puramente coherente se pierde en el proceso de captura (ver Ec.(2.19)).

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

3. Microscopia confocal de barrido

An ideal microscope would examine each point of the specimen and measure the amount of light scattered or absorbed by that point. But if we try to make many such measurements at the same time then every focal image point will be clouded by aberrant rays of scattered light deflected points of the specimen that are not the point you're looking at⁴.

Marvin Minsky, Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope, Scanning, vol.10, (1988)

La microscopía confocal se ha convertido en una de las técnicas de mayor uso y utilidad en numerosos campos de estudio dentro de la microscopía óptica moderna²². A pesar de que fue propuesta hace más de medio siglo³, ha sido en las últimas dos décadas cuando ha encontrado su auge gracias, en parte, a diferentes desarrollos tecnológicos. Dentro de estos desarrollos se encuentran el láser, los detectores de área extensa, así como los sistemas de barrido con precisión sub-micrométrica.

La idea clave de este microscopio óptico es la conjunción de una iluminación puntual de la muestra y una detección puntual de la luz reflejada por la misma³. Como se muestra en la Fig.9, esto se consigue proyectando sobre la muestra, a través de un objetivo de microscopio, la luz láser emitida a la salida de una fibra óptica. La luz que refleja dicha muestra es colectada empleando el mismo objetivo de microscopio y, mediante un divisor de haz (BS, del in-

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

glés, *beam splitter*), se proyecta sobre un *pinhole* de dimensiones micrométricas. Éste actúa eliminando la luz que proviene de planos desenfocados de la muestra confiriéndole al sistema capacidad de seccionado óptico. La luz que atraviesa el *pinhole* llega a un detector de área extensa, normalmente un tubo fotomultiplicador (PMT, del inglés, *photomultiplier tube*), que la transfiere en una señal eléctrica. Dicha señal es almacenada en un ordenador como un píxel de la imagen confocal. Para obtener una imagen 2D es necesario realizar un barrido transversal de la muestra. Asimismo, gracias a la capacidad de seccionado óptico del sistema, es posible realizar una imagen sintética 3D a partir de la compilación de pilas de imágenes 2D capturadas mediante un barrido axial de la muestra.

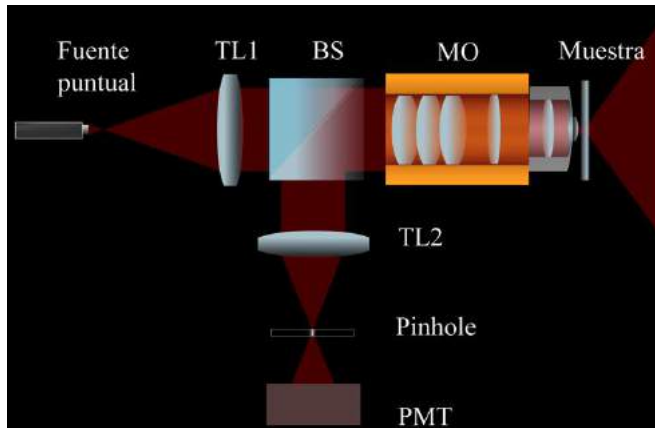


Fig. 9 Esquema de un microscopio confocal de barrido.

3.1. Formación de imágenes en un microscopio confocal

En este apartado analizaremos la formación de imágenes a partir de un microscopio confocal de barrido. Distinguiremos entre varios casos: por un lado consideraremos los sistemas coherente e incoherente y además tendremos en cuenta distintos posibles detectores: puntual, infinito y con una geometría cualquiera. Por lo general, cuando hablemos de detector nos estaremos refiriendo a la combinación entre el *pinhole* y el PMT. El brazo de iluminación es

común a todos los casos y, como puede observarse, ilumina la muestra con la respuesta impulsional del sistema formado por la lente colimadora y el objetivo de microscopio. Por ello, llamamos $h_{ill}(\mathbf{x}, z)$ a la distribución compleja de amplitudes de la iluminación proyectada sobre el objeto. Ésta vendrá dada por

$$h_{ill}(\mathbf{x}, z) = \tilde{p}_{ill} \left(\frac{\mathbf{x}}{\lambda f_2} \right) \otimes_2 \frac{\exp[ikz]}{z} \exp \left[-\frac{ik}{2z} |\mathbf{x}|^2 \right]. \quad (3.1)$$

Si se tiene un objeto 3D con una cierta respuesta en amplitudes $o(\mathbf{x}, z)$, en un plano del espacio imagen conjugado con el foco del objetivo (en microscopía convencional, el plano imagen) se tendrá la siguiente distribución en amplitudes

$$U'(\mathbf{x}, z=0) = \left\{ o(\mathbf{x}, z) h_{ill}(\mathbf{x}, z) \right\} \otimes_3 h_{col}(\mathbf{x}, z) \Big|_{z=0}. \quad (3.2)$$

En este plano se coloca un *pinhole* de dimensiones micrométricas. Consideraremos en primer lugar un caso ideal en el que el tamaño del mismo es infinitesimal y que, además se encuentra centrado sobre el eje óptico. Obviamente, en la práctica dicho *pinhole* debe poseer una cierta extensión mínima, que depende del objetivo de microscopio empleado, para que la luz que lo atraviesa pueda ser detectada por el PMT.

Con el fin de simplificar las ecuaciones, vamos a hacer un pequeño cambio de notación que únicamente afectará a este Capítulo. Con el fin de simplificar los cálculos, reescalamos las coordenadas ópticas normalizadas que definimos en el capítulo anterior de manera que

$$\bar{\mathbf{x}} = 2\pi \frac{r_m}{\lambda f} \mathbf{x} \quad \bar{z} = 2\pi \frac{r_m^2}{\lambda f^2} z. \quad (3.3)$$

El motivo de esta nueva normalización es sencillo: cuando se estudia el sistema óptico desde el punto de vista de las frecuencias espaciales, el factor 2π es necesario ya que se incluye dentro de la transformada de Fourier que relaciona los espacios recíprocos. Sin embargo, si centramos nuestro estudio exclusivamente en el espacio real, dicho factor resulta incómodo como puede

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

verse en la función disco de Airy de la Ec.(2.35). Hecho esto, podemos expresar la imagen obtenida mediante el microscopio confocal en la forma

$$I(\bar{r}, \bar{z}) = O(\bar{r}, \bar{z}) \otimes_3 |h_1(\bar{r}, \bar{z})h_2(\bar{r}, \bar{z})|^2 = O(\bar{r}, \bar{z}) \otimes_3 h_{conf}(\bar{r}, \bar{z}), \quad (3.4)$$

donde

$$h_i(\bar{r}, \bar{z}) = (i\lambda) e^{-is_i u} \int_0^1 P_i(\rho) e^{-\frac{1}{2}\bar{z}\rho^2} J_0(\bar{r}\rho) \rho d\rho \quad (3.5)$$

es la APSF 3D para los sistemas de iluminación y colección, respectivamente. Si consideramos que las pupilas de ambos sistemas circulares y del mismo tamaño, podemos realizar el cálculo analítico de la forma de la APSF 3D para un corte transversal así como de la función que presenta a lo largo del eje axial

$$h_{conf}(\bar{r}, \bar{z} = 0) = \left| \frac{2J_1(\bar{r})}{\bar{r}} \right|^4, \quad h_{conf}(v = 0, u) = \left| \frac{\sin(\bar{z}/4)}{\bar{z}/4} \right|^4. \quad (3.6)$$

A partir de las ecuaciones anteriores, o bien a partir de la Ec. (3.7), es fácil deducir que la APSF3D de un microscopio confocal será el módulo cuadrado de la correspondiente si fuera un sistema convencional. Ello implica un estrechamiento de la misma y, por tanto, una mejora en resolución como puede observarse en los cortes meridionales de dicha función mostrados en la Fig. 10.

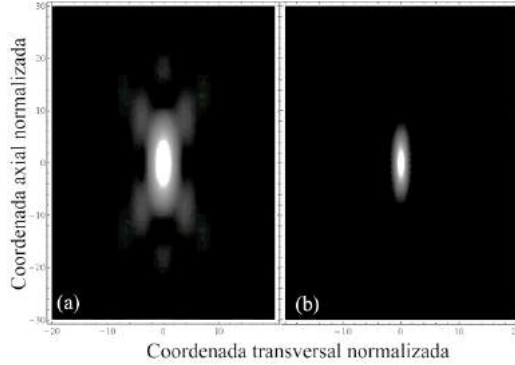


Fig. 10 Simulación de los cortes meridionales de la PSF3D para un microscopio: (a) convencional y; (b) confocal de barrido.

3.2. Influencia de la geometría del detector

En el apartado anterior estudiamos la formación de imágenes en microscopía confocal considerando que el detector era puntual y estaba centrado sobre el eje óptico para cada posición de barrido de la muestra. Sin embargo, la geometría del mismo (tamaño, forma y posición) posee un papel primordial en la calidad obtenida mediante este tipo de microscopio²³⁻²⁶.

En la práctica el detector posee un cierto tamaño ya que la relación señal ruido disminuye drásticamente a medida que se reduce el tamaño del detector. Por lo tanto, en el mejor de los casos, tendremos un *pinhole* de tamaño lo suficientemente pequeño como para conservar las propiedades fundamentales del sistema confocal ideal. Se puede demostrar que para un detector circular de tamaño finito situado en el plano del *pinhole*, con área efectiva $D(\mathbf{x})$

$$D(\mathbf{x}) = \begin{cases} 1 & \text{si } |\mathbf{x}| < a \\ 0 & \text{si } |\mathbf{x}| > a \end{cases}, \quad (3.8)$$

la respuesta impulsional del microscopio confocal viene dada por^{23,25}

$$h_{conf}(\bar{r}, \bar{z}) = |h_1(\bar{r}, \bar{z})|^2 \left\{ |h_2(\bar{r}, \bar{z})|^2 \otimes_2 D(\bar{r}) \right\}. \quad (3.9)$$

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

A partir de la ecuación anterior es posible calcular la forma que tendrá la APSF y la PSF del sistema confocal para un cierto radio a del área efectiva del detector. Existen dos casos límite para el *tamaño* del detector en los que se obtiene una expresión sencilla de la respuesta impulsional en intensidades del microscopio confocal, a saber,

$$h_{conf}(\bar{r}, \bar{z}) = \begin{cases} |h_1(\bar{r}, \bar{z})h_2(\bar{r}, \bar{z})|^2, & \text{si } a \rightarrow 0 \\ |h_1(\bar{r}, \bar{z})|^2, & \text{si } a \rightarrow \infty \end{cases} \quad (3.10)$$

Como vemos, si el detector es puntual se obtiene la respuesta impulsional de un microscopio confocal ideal mientras que si el tamaño del detector tiende a infinito (equivaldría a un microscopio de barrido sin *pinhole*) la respuesta impulsional es exactamente la misma que para un microscopio convencional con la respuesta impulsional de iluminación. En el resto de casos estaríamos en una situación intermedia, es decir, dependiendo del tamaño del detector se produciría un ensanchamiento equivalente de la respuesta confocal ideal (ver Fig. 11).

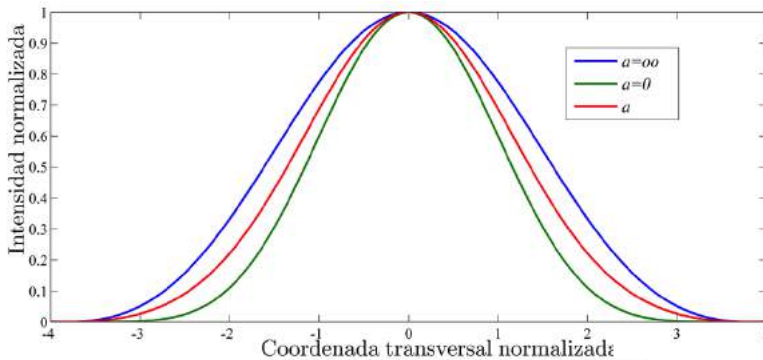


Fig. 11 Representación de la PSF en la dirección transversal en un microscopio confocal de barrido para distintos radios a de un detector circular.

Del mismo modo, la posición en la que se encuentra el detector con respecto al eje óptico influye en la distribución de intensidades final. Así, es interesante estudiar cómo varía la respuesta impulsional del sistema cuando se considera un detector puntual desplazado una cantidad Δ con respecto al eje óptico. Es fácil ver que dicha respuesta, en la dirección transversal, puede expresarse como^{24,27}

$$h_{conf}(\bar{r}, \bar{z} = 0) = \left| \frac{2J_1(\bar{r} - \Delta/2)}{\bar{r} - \Delta/2} \right|^2 \left| \frac{2J_1(\bar{r} + \Delta/2)}{\bar{r} + \Delta/2} \right|^2, \quad (3.11)$$

donde suponemos que se emplea el mismo objetivo (cuya pupila es circular) tanto para iluminación como para colección y, además, se ha realizado un corrimiento relativo de las coordenadas transversales. Dicho corrimiento, en la práctica, carece de importancia puesto que supone exclusivamente un desplazamiento lateral de la imagen obtenida mediante el sistema. Este mismo desplazamiento fue empleado para proponer la captura de imágenes estereoscópicas empleando un sistema confocal con dos pinholes separados simétricamente con respecto al eje óptico²⁸.

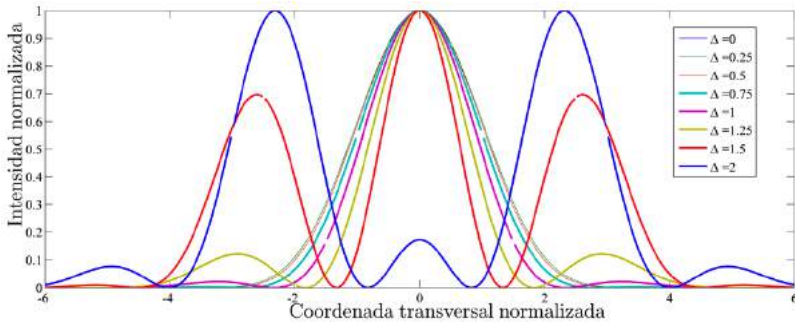


Fig. 12 Representación de la PSF transversal de un sistema confocal de barrido para un detector puntual desplazado transversalmente una cantidad Δ con respecto al eje óptico. La coordenada transversal representada corresponde a la dirección de desplazamiento del detector.

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

En las curvas de la Fig. 12, se observa que existen ciertas posiciones del detector que producen una respuesta impulsional en la dirección transversal más estrecha que para el caso en el que éste se encuentra centrado en el eje óptico. De hecho, esta propiedad se identificó en un principio como un método para mejorar la resolución en los microscopios confocales²⁸⁻³⁰. Sin embargo, conforme aumenta la separación con respecto al eje óptico, aparecen unos lóbulos laterales que distorsionan dicha respuesta. Es interesante el caso en el cual el desplazamiento es tal que coincide aproximadamente con el primer cero del disco de Airy ($|\Delta| \sim 2$). Dicha situación se ha empleado para realizar detección de bordes en microscopia confocal como alternativa a la microscopia de campo oscuro^{28,31}.

De los resultados teóricos obtenidos podemos concluir que la influencia del tamaño del detector puede entenderse a partir de lo que ocurre cuando se tiene un detector infinitesimal desplazado. Para un cierto tamaño del detector, la respuesta impulsional vendría dada por la integración de la respuesta de distintos detectores infinitesimales desplazados dentro del área del detector de tamaño finito y, como consecuencia, la respuesta impulsional en dicho caso se esparce con respecto al caso ideal.

3.3. Capacidad de seccionado óptico

A continuación, relacionaremos directamente este apartado con los cálculos realizados en el Capítulo 2 en la sección 2.4. Ahora, al introducir el *pinhole*, eliminamos cierta cantidad de luz y por tanto no se produce la conservación de la energía de un plano anterior al *pinhole* a otro posterior. Así, en el espacio imagen obtendremos la siguiente distribución de potencia en cada plano transversal

$$P(z) = \int_{-\infty}^{\infty} d^2\mathbf{x} I(\mathbf{x}, z) \quad (3.12)$$

que ya no será constante, y, por tanto, sobre el eje de las frecuencias axiales

de la transformada de Fourier 3D tendremos una función de soporte compacto con una cierta extensión dada por

$$\tilde{I}(\mathbf{u} = 0, w) = \tilde{P}(w)\delta(w). \quad (3.13)$$

Para interpretar físicamente este resultado, imaginemos que colocamos como muestra un difusor delgado plano (o una lámina delgada fluorescente en el caso de CSFM) y representamos la señal obtenida tras un barrido axial de la muestra. Si tuviésemos un microscopio convencional, la señal obtenida sería independiente de la posición de la muestra. Sin embargo, por medio de la acción del pinhole, se consigue discriminar la posición axial de la muestra, de forma que la señal es máxima cuando ésta se encuentra en el foco objeto.

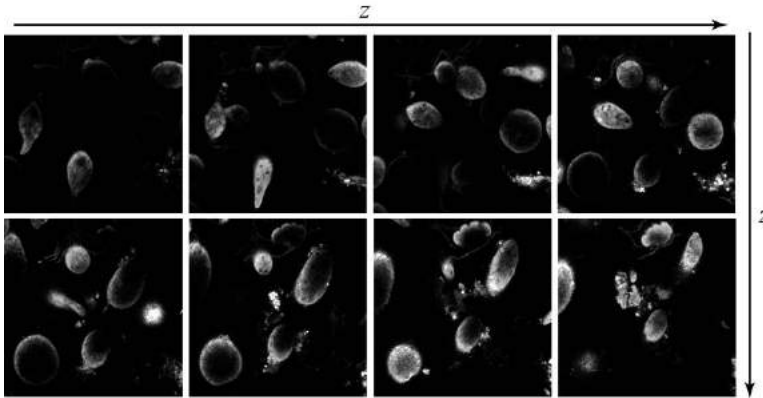


Fig. 13 Pila de imágenes 2D obtenidas en el laboratorio con un microscopio confocal comercial (Nikon C1) con un objetivo de inmersión en aceite 60× NA=1.4. Como muestra 3D se empleó una preparación con distintos tipos de granos de polen.

La capacidad de seccionado óptico permite al sistema obtener cortes ópticos de un cierto grosor de muestras 3D (ver Fig. 13). A partir de dichos cortes, obtenidos para una sucesión de posiciones axiales de la muestra, es posible realizar una reconstrucción 3D de la misma, como puede observarse en la Fig. 14. Para ello existen distintos algoritmos, aunque el más empleado en microscopía confocal es el de proyección de máxima intensidad ó MIP (del inglés,

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

Maximum Intensity Projection), en el que se realiza una proyección en perspectiva a partir de una pila de cortes axiales analizando la intensidad de los píxeles en las secciones 2D, definiendo un tamaño de *vóxel* (o unidad elemental de volumen) y transfiriendo la información de intensidad 3D a cada uno de los *vóxeles* dentro de un cierto volumen³². Es preciso mencionar el hecho de que, dada la anisotropía espacial de la PSF3D (ver, en la que se aprecia que la PSF tiene una mayor extensión axial que transversal), el cubo que representa el *vóxel* será un ortoedro en las dimensiones del espacio real, siempre que el barrido transversal de la muestra permita que el sistema esté limitado en difracción (ver ANEXO 3).

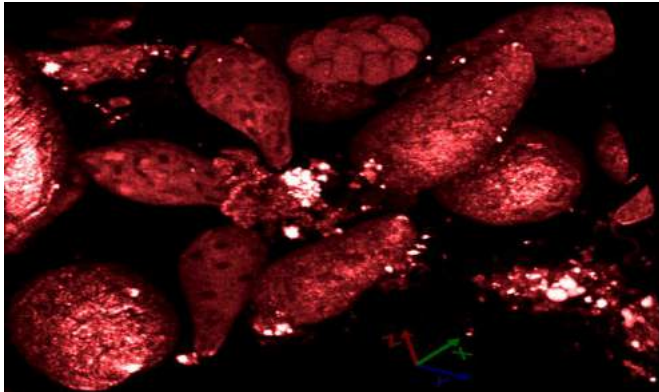


Fig. 14 Reconstrucción 3D obtenida a partir de la pila de imágenes 2D que se muestra en la Fig. 13.

3.4. Muestreo espacial del plano del detector

Como hemos visto el microscopio confocal, empleado en condiciones óptimas, posee mayor resolución que un microscopio convencional. Este hecho puede resultar paradójico teniendo en cuenta que en el microscopio confocal se desecha cierta información por medio del empleo del *pinhole*. Dicha paradoja no es tal ya que, como se deduce de los cálculos realizados en la sección 3.2, se está incorporando al sistema información acerca de cómo se distribuye

especialmente la luz en el plano del detector. Es fácil comprender, pues, el papel crucial que juega el tamaño del *pinhole* en la detección confocal. Idealmente dicha detección se realiza con un *pinhole* infinitesimal. En la práctica se emplean diferentes tamaños (dependiendo del objetivo de microscopio empleado) que van de unas pocas decenas a cientos de micras. A medida que el tamaño del *pinhole* aumenta la imagen confocal se “emborriona” como consecuencia de la adición de información a la imagen confocal ideal, aproximándose a la que se obtendría con un microscopio convencional cuando el tamaño del detector es suficientemente grande. Mediante este razonamiento se puede concluir que al integrar en una señal la luz que atraviesa el *pinhole* se está perdiendo gran cantidad de información. Esto sugiere un tipo alternativo de detección confocal, mediante el uso de un detector matricial, en la que se realiza un muestreo espacial en el plano del detector de la distribución de intensidades imagen del campo reflejado por la muestra para cada posición de barrido. El empleo de un detector matricial en microscopía confocal fue propuesto años atrás^{22,33,34}. Sin embargo, al no existir un detector óptimo para llevarla a cabo, este tipo de detección no tuvo un gran impacto. El rápido desarrollo de los sensores CCD en los últimos años hace viable la detección matricial presentándola no sólo como una seria alternativa a la detección usual, sino abriendo la posibilidad de realizar un procesamiento de la señal confocal para cada posición de barrido de la muestra³⁵⁻³⁷. Cabe diferenciar la técnica que proponemos a continuación de la recientemente propuesta como *Image Scanning Microscopy*³⁸, la cual requiere el empleo de un *pinhole*.

Supongamos que situamos una cámara CCD con (N_x, N_y) píxeles separados una distancia (Δ_x, Δ_y) en el plano del detector de un microscopio confocal de barrido, tal como muestra la Fig. 15. Si consideramos que los píxeles son elementos infinitesimales el área efectiva del detector matricial vendría dada por

$$D_{m,n}(x, y) = \sum_{m=1}^{N_x} \sum_{n=1}^{N_y} \delta \left(x - \left(m - \frac{N_x}{2} \right) \Delta_x, y - \left(n - \frac{N_y}{2} \right) \Delta_y \right), \quad (3.14)$$

donde hemos escrito la coordenada radial normalizada en función de sus

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

componentes transversales (x,y) y donde hemos supuesto que el píxel central de la cámara se sitúa centrado sobre eje óptico. Es directo ver que, si realizamos una captura con la cámara para cada posición de barrido de la muestra, se registrarán distintas señales correspondientes a detectores desplazados con respecto al eje óptico. Por tanto, es posible combinar dichas señales elementales para obtener una señal equivalente a la detección confocal, con la flexibilidad de poder variar tanto el tamaño del detector como su posición. Asimismo, surge la posibilidad de obtener señales correspondientes a distintos detectores en paralelo, de tal forma que es directo implementar técnicas de aumento de resolución como veremos más adelante.

Podemos suponer, por tanto, que si realizamos la integración numérica de un cierto número de píxeles dentro de los cuales se encuentre centrada la PSF2D del sistema de colección, estaremos simulando el efecto que se produce cuando un PMT integra la luz que atraviesa un *pinhole* situado en el mismo plano que la cámara. Para aprovechar esta analogía, hemos desarrollado un *software* que permite controlar distintos parámetros de la cámara como son la ganancia, tiempo de exposición, y el número y posición de los píxeles activos. La señal para una posición de barrido se obtiene mediante la integración numérica de la respuesta recogida sobre dichos píxeles activos. La posibilidad de elegir el número de píxeles activos de la cámara es muy relevante a la hora de realizar una imagen ya que el tiempo de respuesta de la cámara depende de dicho número y, a su vez, determina el tiempo de adquisición para cada posición del barrido. Una de las ventajas del sistema es que de esta manera tenemos un *pinhole* sintético de tamaño variable y cuya alineación puede llevarse a cabo de manera muy sencilla. Obviamente, dicho *pinhole* sintético presentará una forma cuadrada o bien de círculo pixelado (cabe hacer notar que la gran parte de los sistemas confocales comerciales con *pinhole* de tamaño variable emplean dos rendijas dinámicas cuya posición permite crear un *pinhole* cuadrado). Por otra parte, si la muestra se ilumina además por transmisión con una fuente extensa de luz blanca, es posible identificar la zona de barrido mediante la visualización directa de la imagen de campo claro capturada por la

cámara CCD, sobre la que se observará el *spot* de iluminación. Además, si el sensor posee tres canales cromáticos podría llevarse a cabo la adquisición en color de imágenes confocales (dentro de las limitaciones espectrales del filtro de Bayer del sensor). De esta forma, nuestra implementación también supone una reducción de coste debido a que la realización de detección en color en un microscopio confocal estándar exige tres tubos fotomultiplicadores con sus correspondientes filtros. Las ventajas anteriores sumadas a la posibilidad de realizar diferentes técnicas basadas en el muestreo espacial del plano del detector otorgan gran robustez y flexibilidad al sistema.

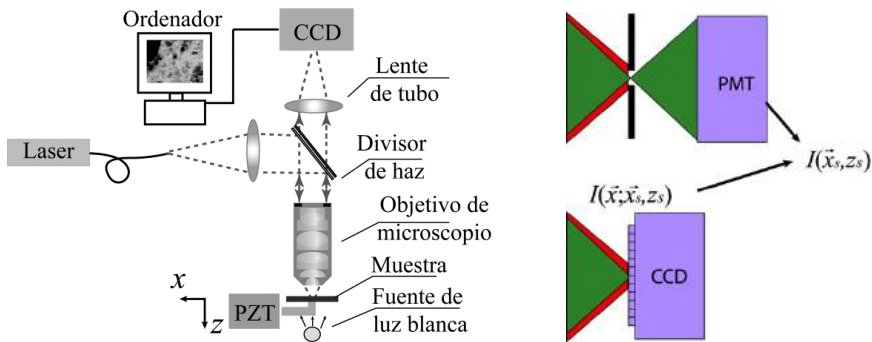


Fig. 15 (izquierda) Esquema del microscopio confocal propuesto en el que una cámara CCD se coloca en el plano del detector sustituyendo el PMT y el *pinhole*. (derecha) La señal equivalente al sistema convencional se obtiene a partir de la integración de la luz detectada por un cierto número de píxeles.

Siguiendo el esquema de la Fig. 15, construimos un microscopio que empleaba un láser He-Ne ($\lambda=632.8$ nm) acoplado a una fibra óptica monomodo para iluminar “puntualmente” la muestra. El barrido de la muestra se realizó mediante un sistema piezoeléctrico (PZT) que permite desplazamientos 3D en etapas de $0.1 \mu\text{m}$. En la mayoría de los resultados que se mostrarán más adelante se empleó un objetivo de microscopio de aumento $100\times$ y $NA=0.9$. Dicho objetivo de microscopio estaba conjugado al infinito por lo que se emplearon dos lentes de tubo de 200 mm de distancia focal tanto en iluminación

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

como en colección. La cámara CCD empleada poseía 8-bits y 1600×1400 píxeles de $4.4 \mu\text{m}$ de tamaño. Si se empleaba todo el detector, la máxima velocidad de adquisición era de 6 *frames* por segundo. Sin embargo, para los tamaños típicos del *pinhole* sintético utilizado (entre 4×4 y 20×20 píxeles activos) la velocidad de adquisición aumentaba hasta cerca de los 500 *frames* por segundo.

Para comprobar el funcionamiento de nuestra implementación, realizamos los siguientes experimentos:

- a) En primer lugar probamos las prestaciones del microscopio propuesto como sistema formador de imágenes. Para ello, se realizó la imagen de un test *USAF-1951* de alta resolución en negativo, creado por deposición de cromo sobre vidrio. La imagen obtenida tras el barrido con un *pinhole* sintético de 6×6 píxeles se muestra en la Fig. 16(a). Para evaluar la resolución del sistema en la dirección transversal empleamos una microesfera reflectante con un diámetro más pequeño que la respuesta impulsional del sistema. El perfil obtenido de dicha microesfera se representa en la Fig. 16(b). El valor teórico de la anchura a media altura (FWHM, del inglés *full width at half maximum*) de la respuesta impulsional en la dirección transversal para el objetivo de microscopio usado en este experimento es de $0.7 \mu\text{m}$, que coincide con el valor obtenido experimentalmente a partir del perfil de la microesfera.
- b) Para evaluar la resolución en la dirección axial se realizó un barrido de un espejo plano en la dirección del eje óptico. La curva obtenida en dicho barrido es una estimación de la respuesta impulsional del sistema en la dirección axial y se conoce como la función $V(z)^{26}$. Este proceso lo realizamos para distintos tamaños del *pinhole* sintético, como puede verse en la Fig. 16 (c). La FWHM de la $V(z)$ teórica para un sistema confocal ideal con el objetivo de microscopio empleado es de $1.09 \mu\text{m}$, valor al que se aproxima la medida experimental para el

pinhole sintético más pequeño.

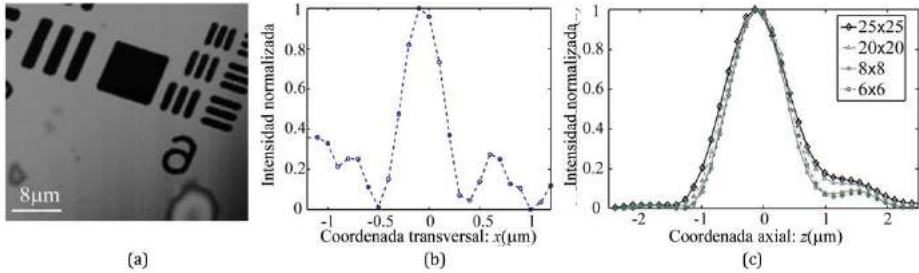


Fig. 16 Evaluación de las características del microscopio propuesto como sistema formador de imágenes: (a) Imagen confocal de un test *USAF-1951* de alta resolución en negativo; (b) Perfil de la imagen obtenida de una microesfera reflectante de $0.1 \mu\text{m}$ de radio, y; (c) Curvas $V(z)$ para distintos tamaños del *pinhole* sintético.

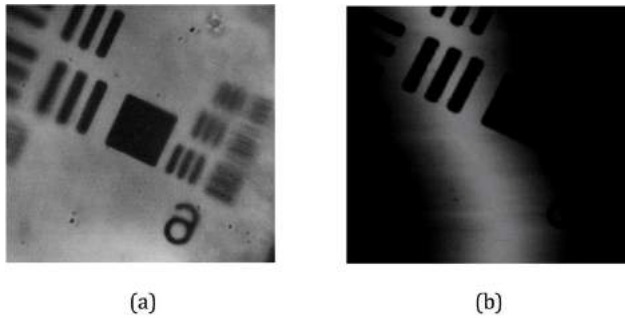


Fig. 17 Imágenes del test *USAF-1951* en negativo al que se le ha inducido una cierta inclinación con respecto al eje óptico para tamaños del *pinhole* sintético de: (a) 50×50 píxeles, (b) 8×8 píxeles.

- c) Por último, para comprobar la capacidad de seccionado óptico del sistema se empleó nuevamente el test *USAF-1951* pero esta vez inclinado con respecto al eje óptico. Se tomó la imagen 2D para un tamaño de *pinhole* sintético de 50×50 píxeles y otra con 8×8 píxeles. Como era de esperar (ver Fig. 7), para el *pinhole* sintético mayor la luz proveniente de planos que están fuera de foco sigue estando presente en la sección registrada mientras que en el otro caso dicha luz es par-

cialmente bloqueada por el *pinhole* sintético.

3.5. Imagen subtractiva a partir de combinaciones de *pinholes* virtuales: mejora en resolución 3D

Como hemos visto en la sección 3.2, la geometría y la posición del detector tienen un papel fundamental en las características de la distribución de intensidad imagen obtenida en un microscopio confocal. Si bien supone una limitación práctica a la hora de aproximarse al caso ideal, es posible aprovechar esta dependencia para aumentar la resolución 3D del sistema. Existen una serie de técnicas que permiten mejorar la resolución de un microscopio confocal por medio de la combinación de señales obtenidas con detectores de distinta geometría. Una de dichas técnicas es la conocida como imagen sustractiva en microscopía confocal³⁹. Se basa en la sustracción de las señales, apropiadamente ponderadas, obtenidas barriendo la muestra en ausencia de *pinhole* (o con un *pinhole* relativamente grande) y con un *pinhole* de tamaño óptimo para la detección confocal. De este modo, la distribución de intensidades obtenida para la imagen subtractiva se puede escribir como

$$I_{sub}(\bar{r}, \bar{z}) = I_{cerrado}(\bar{r}, \bar{z}) - \gamma I_{abierto}(\bar{r}, \bar{z}) \quad (3.15)$$

siendo γ un factor de ponderación que permite sopesar ambas señales convenientemente. La respuesta impulsional de la imagen subtractiva en las direcciones transversal y axial viene dada por

$$\begin{aligned} h_{sub}(\bar{r}, \bar{z} = 0) &= \left| \frac{J_1(\bar{r})}{\bar{r}} \right|^4 - \gamma \left| \frac{J_1(\bar{r})}{\bar{r}} \right|^2, \\ h_{sub}(\bar{r} = 0, \bar{z}) &= \left| \frac{\sin(\bar{z}/4)}{\bar{z}/4} \right|^4 - \gamma \left| \frac{\sin(\bar{z}/4)}{\bar{z}/4} \right|^2. \end{aligned} \quad (3.16)$$

Para obtener una respuesta óptima el factor de peso se escoge de forma que

$$MAX[h_{abierto}(\bar{r} = 0, \bar{z})] = \frac{1}{2} MAX[h_{cerrado}(\bar{r} = 0, \bar{z})]. \quad (3.17)$$

En la Fig. 18 se puede observar como la técnica de imagen substractiva presenta una respuesta impulsional teórica más estrecha, tanto en la dirección transversal como en la axial, con respecto a la del microscopio confocal y, por tanto, una mejor resolución.

Para poder llevar a cabo esta técnica en un microscopio confocal estándar son necesarios dos brazos de colección: uno de los brazos sin *pinhole* y el otro con un *pinhole* de pequeño tamaño. Este proceso requiere de una perfecta alineación entre ambos brazos de colección de tal forma que las señales sus-tráídas correspondan a zonas equivalentes de la muestra.

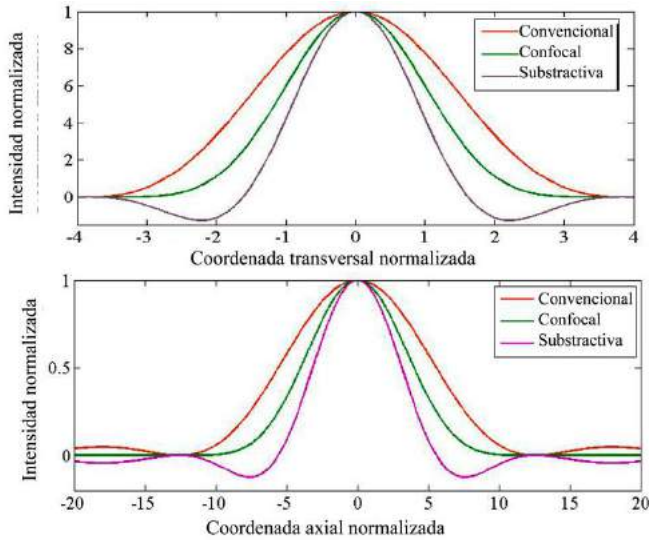


Fig. 18 Representación de la respuesta impulsional en las direcciones transversal y axial para los microscopios convencional y confocal, y las obtenidas mediante la técnica de imagen sus-tráitiva

Sin embargo, con nuestro sistema ambas señales se pueden obtener en paralelo a partir de un único brazo de colección y estando seguros de la perfecta alineación del sistema.

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

Así, para obtener una imagen sustractiva se sigue el siguiente procedimiento:

- En la adquisición se selecciona un número de píxeles activos relativamente grande, a los que llamaremos *pinhole* sintético abierto, y que sería equivalente a la captura sin estenope.
- A partir de este *pinhole* sintético es posible extraer la señal que se obtendría con un *pinhole* cerrado aplicando una máscara de recorte que seleccione un pequeño número de píxeles.
- Para cada posición de barrido se obtienen simultáneamente las señales del *pinhole* sintético abierto y cerrado y, mediante la combinación apropiada de ambas, la señal sustractiva.

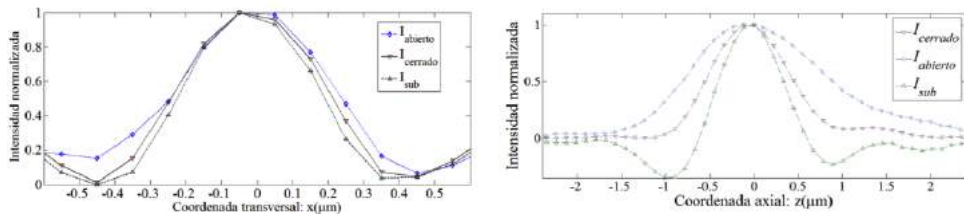


Fig. 19 Medida de la respuesta impulsional mediante barrido transversal de una microesfera de $0.1 \mu\text{m}$ de radio y curvas $V(z)$, para la técnica de imagen confocal sustractiva.

En la Fig. 19 se muestran las medidas experimentales de la respuesta impulsional transversal y axial para los casos: *pinhole* sintético abierto ($I_{abierto}$) formado por 60×60 píxeles activos, *pinhole* sintético cerrado ($I_{cerrado}$) formado por 8×8 píxeles activos, y la correspondiente señal sustractiva (I_{sub}). Al igual que anteriormente, para medir la respuesta impulsional transversal se escaneó una microesfera reflectante mientras que en la dirección axial se realizó el barrido de un espejo plano en la dirección del eje óptico. Como puede verse la respuesta impulsional en ambos casos es sensiblemente más estrecha en la señal sustractiva que en la señal confocal.

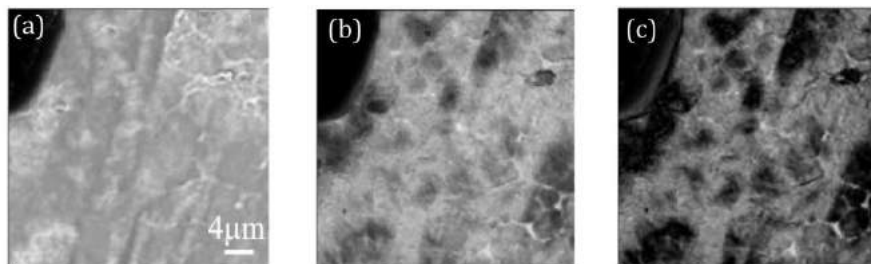


Fig. 20 Imágenes de un corte de piel de cebolla obtenidas con nuestro sistema de imagen confocal sustractiva: (a) *pinhole* sintético abierto; (b) *pinhole* sintético cerrado; y (c) imagen sustractiva resultante.

En la Fig. 20 se muestran imágenes de un corte de piel de cebolla obtenidas con nuestro sistema. Como puede observarse, la calidad visual de la imagen obtenida mediante la sustracción de las señales $I_{abierto}$ e $I_{cerrado}$ ha aumentado notablemente.

Con el fin de obtener un resultado más ilustrativo y para el caso en el que la muestra sea fluorescente, empleamos un objetivo de microscopio cuya NA y aumento son inferiores a las del usado anteriormente, en concreto, $50\times$ $NA=0.55$. Como objeto se emplearon fibras de celulosa tintadas con marcador fluorescente. Se empleó un láser de Ar^+ ($\lambda=514$ nm) y un juego de filtros y espejos dicróicos que bloqueaban la luz proveniente del láser mientras que permitían la transmisión de la luz fluorescente emitida por la muestra. En la Fig. 21 se muestran un corte transversal y uno axial de las imágenes obtenidas para un *pinhole* sintético “abierto”, uno “cerrado” y con la técnica de imagen confocal sustractiva. Nótese que, dado que el paso de barrido ($0.1 \mu\text{m}$) es aproximadamente diez veces menor que el límite en resolución transversal marcado por la difracción para el objetivo de microscopio empleado, en estas imágenes se aprecia un “emborronamiento” notable.

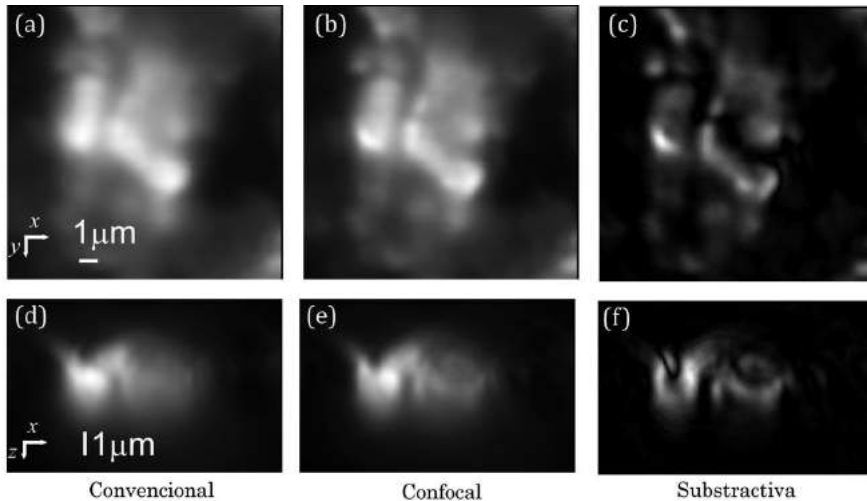


Fig. 21 Comparación de los cortes transversales y axiales de un trozo de celulosa tintada obtenidas con nuestro sistema ($50\times$, $NA=0.55$) para los casos de un *pinhole* sintético abierto (derecha), un *pinhole* sintético cerrado (centro), y la combinación de ambas mediante la técnica de imagen sustractiva (izquierda)

En este caso, además de la mejoría en la resolución transversal, tanto en los cortes transversales como en los axiales se aprecia una notable mejora en la capacidad de seccionado óptico del sistema cuando se obtiene la imagen sustractiva. Para entender mejor este efecto, hemos calculado las transformadas de Fourier de las secciones axiales para los tres casos bajo estudio. Conviene recordar que éstas mostrarán el resultado del filtrado del contenido espectral espacial del objeto original con la OTF del sistema empleado. En el caso de *pinhole* sintético abierto, Fig. 22(a), se observa el efecto del cono de pérdidas de la OTF convencional. La presencia de dicho cono implica que las frecuencias axiales no han sido transmitidas a través del sistema. Por otro lado, en la Fig. 22 (b)-(c), se comprueba que para la técnica sustractiva este cono se ha rellenado con mayor eficiencia que en el caso puramente confocal.

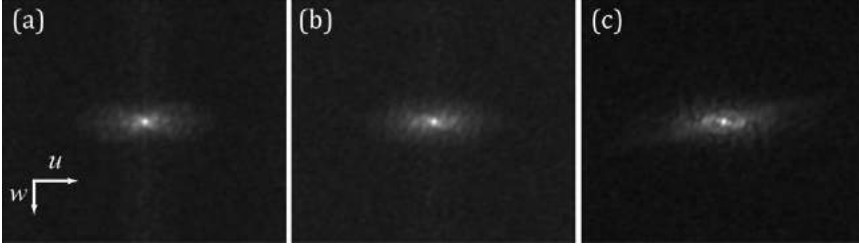


Fig. 22 Transformadas de Fourier (módulo cuadrado) de los cortes axiales mostrados en la Fig. 21 para los casos: (a) *pinhole* sintético abierto; (b) *pinhole* sintético cerrado, y; (c) imagen sustractiva.

El método propuesto ha sido comprobado por distintos grupos tras nuestra propuesta original⁴⁰⁻⁴², se han realizado versiones paralelizadas del mismo⁴³, y se ha probado su aplicación a otras técnicas como SIM⁴⁴ y STED⁴⁵.

3.6. Generalización del método

La técnica de imagen sustractiva es en realidad un caso particular de una combinación de señales obtenidas mediante el muestreo en el plano del detector. Analicemos brevemente a continuación la generalización de nuestra propuesta.

Supongamos que tenemos un CFMS con el que realizamos la imagen de una muestra fluorescente cuya respuesta a la iluminación viene dada por $O(x_s, y_s, z_s)$, donde (x_s, y_s, z_s) son las coordenadas normalizadas que identifican la posición de la muestra para cada paso del barrido del microscopio confocal. La distribución de intensidades que llega a un detector matricial cualquiera, situado en un punto cualquier del espacio imagen del sistema confocal vendrá dada por

$$I_{m,n}(x_s, y_s, z_s) = O(x_s, y_s, z_s) \otimes_3 \left\{ |h_1(x_s, y_s, z_s)|^2 \left\{ |h_2(x_s, y_s, z_s)|^2 \otimes_3 D_{m,n}(x_s, y_s, z_s) \right\} \right\}. \quad (3.18)$$

Si ahora realizamos la suma de las señales detectadas por un cierto número

de elementos del detector matricial contenidos en un rectángulo de $N_x \times N_y$ píxeles, es fácil ver que podemos escribir una nueva distribución de intensidades sintética tal que

$$I_{synth}(x_s, y_s, z_s) = \sum_{m=1}^{N_x} \sum_{n=1}^{N_y} \gamma_{m,n} \cdot O(x_s, y_s, z_s) \otimes_3 \left\{ |h_1(x_s, y_s, z_s)|^2 |h_2(x_s, y_s, z_s)|^2 \otimes_3 D_{m,n}(x_s, y_s, z_s) \right\}, \quad (3.19)$$

donde el parámetro $\gamma_{m,n}$ no es más que el peso otorgado a cada píxel, pudiendo ser dicho valor negativo. Podemos reescribir la ecuación anterior en la forma

$$I_{synth}(x_s, y_s, z_s) = O(x_s, y_s, z_s) \otimes_3 \left\{ |h_1(x_s, y_s, z_s)|^2 |h_2(x_s, y_s, z_s)|^2 \otimes_3 \tilde{D}_{m,n}(x_s, y_s, z_s) \right\}, \quad (3.20)$$

en la cual el detector matricial generalizado vendrá dado por

$$\tilde{D}_{m,n}(x, y, z) = \sum_{m=1}^{N_x} \sum_{n=1}^{N_y} \gamma_{m,n} \cdot \delta \left(x - \left(m - \frac{N_x}{2} \right) \Delta_x, y - \left(n - \frac{N_y}{2} \right) \Delta_y \right) \quad (3.21)$$

A partir de esta formulación general, puede plantearse el estudio de diferentes combinaciones de señales que proporcionan un estrechamiento de la PSF 3D del sistema. Por ejemplo, es fácil ver que el caso de la imagen sustractiva confocal está incluido dentro de este caso general. El estudio detallado de esta generalización no es objeto de esta Tesis doctoral, pero representa una de las vías de desarrollo futuro de las ideas presentadas en este Capítulo.

4. Microscopía por iluminación estructurada

Once you add a computer between the microscope and the human observer, the whole game changes. At that point a microscope is no longer a device that has to generate a directly interpretable image. Now it's a device to record information.

Mats G.L. Gustafsson. www.micropedia.com

Recordemos que, de acuerdo con el análisis presentado en el Capítulo 2, una de las premisas que permiten considerar un microscopio como convencional es que la iluminación sea uniforme en toda la muestra. La microscopía por iluminación estructurada (SIM, del inglés *Structured Illumination Microscopy*) parte de la negación de dicha condición y, como veremos, esto permite mejorar la resolución con respecto a la microscopía convencional así como obtener capacidad de seccionado óptico^{11,46-50}. Como su nombre indica, en la técnica SIM se ilumina la muestra con un patrón estructurado, típicamente, sinusoidal. Como estudiaremos en detalle, de esta forma se consigue codificar en el dominio de las frecuencias espaciales información adicional con respecto a la que proporciona un microscopio convencional. Para poder descodificar dicha información, es necesaria la adquisición de una secuencia de imágenes (cuyo número depende del patrón de iluminación empleado) y aplicar un algoritmo de reconstrucción que combine dichas imágenes.

Cabe distinguir entre dos tipos de SIM. La principal diferencia técnica entre

ambos es que en el primero de ellos se ilumina la muestra mediante la interferencia de ondas planas en el espacio objeto mientras que el segundo se basa en la proyección incoherente (espacial y temporalmente) sobre la muestra de la imagen de una red de difracción unidimensional. En este Trabajo trataremos exclusivamente del primero de ellos, que permite obtener tanto una mejora en resolución como capacidad de seccionado óptico. En el segundo caso, sin embargo, se obtiene exclusivamente seccionado óptico⁵¹. La imagen de la red proyectada posee una cierta extensión axial dentro de la profundidad de foco del objetivo, mientras que en el resto de planos se tiene una intensidad constante. Por medio de un algoritmo sencillo y la captura de tres imágenes, es posible extraer la información de la respuesta fluorescente de la muestra exclusivamente en el interior de la extensión axial de la imagen de la red, confiéndole al sistema capacidad de seccionado óptico.

El tipo de SIM que trataremos a partir de ahora en esta Tesis es bien distinto y, como veremos, se basa en un análisis detallado del dominio de las frecuencias espaciales al proyectar una iluminación periódica sobre la muestra.

4.1. Generación de iluminación estructurada 2D

En esta primera sección estudiaremos el método estándar empleado con el fin de obtener un patrón de iluminación 3D estructurada puramente bidimensional. De hecho, consideraremos la generación de patrones exclusivamente sinusoidales 1D, a pesar de que existen otro tipo de patrones que podrían ser usados⁵².

Para la generación de este tipo de patrones de iluminación estructurada se hace interferir dos ondas planas en el espacio objeto. En teoría, es posible emplear cualquier sistema que produzca tal interferencia, sin embargo en la práctica existen algunas limitaciones como la frecuencia espacial alcanzable y la eficiencia luminosa al proyectar el patrón.

Un método estándar en la producción de un patrón estructurado es el empleo de una red unidimensional iluminada coherentemente por medio de un

haz colimado paralelo al eje óptico. Dicha red genera una serie de ondas planas que viajan con distinto ángulo. Empleando un sistema afocal-telecéntrico formado por un par de lentes (ver Fig. 23) es posible filtrar espacialmente en el plano de Fourier el orden cero de difracción generado por la red. Como únicamente se desea que pasen los dos primeros órdenes de difracción (los órdenes +1 y -1, situados simétricamente con respecto al orden cero), el resto bien se pueden bloquear al mismo tiempo que el orden cero o diseñar la red de tal forma que éstos sean bloqueados por la pupila del objetivo de microscopio empleado en la iluminación. Esto es posible ya que el plano de Fourier del sistema $4f$ esta conjugado con el plano de la pupila del objetivo de microscopio.

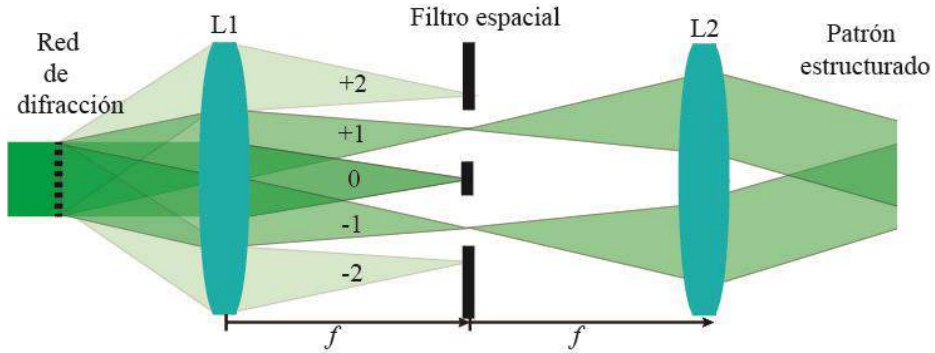


Fig. 23 Esquema de la generación de iluminación estructurada por medio de una red de difracción unidimensional.

Consideremos pues el caso en el que tenemos una cierta red periódica unidimensional. La transmitancia en amplitud de dicha red se podrá expresar como la suma de infinitas ondas planas, en la forma

$$R(\mathbf{x}) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} C_n \exp\left[\frac{i2\pi n}{p} x\right] \quad (4.1)$$

siendo C_n los coeficientes de peso para cada uno de los órdenes de la red y p el periodo de la misma. En el plano de Fourier tendremos pues

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

$$\tilde{R}(\mathbf{x}) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} c_n \delta\left(\frac{x}{\lambda f_1} - \frac{p}{n}\right). \quad (4.2)$$

Como hemos dicho, en este plano se filtra de tal forma que nos quedamos exclusivamente con los órdenes +1 y -1. En un plano inmediatamente posterior al plano de Fourier el campo resultante podrá expresarse como

$$\tilde{R}_F(\mathbf{x}) = c_{+1} \delta(x - \lambda f_1 p) + c_{-1} \delta(x + \lambda f_1 p). \quad (4.3)$$

En el plano imagen del sistema la distribución compleja de amplitudes del campo generado por la red, suponiendo que se cumple que $c_{+1} = c_{-1}$ y omitiendo factores irrelevantes, podrá expresarse como

$$U'(\mathbf{x}) = \exp\left[i2\pi \frac{M'}{p} x\right] + \exp\left[-i2\pi \frac{M'}{p} x\right], \quad (4.4)$$

donde $M' = -f_2/f_1$ es el aumento del sistema afocal-telecéntrico. La ecuación anterior puede reescribirse como

$$U'(\mathbf{x}) = 2 \cos\left(2\pi \frac{M'}{p} x\right). \quad (4.5)$$

Por tanto, con este tipo de iluminación conseguimos proyectar sobre la muestra el patrón estructurado deseado. Como vemos, la frecuencia espacial generada en el espacio objeto del sistema de colección (o el espacio imagen del sistema de iluminación) depende exclusivamente del periodo de la red y del aumento del sistema empleado en la iluminación. Por simplicidad consideraremos que la segunda lente de este sistema (L2) no es más que el objetivo de microscopio empleado en la colección de tal forma que los órdenes de difracción generados por la red se filtran en el plano de la pupila del objetivo de microscopio.

Basándose en el mismo principio y en un esquema prácticamente idéntico, existe la posibilidad de emplear un modulador espacial de luz en lugar de una red de difracción⁵³. Mediante éste se simula una red de difracción pero con la ventaja de poder hacer rotaciones y traslaciones de la misma sin necesidad de

introducir ningún elemento mecánico en el sistema. A su vez, permite tener una cierta flexibilidad a la hora de elegir la frecuencia espacial del patrón. Aun así, existen ciertas desventajas en el empleo de moduladores espaciales de luz para generar iluminación estructurada debidas, en gran medida, al pixelado de los mismos. Esto supone que en la práctica aparezcan de nuevos órdenes de difracción y que no exista una total flexibilidad del patrón, tanto a la hora de seleccionar su frecuencia espacial como cuando realizan traslaciones o rotaciones del mismo.

4.2. Respuesta del sistema al patrón estructurado

A continuación estudiaremos el caso en el cual tenemos una muestra fluorescente 3D que responde a la iluminación generada en la sección anterior y la luz emitida por esta es recogida por un objetivo de microscopio tal como se muestra en la Fig. 24. Como por simplicidad consideramos que los órdenes de difracción se filtran en el plano de la pupila, debemos suponer que el filtrado del orden cero se produce únicamente en la iluminación. Para ello podemos considerar que el filtro empleado es cromático, es decir, que bloquea el orden cero de la red en el proceso de iluminación pero permite que toda la luz generada por la muestra lo atraviese. De esta forma, la respuesta de la muestra a la iluminación, si ésta posee una distribución de fluoroforos $O(\mathbf{x},z)$, podrá expresarse en la forma

$$I_{ill}(\mathbf{x},z) = S(\mathbf{x})O(\mathbf{x},z), \quad (4.6)$$

donde se han omitido factores constantes y siendo

$$S(\mathbf{x}) = \left| \cos \left(2\pi \frac{M'}{p} \right) \right|^2 = 2[1 + \cos(2\pi Ax)], \quad (4.7)$$

con $A = 2M'/p$. Si ahora se realiza la imagen de I_{ill} por medio de un sistema afocal-telecentrico, la distribución de intensidades 3D en el espacio imagen vendrá dada por

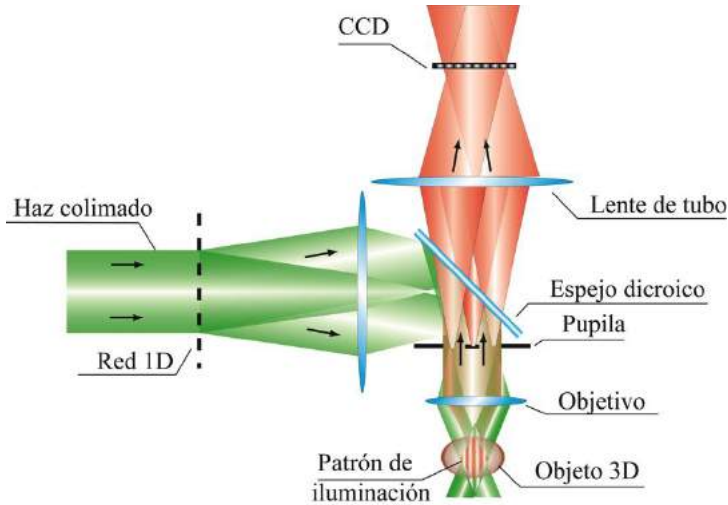


Fig. 24 Esquema de un SIM en el que se emplea una red de difracción unidimensional para generar el patrón de iluminación sobre la muestra.

$$I(\mathbf{x}, z) = \left\{ S\left(\frac{\mathbf{x}}{M}\right) O\left(\frac{\mathbf{x}}{M}, \frac{z}{M^2}\right) \right\} \otimes_3 h_{mc}(\mathbf{x}, z). \quad (4.8)$$

Para poder comprender cuál es el efecto del patrón de iluminación estructurada en la formación de imágenes, es preciso realizar la transformada de Fourier de la distribución de intensidades expresada en la ecuación anterior. El espectro de frecuencias espaciales de dicha distribución será

$$\tilde{I}(\mathbf{u}, w) = \left\{ \tilde{S}(M\mathbf{u}) \otimes_3 \tilde{O}(M\mathbf{u}, M^2w) \right\} H(\mathbf{u}, w). \quad (4.9)$$

Nótese que la ecuación anterior define un caso general. Si el patrón de iluminación $S(\mathbf{x})$ es uniforme, su transformada de Fourier será una delta de Dirac situada en el origen de las frecuencias espaciales, es decir, no tendrá ningún efecto sobre el espectro de frecuencias espaciales del objeto siendo por tanto el sistema un microscopio convencional. Sin embargo, bajo iluminación estructurada, tendremos que

$$\tilde{I}(\mathbf{u}, w) = \left\{ \left[\delta(\mathbf{u}) + \frac{1}{2} \left[\delta\left(u + \frac{A}{M}, v, m\right) + \delta\left(u - \frac{A}{M}, v, m\right) \right] \right] \otimes_3 \tilde{O}(M\mathbf{u}, M^2w) \right\} H(\mathbf{u}, w) \quad (4.10)$$

Resulta claro ver de la ecuación anterior que al iluminar la muestra con un patrón de iluminación estructurada sinusoidal estamos introduciendo información nueva dentro del soporte finito de la OTF3D: aparece una réplica del espectro objeto centrada en el origen de las frecuencias espaciales (como la que tendríamos en un microscopio convencional) y dos nuevas réplicas separadas simétricamente con respecto al origen una distancia que, en última instancia, depende del período de la red empleada. Con el fin de aligerar la notación haremos la siguiente denominación para las componentes de Fourier generadas a partir de la iluminación estructurada

$$\begin{aligned} F_{-1}(\mathbf{u}, w) &= \tilde{O}\left(u - \frac{A}{M}, v, w\right) H(\mathbf{u}, w), \\ F_0(\mathbf{u}, w) &= \tilde{O}(u, v, w) H(\mathbf{u}, w), \\ F_{+1}(\mathbf{u}, w) &= \tilde{O}\left(u + \frac{A}{M}, v, w\right) H(\mathbf{u}, w). \end{aligned} \quad (4.11)$$

Tenemos, por tanto, tres componentes en Fourier que contienen información distinta del espectro del objeto. Para poder separarlas, como veremos, es necesario encontrar un parámetro que varíe dichas componentes con el fin de poder formar un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas.

4.3. Descomposición de las componentes

El problema planteado en la sección anterior encuentra su solución en las técnicas de corrimiento de fase. Supongamos que añadimos al sistema un elemento que nos permite variar la fase del patrón sinusoidal de manera controlada de forma que tenemos que la iluminación puede expresarse como

$$S_i(\mathbf{x}) = 1 + \cos(2\pi A x + \phi_i + \phi_0) \quad (4.12)$$

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

donde ϕ_i es la fase controlada y ϕ_0 define la fase inicial del patrón. Es directo ver que, en el espacio imagen, la distribución de intensidades 3D debida a la interacción entre el patrón y la muestra puede escribirse en la forma

$$\tilde{I}_i(\mathbf{u}, w) = F_0(\mathbf{u}, w) + \frac{1}{2} \left(F_{+1}(\mathbf{u}, w) e^{i(\phi_i + \phi_0)} + F_{-1}(\mathbf{u}, w) e^{-i(\phi_i + \phi_0)} \right). \quad (4.13)$$

Mantengamos en mente que, cuando realizamos una captura mediante el sistema que muestra la Fig. 24, simplemente realizando un corrimiento de fase del patrón tenemos acceso a distintas distribuciones de intensidad I_i y lo que deseamos es aislar las distintas componentes generadas en el espacio de Fourier por medio de la iluminación estructurada. Supongamos que $\phi_0 = 0$ y que además realizamos 3 desplazamientos de fase equidistantes de tal manera que los podemos escribir como $\phi_1 = -\phi$, $\phi_2 = 0$, $\phi_3 = \phi$. Bajo estas condiciones el sistema de ecuaciones formado a partir de la Ec.(4.13) con los distintos desplazamientos puede escribirse como

$$\begin{aligned} \tilde{I}_1(\mathbf{u}, w) &= F_0(\mathbf{u}, w) + e^{i\phi}/2 F_{+1}(\mathbf{u}, w) + e^{-i\phi}/2 F_{-1}(\mathbf{u}, w), \\ \tilde{I}_2(\mathbf{u}, w) &= F_0(\mathbf{u}, w) + 1/2 F_{+1}(\mathbf{u}, w) + 1/2 F_{-1}(\mathbf{u}, w), \\ \tilde{I}_3(\mathbf{u}, w) &= F_0(\mathbf{u}, w) + e^{-i\phi}/2 F_{+1}(\mathbf{u}, w) + e^{i\phi}/2 F_{-1}(\mathbf{u}, w). \end{aligned} \quad (4.14)$$

Podemos encontrar las soluciones al sistema aplicando la regla de Cramer. Para ello, en primer lugar calculamos el determinante de la matriz formado a partir del sistema de ecuaciones

$$\begin{vmatrix} 1 & e^{i\phi}/2 & e^{-i\phi}/2 \\ 1 & 1/2 & 1/2 \\ 1 & e^{-i\phi}/2 & e^{i\phi}/2 \end{vmatrix} = i(\sin \phi \cos \phi - \sin \phi). \quad (4.15)$$

Para que el sistema sea linealmente independiente, el determinante anterior debe ser distinto de cero. Con ello, encontramos que $\phi \neq 0, \pi$. Para cualquier otro valor de ϕ existe la siguiente solución al sistema de ecuaciones

$$\begin{aligned}
 F_0(\mathbf{u}, w) &= \frac{2\tilde{I}_2(\mathbf{u}, w) - \tilde{I}_3(\mathbf{u}, w) - \tilde{I}_1(\mathbf{u}, w)}{\cos\phi - 1}, \\
 F_{-1}(\mathbf{u}, w) &= \frac{-2i \sin\phi \tilde{I}_2(\mathbf{u}, w) + (e^{i\phi} - 1)\tilde{I}_3(\mathbf{u}, w) - (e^{-i\phi} - 1)\tilde{I}_1(\mathbf{u}, w)}{2i \sin\phi (\cos\phi - 1)}, \\
 F_{+1}(\mathbf{u}, w) &= \frac{-2i \sin\phi \tilde{I}_2(\mathbf{u}, w) + (1 - e^{-i\phi})\tilde{I}_3(\mathbf{u}, w) - (e^{i\phi} - 1)\tilde{I}_1(\mathbf{u}, w)}{2i \sin\phi (\cos\phi - 1)}.
 \end{aligned} \tag{4.16}$$

Particularicemos, por ejemplo, para $\phi = \pi/2$.

$$\begin{aligned}
 F_0(\mathbf{u}, w) &= \tilde{I}_3(\mathbf{u}, w) + \tilde{I}_1(\mathbf{u}, w), \\
 F_{-1}(\mathbf{u}, w) &= i/2 \{ (i+1)\tilde{I}_1(\mathbf{u}, w) - 2i\tilde{I}_2(\mathbf{u}, w) - (1-i)\tilde{I}_3(\mathbf{u}, w) \}, \\
 F_{+1}(\mathbf{u}, w) &= i/2 \{ (1-i)\tilde{I}_1(\mathbf{u}, w) + 2i\tilde{I}_2(\mathbf{u}, w) - (1+i)\tilde{I}_3(\mathbf{u}, w) \}.
 \end{aligned} \tag{4.17}$$

Es posible demostrar⁵⁴ que la transformada de Fourier de estas soluciones viene dada por

$$\begin{aligned}
 \tilde{F}_0(\mathbf{x}, z) &= O(\mathbf{x}, z) \otimes_3 h_{inc}(\mathbf{x}, z), \\
 \tilde{F}_{\pm 1}(\mathbf{x}, z) &= \left\{ O(\mathbf{x}, z) \exp[\mp i 2\pi \bar{A}x] \right\} \otimes_3 h_{inc}(\mathbf{x}, z).
 \end{aligned} \tag{4.18}$$

siendo \bar{A} la frecuencia espacial del patrón en el espacio imagen. Como vemos, la componente F_0 da como resultado una información espacial que es la misma que tendríamos si el sistema fuera convencional. Por otro lado, las otras dos componentes en el espacio real aparecen afectadas por un factor de fase lineal. Si bien en el espacio real este hecho no parece importante, dicho factor es una delta de Dirac en el dominio de las frecuencias espaciales que desplaza el espectro del objeto con respecto al soporte de la OTF.

Tenemos por tanto tres imágenes que se corresponden con cada una de las componentes generadas por la iluminación estructurada en el espacio de Fourier. Como vemos, cada una de ellas se puede expresar como una distribución de intensidades convolucionada con la PSF3D de un sistema convencional y, por lo tanto, dichas imágenes estrictamente son LSI3D. Teniendo esto en

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

cuenta, siempre que realicemos operaciones lineales con dichas imágenes el resultado final podrá ser expresado nuevamente como un sistema LSI3D.

El siguiente paso que debemos de realizar para obtener la imagen final es recolocar las componentes generadas por la iluminación estructurada a su posición natural, esto es, compensar el desplazamiento del espectro introducido por la iluminación. Si bien esto es directo, en la práctica existen otra serie de problemas que analizaremos en la siguiente sección. De momento, digamos que podemos componer los distintos espectros de manera que

$$\tilde{I}(\mathbf{u}, w) = \tilde{O}(\mathbf{u}, w) H_{SI}(\mathbf{u}, w), \quad (4.19)$$

siendo

$$H_{SI}(\mathbf{u}, w) = K_0 H(\mathbf{u}, w) + K_1 H(\mathbf{u} - \bar{A}, v, w) + K_{-1} H(\mathbf{u} + \bar{A}, v, w), \quad (4.20)$$

la OTF final del sistema de iluminación estructurada y K_i el peso dado a cada una de las componentes. Típicamente serán tales que $K_1 = K_{-1}$. Los resultados para un peso que compensa el proceso físico (es decir, $K_0=1$ y $K_1=2$) se muestran en la Fig. 25. Como vemos, dependiendo de la frecuencia del patrón es posible obtener capacidad de seccionado óptico (ya que las componentes +1 y -1 permiten llenar el cono de pérdidas) con un aumento en la resolución en un factor 1.5 (paneles (a) y (b)) o bien mejorar la resolución en un factor 2 (paneles (c) y (d)).

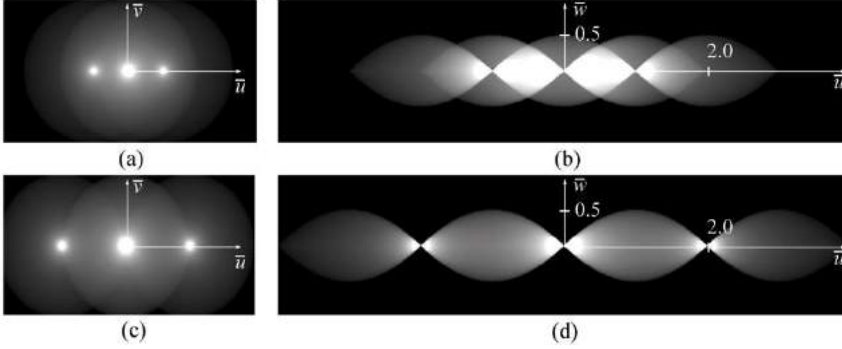


Fig. 25 Cortes transversales (a), (c) y meridionales (b),(d) de la OTF3D sintética generada mediante un sistema de iluminación estructurada para los casos en los que la frecuencia espacial del patrón optimiza el seccionado óptico y la mejora en resolución, respectivamente.

4.4. Composición de la imagen sintética a partir de las componentes de Fourier de la iluminación estructurada

Aunque en teoría el proceso de recolocar las componentes obtenidas de las soluciones de la Ec.(4.17) es simple, como veremos éste requiere del uso de algunas técnicas de procesamiento digital de imágenes para poder obtener unos resultados óptimos. En principio, una vez aisladas las componentes el siguiente paso sería recolocarlas a la que es su posición “natural”. Para ello, podemos considerar la convolución de las distintas soluciones con una delta de Dirac que compense el desplazamiento de forma que

$$\tilde{O}'_{synth}(\mathbf{u}, w) = F_0(\mathbf{u}, w) + 2\left(F_1(\mathbf{u}, w) \otimes_2 \delta(\mathbf{u} - \bar{A}, v, w) + F_{-1}(\mathbf{u}, w) \otimes_2 \delta(\mathbf{u} + \bar{A}, v, w)\right), \quad (4.21)$$

que podemos reescribir en la forma

$$\tilde{O}'_{synth}(\mathbf{u}, w) = \sum_{r=-1}^1 (r^2 + 1) F_r(\mathbf{u}, w) \otimes_2 \delta(\mathbf{u} - r\bar{A}, v, w). \quad (4.22)$$

Sin embargo, esta forma sencilla de composición presenta una serie de inconvenientes. En primer lugar, dado que la OTF no es una función uniforme,

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

al recomponer el espectro con la Ec.(4.22) la OTF sintética presenta “tres picos” que se convierten en una modulación residual al realizar la transformación de Fourier de la misma para obtener la distribución de intensidades imagen. Además, si el patrón de iluminación no es ideal si no que tiene un contraste menor a uno, llamémosle m , dicho contraste deberá ser compensado para que las componentes +1 y -1 pesen lo mismo que el orden cero. Debemos hacer notar que esto sucederá siempre, es decir, dado que estamos realizando la imagen de un patrón cosenoidal cuya frecuencia espacial toma dos valores (la mitad de la frecuencia espacial de corte del sistema de colección o un valor cercano a dicha frecuencia) especialmente para patrones de alta frecuencia espacial el contraste será muy bajo debido al peso de la OTF2D del sistema.

Para solucionar el primero de los problemas se aplica un filtrado de Wiener con una OTF2D (que puede ser medida en el mejor de los casos o, bien, simulada), de forma que se realiza una especie de desconvolución 2D del espectro para cada una de las componentes. Dependiendo del valor otorgado al parámetro de Wiener p , se podrá compensar en mayor o menor medida la forma de la OTF2D del sistema. El caso ideal es aquel en el que la forma final de la función de transferencia tras la aplicación del filtro es plana para todas las componentes. Debe decirse que la estimación del parámetro de Wiener que produce dicha compensación ideal no es sencilla: si bien se han intentado buscar algoritmos que lo detecten automáticamente a partir de la relación señal ruido de la imagen final⁵⁵, dichos algoritmos son demasiado sensibles a posibles errores en la estimación de la fase por lo que en muchos casos prácticos el valor del parámetro se estima visualmente, variándolo directamente “a mano”^{11,56}. Por otro lado, para obtener un peso correcto de las distintas componentes de la iluminación estructurada se puede proceder de diversas formas. Es posible calcular el contraste del patrón por medio de la relación entre los órdenes para cada posición si bien lo más sencillo es realizar una renormalización de las componentes en el espacio de Fourier de tal manera que su peso promedio sea el mismo. Suponiendo que se realiza convenientemente este segundo método, llamaremos $F_i^p(\mathbf{u}, w)$ a las distintas componentes de la ilu-

minación estructurada cuyo peso promedio es el mismo. Sobre dichas componentes, además, se realiza un filtrado con un círculo cuyo radio coincide con el de la OTF para eliminar todo aquel ruido que no provenga del espectro de la imagen, es decir

$$\bar{F}_i(\mathbf{u}, w) = F_i^p(\mathbf{u}, w) \text{circ}\left(\frac{|\mathbf{u}|}{u_0}\right). \quad (4.23)$$

De esta forma, podemos escribir el proceso de reconstrucción como

$$\hat{O}'_{synth}(\mathbf{u}, w) = \sum_{r=-1}^1 \frac{\hat{H}^*(\mathbf{u}) \bar{F}_r(\mathbf{u}, w)}{|\hat{H}(\mathbf{u})|^2 + p^2} \otimes_2 \delta(\mathbf{u} - r\bar{A}, v, w), \quad (4.24)$$

siendo $\hat{H}(\mathbf{u})$ una medida o bien una estimación de la OTF 2D del sistema y, por tanto, $\hat{O}'_{synth}(\mathbf{u}, w)$ será una estimación del espectro de la imagen cuya función de transferencia 2D se ve extendida una cantidad que depende de A con respecto al espectro que tendríamos en un microscopio convencional. En el caso de emplear una OTF2D simulada, el cálculo de la misma se puede realizar empleando la Ec.(2.59), simplemente eligiendo el valor adecuado para su radio de tal forma que coincida con el experimental.

En este punto hemos de realizar una apreciación muy importante. Si bien la función $\hat{H}(\mathbf{u})$ es puramente bidimensional, cada una de las componentes obtenidas a partir de la iluminación estructurada, $\bar{F}_r(\mathbf{u}, w)$, posee además información de las frecuencias espaciales en la dirección axial. Este hecho supone una de las mayores limitaciones a la hora de implementar un microscopio SIM 2D ya que, según este razonamiento, solo podríamos emplearla para muestras cuyo grosor sea delgado con respecto a la profundidad de foco del objetivo empleado (típicamente del orden de la decena de micras para NA de 0.2, e inferiores a $0.2 \mu\text{m}$ para objetivos cuya NA sea mayor a 0.9). Vemos pues una clara limitación del sistema en cuanto a su flexibilidad de uso. Sin embargo en muestras poco dispersivas (como microesferas fluorescentes o las estructuras filamentosas de composición proteínica del citoesqueleto de las

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

células eucariotas) es posible despreciar en cierta medida el efecto que tienen los planos fuera de foco con respecto al plano de la imagen la cual aparece típicamente bien contrastada.

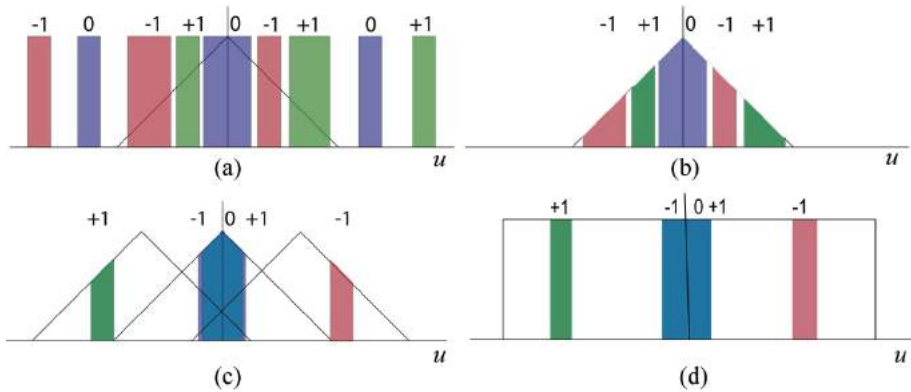


Fig. 26 Representación del método de composición del espectro en un microscopio SIM dado por la Ec.(4.24).

Para poder entender mejor el proceso arriba detallado, veamos una representación del mismo mostrado en la Fig. 26. Supongamos que tenemos una muestra tal que al interactuar con la iluminación estructurada se produce un espectro como el del panel (a). Si la frecuencia espacial del patrón tiene un valor próximo a la frecuencia espacial de corte del sistema de colección, una gran parte del espectro generado no será transmitido tras la acción de la OTF 2D del microscopio. Sin embargo, como puede observarse en el panel (b) la acción de la iluminación estructurada introduce frecuencias espaciales (etiquetadas como +1 y -1) dentro del soporte de la OTF que para el caso convencional (etiquetado como 0) no se conseguían resolver. Si realizamos la descomposición de los órdenes y relocalamos directamente dichas componentes a su posición natural se obtendría un espectro cuya forma sería la mostrada en el panel (c). La forma de la función de transferencia resultante posee tres máximos claramente marcados que harán que su transformada de Fourier tenga un patrón cosenoidal residual. A fin de compensar dicho efecto indeseado (panel

(d)) se realiza un filtrado de Wiener a modo de desconvolución para obtener una función de transferencia sintética plana.

Aunque en rigor no es necesario, típicamente se suele añadir un tercer filtro al espectro de la Ec.(4.24). A pesar de que idealmente tener una respuesta plana del sistema permite que las frecuencias espaciales altas tengan una mayor visibilidad en la imagen final, en la práctica éstas contienen gran cantidad de ruido y artefactos que pueden provenir de diversas fuentes (del ruido electrónico de la cámara, de una mala estimación de la fase del patrón, o incluso del propio algoritmo de reconstrucción). Para evitar el excesivo peso de dichos artefactos lo que se hace es pesar el espectro resultante de la Ec.(4.24) con una forma triangular o de OTF 2D, $P(\mathbf{u})$, cuyo radio será igual a la extensión total del soporte compacto producido por la iluminación estructurada. Incluyendo este tercer filtrado, el espectro resultante del proceso de reconstrucción será

$$\hat{O}'_{synth}(\mathbf{u}, w) = P(\mathbf{u}) \left\{ \sum_{r=-1}^1 \frac{\hat{H}^*(\mathbf{u}) \bar{F}_r(\mathbf{u}, w)_r}{|\hat{H}(\mathbf{u})|^2 + p^2} \otimes_2 \delta(\mathbf{u} - r\bar{A}, v, w) \right\}, \quad (4.25)$$

donde en el caso de realizar el filtro de Wiener mediante una OTF simulada tendremos que $P(\mathbf{u}) = \hat{H}(\mathbf{u}/A)$. Hemos de decir que este último filtro permite que el microscopio SIM, al final de todo el proceso de reconstrucción, posea las características típicas de la formación de imágenes incoherente. Una representación de la acción de dicho filtro se presenta en la Fig. 27.

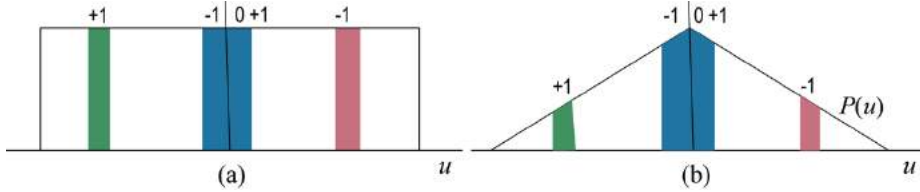


Fig. 27 Aplicación de un filtro con tal que la forma final del espectro reconstruido mediante SIM presente una función de transferencia sintética 2D que puede interpretarse como una OTF.

4.5. Generalización para cualquier ángulo del patrón

Hasta ahora hemos considerado que el patrón de iluminación se proyecta únicamente en una dirección. Sin embargo, esto implica que la mejora en resolución sólo se produce en la dirección de variación del patrón cosenoidal. De esta forma la PSF sintética obtenida tras el proceso de reconstrucción es anisótropa produciéndose un efecto parecido al del astigmatismo. Para conseguir una PSF aproximadamente isótropa transversalmente se debe proyectar el patrón para al menos tres ángulos distintos (con rotaciones relativas de -60° , 0° y 60°). Si contemplamos la posibilidad de rotar el patrón, la forma del mismo se podrá expresar como

$$S_i^j(\mathbf{x}) = 2 \left[1 + \cos(2\pi \mathbf{A}^j \cdot \mathbf{x} + \phi_i) \right], \quad (4.26)$$

siendo \mathbf{A} un vector que incluye la información del ángulo de rotación y de la frecuencia espacial de la iluminación estructurada. Consideremos un caso general en el que se rota el patrón un número N de veces. Si se toman tres imágenes por ángulo del patrón con corrimientos relativos de fase entre las mismas tales que permiten la descomposición de los órdenes de la iluminación estructurada, $F_r^j(\mathbf{u}, w)$, es fácil ver que el proceso de reconstrucción dado por la Ec.(4.24) se puede ahora expresar como

$$\hat{O}'_{synth}(\mathbf{u}, w) = P(\mathbf{u}) \left\{ \sum_{j=1}^N \sum_{r=-1}^1 \frac{\hat{H}^*(\mathbf{u}) \bar{F}_r^j(\mathbf{u}, w)_r}{|\hat{H}(\mathbf{u})|^2 + p^2} \otimes_2 \delta(\mathbf{u} - r\mathbf{A}^j) \right\}. \quad (4.27)$$

Como hemos dicho, típicamente se toma $N=3$, pero podríamos realizar el proceso para un número mayor o menor de rotaciones.

4.6. Software de reconstrucción

A pesar de que el proceso de reconstrucción en teoría es relativamente sencillo, existen una serie de problemas prácticos a la hora de implementar dicho proceso. En esta sección veremos un software de reconstrucción que hemos desarrollado en la plataforma LabVIEW[®], que incluye diferentes métodos de procesado digital de imágenes con el fin de obtener reconstrucciones de calidad. Para demostrar el funcionamiento del software emplearemos unas imágenes proporcionadas por el Prof. Michael Shaw (*National Physical Laboratory*, Londres) capturadas mediante un montaje SIM que emplea un modulador espacial de luz para generar el patrón de iluminación a partir de la colimación de un láser de zafiro ($\lambda=488$ nm). Las imágenes obtenidas mediante un objetivo de inmersión en aceite $60\times$ y $NA=1.40$ fueron capturadas empleando una cámara Sci-CMOS (*Hamamatsu ORCA-Flash4.0*). La muestra es un cúmulo de microesferas (*Polysciences Fluoresbrite YG Carboxylate beads*) de 110 nm de diámetro medio. Como es de esperar, al realizar la imagen empleando la microscopía convencional dichas esferas no son resueltas por el sistema ya que, para el objetivo de microscopio empleado, la resolución transversal es del orden de 200 nm. El sistema se ajustó de tal forma que la frecuencia espacial del patrón de iluminación estructurada es aproximadamente la frecuencia de corte del objetivo de microscopio empleado. Tanto la rotación del patrón como el corrimiento de fase se realizaron mediante la proyección de distintos patrones en el modulador espacial de luz. Se tomaron 9 imágenes, 3 por ángulo del patrón, con un corrimiento relativo de fase de $2\pi/3$. Las imágenes correspondientes a los distintos ángulos del patrón se muestran en la Fig. 28.

Para garantizar que la frecuencia espacial del patrón es la correspondiente se debe analizar la transformada de Fourier de las distintas imágenes elemen-

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

tales. Un efecto bien conocido al realizar transformadas de Fourier discretas de imágenes bidimensionales es que éstas presentan la transformada de Fourier de la imagen convolucionada con la correspondiente a la ventana que delimita el campo de observación. Dado que vamos a trabajar con dichas transformadas componiendo una cierta combinación de las mismas, es crucial minimizar este efecto. Para ello multiplicamos cada imagen por lo que se conoce como una “campana cosenoidal”. Ésta no es más que una función que mantiene su valor prácticamente constante en toda la imagen pero que decae de manera relativamente suave a cero en los bordes. De esta forma se consigue reducir el efecto de los bordes en la transformada de Fourier discreta, haciendo que la función con la que se convoluciona el espectro de la imagen sea una función suavizada con respecto a la que se tiene cuando la ventana es un rectángulo.

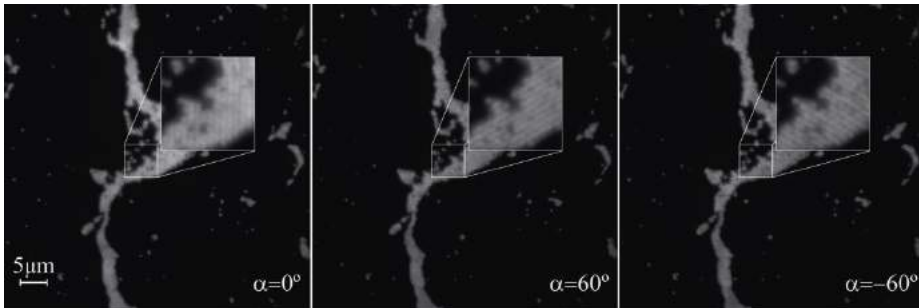


Fig. 28 Imágenes obtenidas mediante un objetivo 60x $NA=1.4$ de microesferas fluorescentes de 100 nm de diámetro medio para distintos ángulos del patrón de iluminación estructurada.

En la Fig. 29 se muestran las transformadas de Fourier de las imágenes presentadas en la Fig. 28. En ellas, podemos distinguir el soporte de la OTF así como los órdenes generados por la iluminación estructurada. El primer paso en nuestro algoritmo de reconstrucción será medir dicho soporte para emplear un filtro circular binario sobre la transformada de Fourier. Con ello, sólo conservaremos la información relevante del espectro y eliminaremos parte del ruido presente en las imágenes. Hecho esto, debemos proceder a descomponer

los órdenes generados por la iluminación estructurada a partir de la combinación lineal de imágenes (o de sus transformadas de Fourier) dada por la Ec.(4.16). Como vimos, dicha combinación dependerá del valor elegido para el corrimiento de fase relativo entre las 3 imágenes elementales correspondientes a los distintos ángulos. Dependiendo del procedimiento experimental que hayamos seguido durante la captura de las mismas se debe actuar de distinta forma. Si bien la más sencilla es calibrar el sistema de forma que el corrimiento de fase sea conocido y siempre el mismo para los distintos ángulos, esta manera de proceder puede generar “artefactos” en la reconstrucción final si la calibración no es perfecta. Por ello existen algunos algoritmos alternativos que tratan de estimar dicho corrimiento de fase para cada dirección del patrón con la mayor precisión posible⁵⁷.

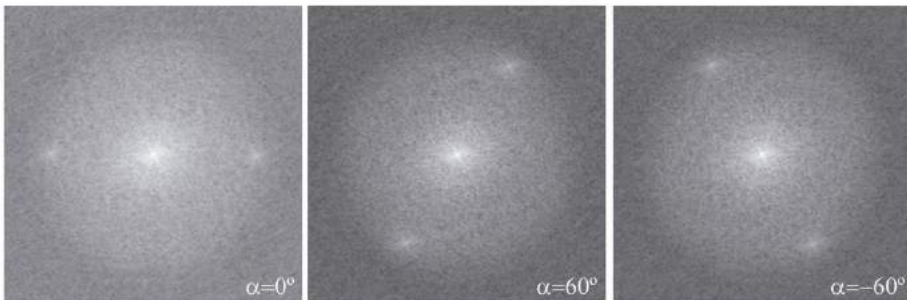


Fig. 29 Transformadas de Fourier de imágenes correspondientes a distintos ángulos del patrón de iluminación estructurada.

En este caso, conocemos el corrimiento de fase entre las distintas imágenes elementales, si bien en la práctica podría no ser el valor exacto. Al realizar la descomposición se obtienen cada uno de los órdenes, con su correspondiente filtro circular. Como vimos en el desarrollo teórico de las secciones anteriores, estos órdenes aparecen desplazados con respecto a la que debería ser su posición “natural” (ver Fig. 30).

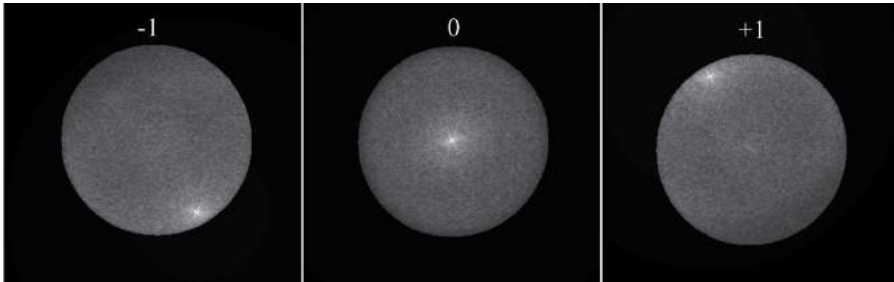


Fig. 30 Descomposición de los órdenes de iluminación estructurada para el valor $\alpha=-60^\circ$.

Nuevamente, existen diferentes formas para recolocar las componentes a su posición natural. Por un lado, puede calibrarse el sistema de forma que conozcamos la frecuencia espacial del patrón en nuestro espacio de Fourier y su ángulo. Sin embargo, esta manera de recolocar las componentes introduce gran cantidad de errores en la imagen final dado que cualquier pequeña variación en el posicionamiento las mismas cambia por completo el aspecto de la imagen reconstruida. Por ello, pueden emplearse algoritmos de correlación de tal forma que se localizan las partes comunes del espectro de cada una de las componentes, detectando el desplazamiento relativo entre ellas y compensándolo⁵⁸. Este proceso requiere de un tiempo de cálculo relativamente grande de manera que, sumado al resto de cálculos y al tiempo de captura, hace que el proceso de reconstrucción de una única imagen con mejora en la resolución mediante iluminación estructurada será realmente lento. Además, supone una gran carga en memoria ya que se deben añadir seis nuevas variables a las ya existentes (una por orden desplazado). Si tenemos en cuenta que para hacer cada una de las correlaciones se deben emplear dos transformadas de Fourier, tenemos un total de doce transformadas de Fourier extra para la realización del algoritmo.

En nuestro caso, presentamos un algoritmo alternativo cuya aplicación no requiere introducir más variables de las ya existentes al tiempo que presenta un funcionamiento óptimo⁵⁹. Recordemos que, para optimizar la mejora en resolución del sistema así como evitar los artefactos generados por la forma de la OTF convencional al componer la OTF sintética debemos emplear un

filtro de Wiener para compensar la forma de la primera. Para obtener los resultados más precisos posibles, la OTF del microscopio convencional debería ser medida con precisión para compensar su forma exacta. A pesar de ello, podemos considerar que su forma es la ideal y emplear una versión simulada de la misma para realizar el filtrado de Wiener. Lógicamente la forma de la OTF no depende de la muestra empleada y, por ello, el cálculo de la misma no supone un consumo de tiempo en el proceso de reconstrucción (ya que la simulación se realiza previamente en función de los parámetros del sistema).

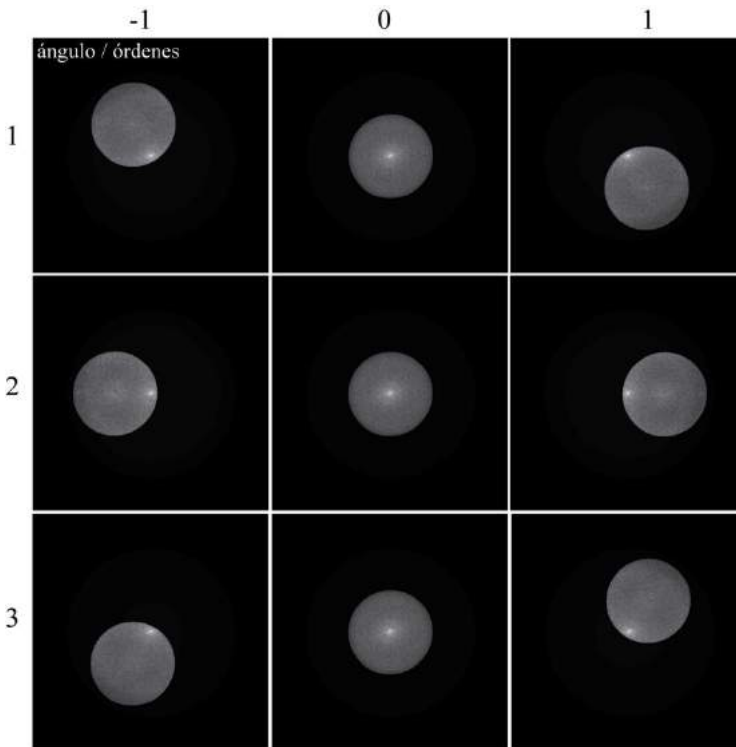


Fig. 31 Descomposición de los órdenes generados por la iluminación estructurada para los distintos ángulos del patrón.

Aprovechando la OTF simulada realizamos el siguiente proceso para la de-

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

tección de la frecuencia espacial y del ángulo del patrón estructurado. Tras calcular las transformadas de Fourier de todas las imágenes elementales, tomamos una de ellas por cada dirección del patrón. Aplicamos sobre las mismas un filtro de Wiener pesado de manera que compense la forma de la OTF del sistema, es decir, cuyo parámetro de Wiener haga que la respuesta del sistema en el dominio frecuencial sea aproximadamente plana. De esta forma, se le da un peso mayor a las altas frecuencias dentro del soporte compacto de la OTF. En la Fig. 32 hemos representado los perfiles de la transformada de Fourier resultante tras este proceso para distintos valores del parámetro de Wiener. Como puede verse, existe un valor para el cual el peso de los órdenes generados por la iluminación estructurada es aproximadamente la mitad del correspondiente al orden cero y, por tanto, en dicho caso se puede considerar que la respuesta del sistema es prácticamente plana. Tomando únicamente un cuarto de cada uno de los espectros resultantes en el cual se encuentre uno de los órdenes del patrón estructurado y filtrando convenientemente el orden cero, es posible emplear una función de detección de la posición en píxeles del valor máximo en el interior de la región seleccionada. Dicho valor será la posición relativa del orden con respecto a una de las esquinas de la matriz que representa el dominio de Fourier. Para obtener la posición con respecto al centro del mismo basta con conocer el número de píxeles que éste posee. Dado que la transformada de Fourier es simétrica, el valor obtenido para la posición del orden (ángulo y frecuencia espacial) se emplea para conocer la posición del otro orden sin más que realizar una rotación de 180° . Este proceso se aplica para cada uno de los ángulos del patrón.

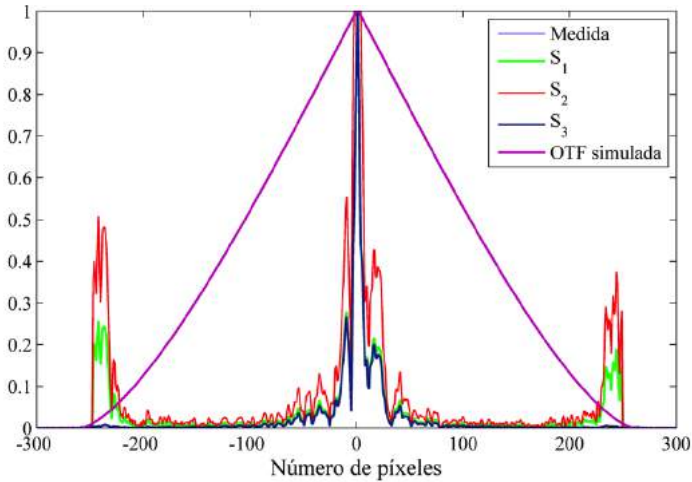


Fig. 32 Perfiles de los espectros obtenidos en el proceso de detección de la posición de los órdenes generados por la iluminación estructurada para distintos parámetros de Wiener. Como vemos, el parámetro de Wiener que compensa de manera correcta la forma de la OTF corresponde al perfil S_2 .

Finalmente se recolocan las componentes, pesadas convenientemente y realizando un filtrado de Wiener con la OTF simulada para cada una de ellas. Nótese que el parámetro de Wiener obtenido en la detección de la posición de las componentes puede ser empleado nuevamente en este proceso. Esto hace que el algoritmo sea realmente útil ya que, normalmente, dicho parámetro se trata de estimar a través de la relación señal ruido de la imagen final o bien se inserta directamente “a mano” y se varía hasta que la imagen presenta una calidad aceptable¹¹. La OTF sintética resultante al final del proceso se muestra en la Fig. 33. Como se observa, el soporte de la misma es aproximadamente el doble que el de la OTF de un sistema convencional.

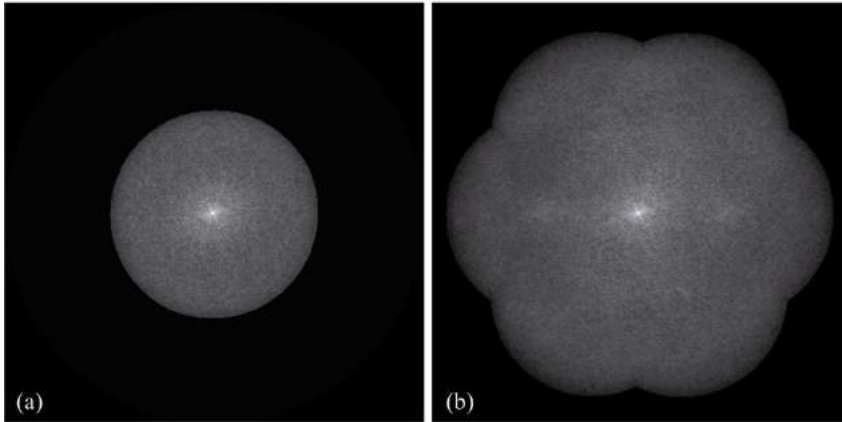


Fig. 33 OTFs obtenidas mediante el algoritmo de reconstrucción empleado para los casos: (a) microscopio convencional, (b) microscopio por iluminación estructurada

Para obtener las distribuciones de intensidad tras el proceso de reconstrucción basta con realizar las transformadas de Fourier inversas de la OTF obtenida para el sistema convencional y el sistema por iluminación estructurada. En la Fig. 34 se muestran los resultados obtenidos para las microesferas fluorescentes de 100nm de diámetro. En la imagen obtenida para el sistema convencional es imposible apreciar la forma de dichas microesferas mientras que en la reconstrucción obtenida para el sistema por iluminación estructurada estas aparecen claramente resueltas.

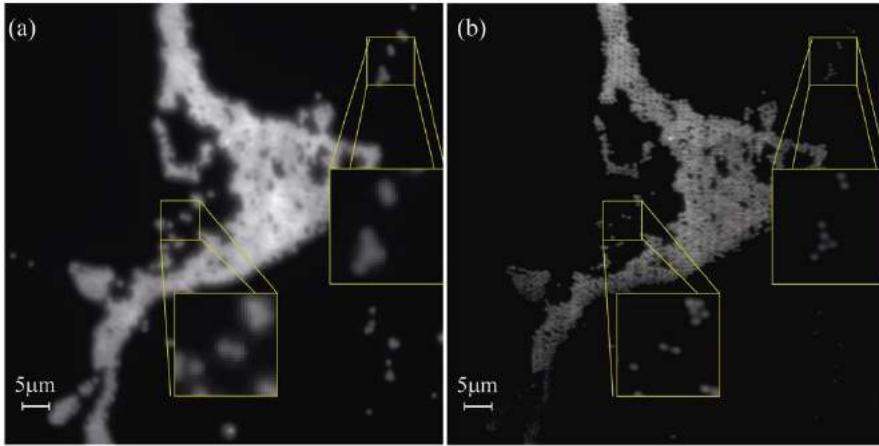


Fig. 34 Reconstrucción de las microsferas anteriores obtenidas mediante (a) microscopía convencional y (b) microscopía por iluminación estructurada.

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que el algoritmo empleado para la detección del desplazamiento de las diferentes componentes funciona correctamente y representa una alternativa a aquellos basados en el cálculo de la correlación entre componentes que requieren un mayor tiempo de cálculo. Además, estos últimos pueden ser muy sensibles a posibles errores en el proceso de descomposición de forma que es difícil saber de dónde proceden dichos errores. Si las componentes no se desplazan a la posición correcta podría deberse a numerosos motivos: un error en la determinación del corrimiento de fase, una muestra cuyo espectro sea disperso, una frecuencia espacial del patrón no adecuada, variaciones de la intensidad entre las imágenes elementales,...etc. Sin embargo, en nuestro algoritmo un mal posicionamiento de las componentes únicamente puede tener dos fuentes de error: un valor no adecuado del parámetro de Wiener y/o una mala elección de la frecuencia espacial del patrón en la cual ésta sea mayor que la frecuencia de corte del sistema de colección. Es notable el hecho de que no dependa de los sucesivos corrimientos de fase ya que, si estamos seguros de que la estimación del parámetro de Wiener es correcta, la aparición de picos residuales en

la OTF sintética generada al final del proceso únicamente puede ser debida a una mala determinación de los corrimientos de fase del patrón (ver Fig. 35). Dichos picos suponen un efecto ruinoso en la distribución de intensidades obtenidas mediante la reconstrucción, como puede observarse en la Fig. 35(b). Un algoritmo basado en la correlación entre los distintos espectros podría encontrar dichos picos como posiciones a las que desplazar las componentes, mientras que en nuestro caso el posicionamiento de las mismas sigue siendo correcto.

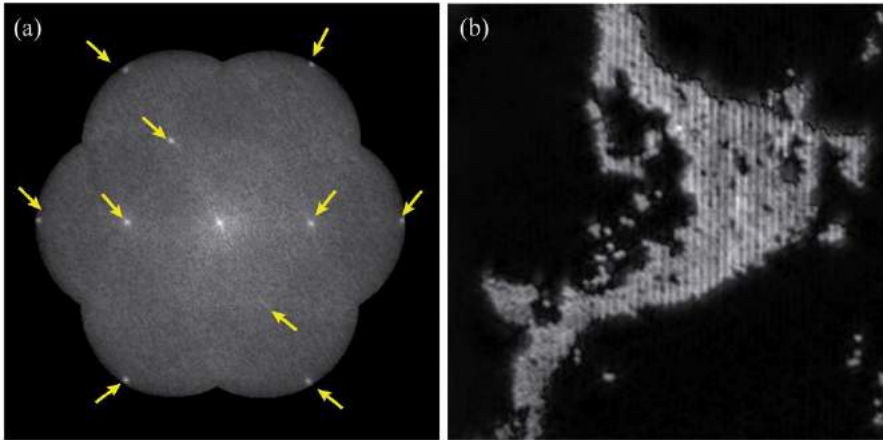


Fig. 35 Resultados obtenidos mediante el software de reconstrucción para una mala determinación del corrimiento de fase. (a) OTF sintética, (b) distribución de intensidades imagen.

4.7. 2D-SIM de frecuencia variable y alta eficiencia luminosa

En este apartado estudiaremos una propuesta realizada por nuestro grupo para la generación de iluminación estructurada de frecuencia variable⁶⁰. Dicha variabilidad en la frecuencia del patrón de iluminación es ciertamente útil ya que, por un lado, permite sintonizar la frecuencia espacial con el fin de optimizar bien sea el seccionado óptico o la mejora en resolución y, por otro lado,

cambiar los elementos del sistema cuando se empleen distintos objetivos de microscopio. Para conseguir este tipo de iluminación emplearemos un biprisma de Fresnel. Este elemento está formado por dos prismas de vidrio unidos por su base. Cuando se ilumina un biprisma de Fresnel con una fuente puntual, se generan dos fuentes puntuales virtuales coherentes entre sí, localizadas en el mismo plano que la fuente real y separadas transversalmente de manera simétrica con respecto a ésta. La interferencia entre las ondas esféricas provenientes de las fuentes puntuales genera una serie de patrones sinusoidales en planos posteriores al biprisma, cuya frecuencia depende de la distancia entre el éste y la fuente real, llamémosla d , del plano de observación y de las características del biprisma. Es posible demostrar²¹ que la separación d entre las fuentes virtuales generadas por un biprisma, de índice de refracción n y ángulo de refringencia δ , situado a distancia η de un fuente puntual, viene dada por

$$d = 2\eta(n-1)\tan\delta. \quad (4.28)$$

Como vemos, si se aumenta la distancia η entre el biprisma y la fuente se incrementa la separación entre las fuentes virtuales.

Es fácil ver que si se colima el haz proveniente de la fuente real por medio de una lente colimadora de focal f_{i2} y se coloca el biprisma en un plano intermedio, a la salida de dicha lente tendremos dos haces planos que interfieren con un ángulo variable. Dicho ángulo de interferencia (dado por la proyección de la posición de las fuentes virtuales y el centro de la lente colimadora), para un cierto biprisma, dependerá exclusivamente de la distancia entre éste y la fuente real.

Para poder implementar este sistema de iluminación en un microscopio SIM debemos emplear una segunda lente de focal f_{i2} de forma que ésta produzca la imagen de las fuentes virtuales sobre la pupila del objetivo de microscopio. La separación de las fuentes puntuales (ahora reales) proyectadas sobre la pupila será $d' = M_i d$, donde $M_i = -f_{i2}/f_{i1}$. Por tanto, en el plano de la pupila tenemos

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

$$U(\mathbf{x}_p) = \left\{ \delta\left(x_p - \frac{\lambda f_{i2} d'}{2}\right) + \delta\left(x_p + \frac{\lambda f_{i2} d'}{2}\right) \right\} P(\mathbf{x}_p) \quad (4.29)$$

donde se han omitido factores constantes irrelevantes. Nótese que, para una combinación de lentes dada, la separación de las fuentes en el plano de la pupila depende exclusivamente de la posición axial del biprisma con respecto a la fuente puntual real. Además, es fácil ver que si en dicho plano en ausencia de biprisma se tiene una cierta intensidad total, al colocar este elemento (despreciando la luz que se pierde debido a la reflexión en las caras del mismo) dicha intensidad se reparte entre las fuentes generadas en presencia de éste. Recordemos que al emplear una red de difracción en la generación de iluminación estructurada 2D se debe bloquear el orden cero, lo que implica que aproximadamente el 80% de la intensidad total proporcionada por la fuente se pierde en el proceso de filtrado.

A partir del mismo desarrollo seguido en el apartado 4.1, se puede comprobar que la distribución en intensidades del patrón de iluminación generado por el biprisma en el espacio imagen de un sistema afocal-telecéntrico podrá escribirse en la forma

$$S_i(\mathbf{x}) = 1 + \cos(2\pi \bar{A}x + \phi_i + \phi_0). \quad (4.30)$$

Una vez comprobado que se tiene el patrón deseado, es necesario encontrar una forma de realizar los desplazamientos de fase y la rotación del mismo. Es fácil ver que, si consideramos que el biprisma tiene su vértice sobre el eje óptico, una rotación del mismo con respecto a éste producirá la correspondiente rotación del patrón de iluminación. Por otro lado, si realizamos un desplazamiento lateral del biprisma en la dirección perpendicular a su eje de simetría, estaremos cambiando el camino óptico relativo entre las fuentes generadas por el mismo para un plano cualquiera. Dicho cambio en el camino óptico se traduce en un corrimiento de fase del patrón de iluminación estructurada en el mismo sentido de desplazamiento del biprisma. Debemos tener en cuenta que los corrimientos de fase del patrón producidos por distintos bi-

prismas con diferentes ángulos y/o índices de refracción cambiarán para un mismo desplazamiento lateral del biprisma.

La implementación del montaje SIM 2D de frecuencia espacial variable y alta eficiencia luminosa puede verse en la Fig. 36. En éste una fuente puntual generada a partir de un láser se colima mediante una primera lente (L1) de distancia focal 200 mm. Entre ambos se posiciona un biprisma de Fresnel montado sobre una plataforma que permite la rotación del mismo así como su desplazamiento lateral mediante un motor de pasos. Una segunda lente (L2) proyecta la imagen de las fuentes puntuales generadas por el biprisma sobre la pupila de un objetivo de microscopio corregido al infinito. La distribución de amplitudes resultante ilumina una muestra fluorescente colocada en el espacio objeto de dicho objetivo de microscopio. Dicha muestra se encuentra montada sobre una plataforma que incluye un nuevo motor de pasos de forma que permite tanto el enfoque de la misma como la realización de un barrido axial. La respuesta incoherente debida a la fluorescencia de la muestra es colectada mediante el mismo objetivo de microscopio y pasa a través de un cubo de filtros cromáticos que bloquean la luz procedente del láser permitiendo únicamente la transmisión de la distribución de intensidades generada para la longitud de onda de fluorescencia. Por último, una lente de tubo (TL) de 200 mm de distancia focal realiza la imagen de la distribución de intensidades de la muestra en su plano focal en el cual se sitúa una cámara CCD (*PixeLink*) de 1392x1040 píxeles de 3.3 μm de tamaño.

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

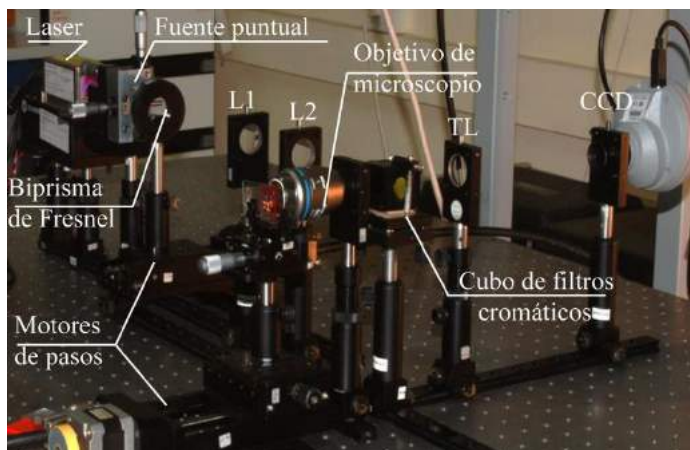


Fig. 36 Montaje experimental del SIM de frecuencia variable empleando un biprisma de Fresnel.

Empleando dicho montaje hemos realizado una serie de comprobaciones experimentales que prueban el funcionamiento del mismo. En primer lugar, realizamos un experimento para probar la flexibilidad en la variación de la frecuencia espacial del patrón en términos de la obtención de seccionado óptico a partir de la misma. Para ello, empleamos una lámina delgada fluorescente aproximadamente uniforme creada mediante la tinción de un portamuestras. Dicha muestra se ilumina mediante un láser de Argón cuya longitud de onda es 514 nm. El biprisma empleado para generar el patrón posee 1° de ángulo de refringencia y un índice de refracción 1.515. Para proyectar el patrón de iluminación estructurada y coleccionar la luz emitida por la muestra se emplea un objetivo de microscopio $10\times$ y $NA=0.45$. La frecuencia de la iluminación estructurada se varía simplemente cambiando la posición axial del biprisma.

Es de esperar que, si realizamos un barrido axial empleando como muestra una lámina fluorescente plana, delgada y uniforme, la intensidad integrada para cada posición de barrido sea constante para un sistema convencional y que, por otro lado, sea una cierta función que dependa de la posición de la muestra para un sistema con seccionado óptico. Como vimos en la teoría

desarrollada en este Capítulo, un microscopio que emplee iluminación estructurada puede poseer capacidad de seccionado óptico siempre que la frecuencia espacial del patrón proyectado sobre la muestra sea la adecuada.

En la Fig. 37(a) se representan las curvas correspondientes a las intensidades integradas teóricas obtenidas a partir de distintas frecuencias espaciales del patrón. Este cálculo se puede realizar mediante la transformada de Fourier a lo largo del eje de las frecuencias axiales de la OTF sintética para un microscopio SIM. Como se observa, dado que su representación la hemos realizado en coordenadas normalizadas, el valor para el cual la intensidad integrada es más estrecha y, por tanto, para la cual el sistema posee mayor capacidad de seccionado óptico es $A=1$.

Dichas curvas, incluyendo la del sistema convencional, se muestran en la Fig. 37(b) para el sistema experimental que hemos descrito anteriormente. Como se puede observar, dependiendo del valor de la frecuencia espacial del patrón se obtienen distintos resultados en la anchura de la intensidad integrada. Para comprobar que el comportamiento del sistema es, efectivamente, el apropiado para un sistema SIM realizamos la medida de la intensidad integrada para una serie de frecuencias espaciales del patrón.

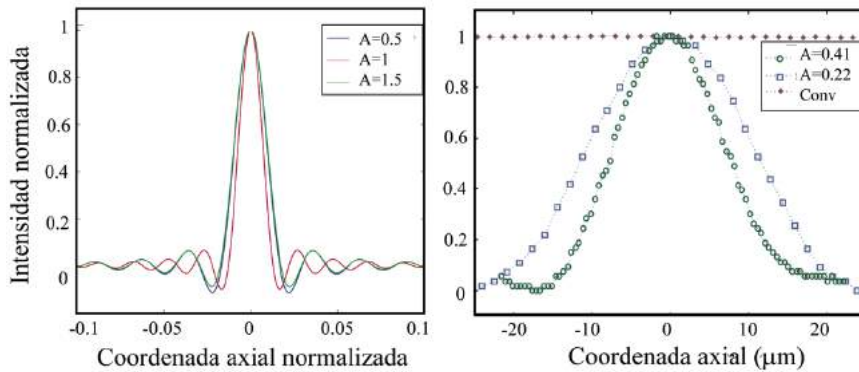


Fig. 37 Intensidad integrada para distintas frecuencias espaciales de la iluminación integrada para (a) el caso teórico, (b) el caso experimental (obtenidas mediante el barrido axial de una lámina delgada fluorescente).

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

Posteriormente se calcula la anchura a media altura (FWHM) de las curvas resultantes tanto para el caso teórico (pasando las coordenadas normalizadas a las coordenadas del espacio imagen) como experimental. Como resultado de dicha serie de medidas se obtiene una nueva función que representa una cuantificación de la capacidad de seccionado óptico para distintas frecuencias espaciales del patrón (ver Fig. 38). Como podemos ver, a pesar que las funciones teórica y experimental no concuerdan exactamente, ambas siguen la misma tendencia. Con ello, podemos decir que existe un valor de la frecuencia espacial del patrón de iluminación estructurada que optimiza la capacidad de seccionado óptico del sistema y que, por lo tanto, la FWHM de la intensidad integrada es mínima para dicho valor. El hecho de que la curva experimental y la teórica no coincidan exactamente puede deberse a numerosas causas. Por un lado, la muestra empleada no se encuentra realmente limitada a un único plano, así como puede presentar variaciones transversales de intensidad. Por otro, nuestro detector es finito mientras que el cálculo teórico considera que el plano imagen es infinito. El hecho de que en la curva experimental no se representen las FWHM de las intensidades integradas obtenidas para frecuencias espaciales del patrón relativamente altas se debe a que para éstos la capacidad de seccionado óptico se reduce considerablemente. Como consecuencia la sensibilidad de nuestro sistema no nos permite detectar ninguna variación en la intensidad integrada para dichas frecuencias.

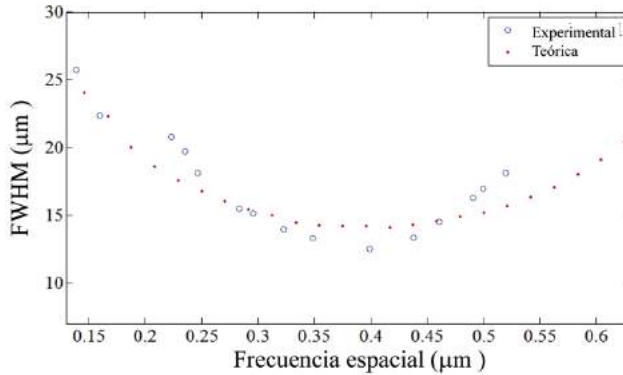


Fig. 38 Representación de las curvas obtenidas mediante el cálculo de la anchura a media altura (FWHM) de la intensidad integrada para distintas frecuencias espaciales del patrón de iluminación estructurada.

Para probar que el sistema proporciona, tras el proceso de reconstrucción, una mejora en la resolución con respecto a la de un microscopio convencional realizamos un nuevo experimento. Para ello en primer lugar empleamos un objetivo de microscopio de apertura numérica baja ($2\times$, $NA=0.075$). La razón para ello es que usaremos como muestra un test *USAF 1951* de alta resolución en negativo, cuyo uso no está orientado al empleo de objetivos de microscopio de alta apertura numérica. Para generar una muestra fluorescente a partir del test, colocamos una lámina delgada fluorescente en un plano inmediatamente posterior al mismo. Si bien la lámina y el test no se encuentran en el mismo plano, podemos considerar que aproximadamente lo están dada la gran profundidad de campo del objetivo empleado. Se toman nueve imágenes correspondientes a tres orientaciones distintas del biprisma (para rotaciones relativas de -60° , 0° y 60°) y tres corrimientos de la fase del patrón estructurado por ángulo ($\phi_i = \{0, \pi/4, \pi/2\}$). Los resultados obtenidos a partir del software de reconstrucción que presentamos en la sección 4.5 se muestran en la Fig. 39. A partir bien de la comparación de las OTFs obtenidas para la sistema convencional y el sistema por iluminación estructurada o de la distribuciones de intensidad correspondientes, se puede concluir que el microscopio por iluminación estructurada posee aproximadamente el doble de resolución que

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

el microscopio convencional. Esto es fácil de ver a partir del empleo del test USAF ya que la frecuencia espacial de un elemento de un cierto grupo con respecto al mismo elemento del grupo anterior es el doble.

Cabe hacer notar que, típicamente, los objetivos de microscopio tienen un tamaño de pupila menor cuanto más grande es su apertura numérica. Dado que estamos proyectando dos fuentes puntuales sobre el plano de la pupila cuya separación depende exclusivamente (para unos elementos ópticos del sistema dados) de la separación entre el biprisma y la fuente puntual real, es posible concluir que siempre podremos alcanzar la frecuencia espacial óptima para la obtención de una mejora en resolución empleando objetivos de apertura numérica más grandes. Para ello, no tendremos más que acercar el biprisma a la fuente puntual real. En la Fig. 40 se muestran distintas curvas que representan el tamaño de la pupila para distintos objetivos de microscopio en función de su apertura numérica y su aumento. Asimismo, se muestra la máxima separación que podemos obtener de las fuentes puntuales proyectadas en el plano de la pupila empleando el biprisma de Fresnel para dos ángulos de refringencia distintos.

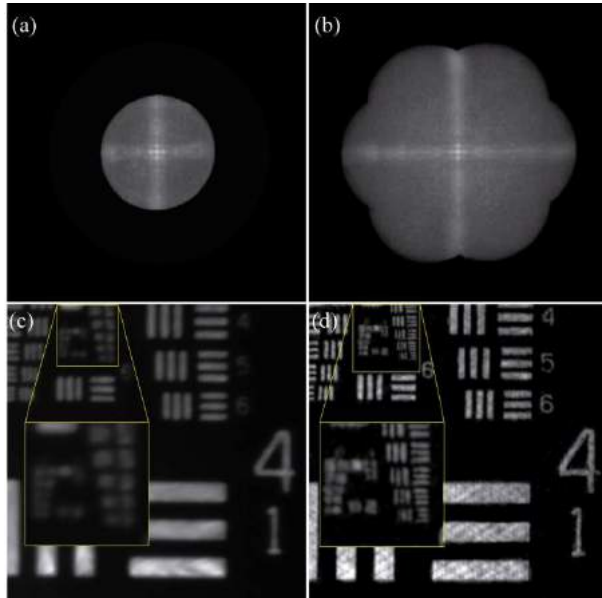


Fig. 39 OTF obtenida en el proceso de formación de imágenes de un test USAF 1951 fluorescente para (a) un microscopio convencional, (b) un microscopio por iluminación estructurada. Las distribuciones de intensidad imagen para ambos casos se muestran en los paneles (c) y (d), respectivamente.

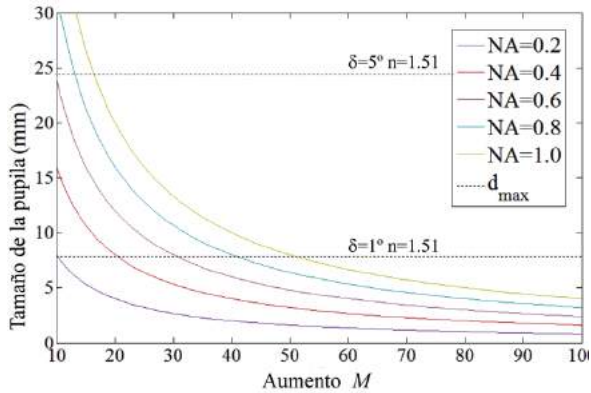


Fig. 40 Representación del tamaño de la pupila para distintos objetivos de microscopio en función de su apertura numérica y aumento. Asimismo se representa con una recta la máxima separación entre las fuentes puntuales proyectadas sobre la misma para dos biprisma de ángulo de refringencia distinto.

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

Por último emplearemos nuestro sistema para conseguir una mejora en resolución para un objetivo de microscopio de inmersión en aceite de apertura numérica alta ($60\times$, $NA=1.40$) y proyectando el patrón de iluminación estructurada sobre una muestra biológica. En este caso, usamos como fuente un láser de diodo de longitud de onda 404.5 nm. Generamos la fuente puntual mediante la focalización del haz láser propagado libremente sobre un *pinhole* de 5 μm . Para llevar a cabo dicha focalización empleamos un objetivo de microscopio $60\times$ y $NA=0.8$. Cambiamos igualmente el cubo de filtros cromáticos de forma que bloqueen la luz procedente del láser y permitan la transmisión de la distribución de intensidad generada tras el proceso de fluorescencia. Mediante este sistema, empleando el mismo biprisma que anteriormente, realizamos la captura de las nueve imágenes requeridas para el proceso de reconstrucción colocando como muestra una sección de un riñón de ratón (*Invitrogen FluoCells Prepared Slide#3*). En los resultados obtenidos se puede apreciar una mejora en resolución al comparar la imagen obtenida a través del microscopio convencional con la correspondiente al microscopio por iluminación estructurada, a pesar de que el grosor de la muestra es grande en comparación con la profundidad de campo del objetivo de microscopio empleado.

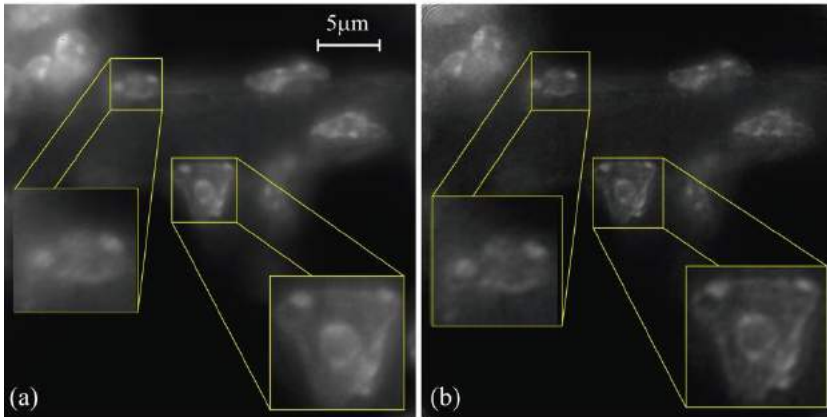


Fig. 41 Imágenes de una sección de riñón de ratón obtenidas empleando un objetivo de microscopio $60\times$ y $NA=1.40$ para los casos (a) microscopio convencional, (b) microscopio por iluminación estructurada.

A partir de los resultados obtenidos en esta sección podemos concluir que el sistema propuesto para la proyección de iluminación estructurada empleando un biprisma de Fresnel presenta la flexibilidad deseada tanto para la selección de la frecuencia espacial óptima (que conlleve una mejora, bien en la resolución, bien en la capacidad de seccionado óptico) así como para el empleo de distintos objetivos de microscopio. Además, dado que toda la luz procedente de la fuente puntual se emplea en la generación del patrón, este sistema mejora la eficiencia luminosa con respecto a los sistemas estándar que generan la iluminación estructurada a partir de redes de difracción y que, por tanto, requieren el bloqueo del orden cero (y de órdenes superiores al 1.).

4.8. Extensión a iluminación estructurada 3D

La técnica SIM que se ha propuesto en las secciones anteriores puede ser extendida para la generación de iluminación estructurada 3D. De hecho, existe una forma alternativa de SIM mediante la cual se consigue optimizar la mejora en resolución obteniendo a su vez capacidad de seccionado óptico⁵⁶. Ésta se basa en generar un patrón periódico en la dirección transversal así como en la dirección axial. A continuación, presentamos las líneas generales de la generación de nuestra propuesta para conseguir este tipo de iluminación.

Para conseguir generar una estructura axial periódica se puede emplear, básicamente, el mismo sistema que propusimos para la generación de iluminación estructurada bidimensional con una serie de variaciones. En primer lugar, se cambia la iluminación puntual del biprisma por un conjunto de N rendijas delgadas, paralelas entre sí y equiespaciadas, iluminadas incoherentemente desde el punto de vista espacial. Podemos considerar, por tanto, que la fuente empleada vendrá dada por N de rendijas incoherentes tanto entre sí como para cada uno de los puntos a lo largo de la dirección de cada rendija. Empleando un sistema análogo al de la Fig.36, el resultado será la generación, para cada rendija real, de dos rendijas virtuales coherentes punto a punto, desplazadas simétricamente con respecto a ésta y cuya separación depende de la distancia

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

entre la fuente real y el biprisma de Fresnel. Cada par de rendijas genera un patrón cosenoidal que es incoherente con respecto al resto de patrones. Como resultado, en el espacio imagen de la lente L1 se tendrán una serie de patrones cosenoidales incoherentes que se propagan con distinto ángulo con respecto al eje óptico, dependiendo de la posición de la rendija real de la procedan. Es posible demostrar ⁶¹ que la iluminación generada mediante este sistema viene dada por

$$S_i(\mathbf{x}, z) = 1 + \cos(2\pi\bar{A}x + \phi_i) s_z(z), \quad (4.31)$$

donde \bar{A} es la frecuencia del patrón generado en la dirección transversal y ϕ_i es un desplazamiento relativo de fase que se controla mediante el desplazamiento del biprisma en la dirección transversal. La función que produce variaciones en la dirección axial vale

$$s_z(z) = \frac{\sin(\pi N \bar{A} x_0)}{N \sin(\pi \bar{A} x_0)} \text{sinc}(\bar{A} \Delta M), \quad (4.32)$$

siendo x_0 la separación entre rendijas consecutivas, Δ la anchura de cada rendija y M el aumento lateral del sistema.

En la Fig. 42 se muestra la simulación de un corte meridional de la OTF3D para un microscopio convencional y uno que emplee la iluminación estructurada 3D propuesta. Para dicho cálculo consideramos un confinamiento axial del patrón equivalente al empleo de cinco rendijas así como una frecuencia transversal del mismo tal que optimiza la capacidad de seccionado óptico. Como puede verse, a pesar de que en principio podríamos confinar mucho más el patrón empleando un mayor número de rendijas, dicha estructura axial es suficiente para producir una extensión del soporte de la OTF en la dirección de las frecuencias axiales.

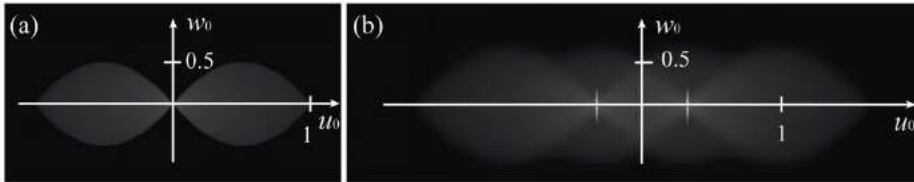


Fig. 42 Simulación de los cortes meridionales de la OTF3D para (a) un microscopio convencional y (b) un microscopio por iluminación estructurada 3D que posee un confinamiento del patrón para la dirección axial y una frecuencia espacial transversal tal que optimiza la capacidad de seccionado óptico.

El análisis detallado de esta generalización no es uno de los objetivos específicos de esta Tesis doctoral, pero representa una continuación natural para el desarrollo futuro de las ideas aquí presentadas. Así, este nuevo sistema SIM poseerá la ventaja de producir una iluminación estructurada periódica tanto en la dirección axial como transversal empleando una fuente incoherente lo que mejorará considerablemente la relación señal-ruido de las imágenes, además de proporcionar un claro incremento de la capacidad de seccionado óptico del dispositivo respecto de los sistemas presentados en este Capítulo.

5. Microscopía Holográfica Digital

The future cannot be predicted, but futures can be invented. It was man's ability to invent which has made human society what it is.

Dennis Gabor, Inventing the future (1963)

La holografía fue inventada por Dennis Gabor en 1948^{62,63} como un método para grabar y reconstruir la amplitud y la fase de un campo luminoso. Esto supone una gran diferencia con respecto a las técnicas convencionales de formación de imágenes en las que se graba únicamente la distribución de intensidades del campo proveniente de una cierta escena, perdiendo de este modo toda la información de las fases relativas.

Un holograma es, básicamente, el registro o la captura del patrón de la interferencia entre el campo dispersado por un objeto (onda objeto) y un fondo coherente (onda de referencia) con dicho campo. El holograma queda grabado sobre una superficie pero es posible acceder a la información tridimensional del campo a través de ésta, ya que dicha información queda codificada en el patrón interferencial.

A continuación veremos distintas técnicas para realizar el registro de hologramas y la posterior reconstrucción del frente de ondas. En este Capítulo comenzaremos estudiando la holografía desde el punto de vista clásico, es decir, el grabado de hologramas en películas fotográficas. Más tarde analizaremos los principios de la holografía digital, esto es, cuando el medio empleado para el grabado del holograma es un sensor digital, así como los métodos

numéricos empleados para la reconstrucción del frente de onda objeto. Por último, veremos la aplicación de esta técnica a la microscopía. Cabe decir que si bien existen distintos esquemas dentro de todas las modalidades de la holografía^{64,65}, nosotros nos centraremos en la conocida como holografía fuera de eje.

5.1. Fundamentos de la holografía clásica

Supongamos un sistema como el mostrado en la Fig. 43(a), en el que consideramos un plano transversal fijado sobre un objeto 3D separado de la placa fotográfica una cierta distancia z . En dicho sistema se realiza el grabado sobre una placa fotográfica del haz difractado por el objeto, cuya distribución compleja de amplitudes en el citado plano es $o(\mathbf{x})$, y un haz coherente con el mismo, conocido como haz de referencia, $R(\mathbf{x}, z)$. Tenemos, por tanto, la suma coherente de ambos haces en el plano de la placa fotográfica, es decir,

$$U(\mathbf{x}) = R(\mathbf{x}, z) + o(\mathbf{x}, z), \quad (5.1)$$

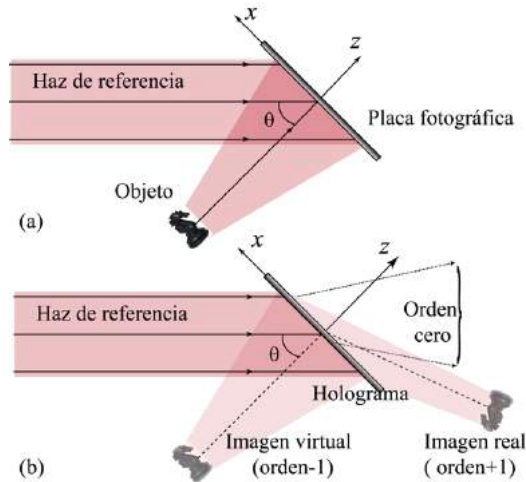


Fig. 43 (a)Esquema del grabado de la interferencia entre un patrón de difracción de un cierto objeto sobre una placa fotográfica , y (b) la creación de un holograma tras el revelado de la misma con su correspondiente método de reconstrucción.

siendo $o(\mathbf{x}, z)$ la distribución compleja de amplitudes del objeto propagada una cierta distancia z (conocida como haz objeto). Por tanto, la intensidad en el plano de la placa fotográfica no será más que

$$\begin{aligned} I(\mathbf{x}) &= U(\mathbf{x})U^*(\mathbf{x}) = |R(\mathbf{x}, z) + o(\mathbf{x}, z)|^2, \\ &= |R(\mathbf{x}, z)|^2 + O(\mathbf{x}, z) + R^*(\mathbf{x}, z)o(\mathbf{x}, z) + R(\mathbf{x}, z)o^*(\mathbf{x}, z). \end{aligned} \quad (5.2)$$

donde $O(\mathbf{x}, z) = |o(\mathbf{x}, z)|^2$. Esta intensidad se graba en el medio a partir del cual, tras un revelado del mismo, se obtiene una transparencia positiva (holograma). Suponiendo que la respuesta del medio es lineal con la intensidad, la función de transmitancia del medio revelado puede escribirse como

$$t(\mathbf{x}) = t_0 + \beta I(\mathbf{x}), \quad (5.3)$$

donde t_0 es una transmitancia de fondo propia del medio de registro y β es la pendiente de la recta correspondiente a la representación de la transmitancia en amplitud frente a la respuesta característica del medio empleado. De esta forma, vamos a comprobar que si colocamos el holograma en la posición en la que se encontraba originalmente la placa fotográfica e iluminamos con el mismo haz colimado utilizado en el proceso de grabado (ver Fig. 43(b)), veremos una reconstrucción exacta de la imagen en la posición en la que éste se encontraba originalmente. En efecto, debido a que la amplitud compleja en cualquier punto del haz de reconstrucción es, exceptuando un factor constante, la misma que en el haz de referencia, la amplitud compleja transmitida a través del holograma se puede escribir como

$$\begin{aligned} U_H(\mathbf{x}) &= \\ &= t_0 R(\mathbf{x}, z) + \beta \left[|R(\mathbf{x}, z)|^2 R(\mathbf{x}, z) + R(\mathbf{x}, z) O(\mathbf{x}, z) + o(\mathbf{x}, z) + |R(\mathbf{x}, z)|^2 o^*(\mathbf{x}, z) \right]. \end{aligned} \quad (5.4)$$

Experimentalmente se intenta conseguir que $O(\mathbf{x}, z) \ll |R(\mathbf{x}, z)|^2$ de manera

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

que el efecto del término que contiene información de la distribución de intensidades objeto, conocido como orden cero (o DC), se minimice.

Del análisis de los términos anteriores podemos concluir que del proceso de grabado y reproducción de un holograma se reproduce un campo que es igual a la distribución de amplitudes compleja generada por el objeto original, $o(\mathbf{x}, z)$. De esta forma un observador colocado en la posición adecuada podrá ver, aunque sin información cromática en este esquema básico, una distribución de intensidades que reproduce fielmente (dependiendo de la resolución de la placa fotográfica empleada en el grabado) la estructura 3D del objeto original. Además, podemos deducir que las características del campo obtenido tras el proceso dependerá, para un mismo objeto, placa fotográfica y fuente de iluminación, de la forma de la referencia.

Sin embargo, tenemos un efecto no deseado llamado “imagen gemela” (Fig. 43) debido al cual un observador vería la distribución de intensidades del objeto superpuesta con otra equivalente (la susodicha imagen gemela) cuya posición y tamaño dependen de los parámetros de la captura. Esto supone la mayor limitación a la hora de emplear la configuración en eje en la cual el haz de referencia y el haz objeto viajan paralelos. En ellas todos los términos (el del objeto, la imagen gemela y el orden cero) se encuentran alineados en la misma dirección. Una limitación general en holografía es que en la práctica, a no ser que se empleen placas fotográficas de muy alta sensibilidad luminosa, el término que contiene la información en intensidades del objeto (DC) en la Ec.(5.4) no es despreciable con respecto al haz de referencia. Esto hace que las reproducciones del objeto obtenidas posean un cierto halo, cuya intensidad depende de la citada relación de intensidades entre los haces objeto y referencia.

5.2. Fundamentos de la holografía digital

La holografía digital surge de la sustitución de la placa holográfica empleada en la holografía clásica por un medio de registro digital, típicamente una cá-

para CCD. Como veremos, a partir de técnicas de procesamiento de imagen y cálculos computacionales aplicados al holograma digital capturado con dicho medio de registro es posible recuperar la información del frente de onda difractado por el objeto, esto es, su amplitud y su fase^{13,66,67}.

Empecemos tratando un caso ideal en el cual el medio de registro digital sea infinitamente extenso y cuyo tamaño de píxel sea infinitesimal. Además, supondremos que el haz de referencia es una onda plana proveniente de la colimación de una fuente puntual monocromática de longitud de onda λ y que el objeto a su vez se ilumina con otra onda plana proveniente de la misma fuente de forma que ambos haces son coherentes entre sí. Por último, consideraremos el caso en el que el haz objeto presenta una incidencia normal con respecto al medio de captura mientras que el haz de referencia incide sobre el mismo con un cierto ángulo dado por el vector de onda $\mathbf{k} = (k_x, k_y)$. Bajo estas condiciones, la distribución compleja de amplitudes del haz objeto en el plano de registro, situado a una distancia d del objeto, vendrá dada por la expresión

$$o(\mathbf{x}, z = d) = \left\{ \|o(\mathbf{x})\|^2 \exp[i\phi_0(\mathbf{x})] \right\} \otimes_2 \exp\left[\frac{ik}{2d} |\mathbf{x}|^2 \right], \quad (5.5)$$

donde hemos omitido factores constantes irrelevantes y $\phi_0(\mathbf{x})$ es la información de fase del objeto. Por otro lado, suponiendo que la intensidad de la onda de referencia es constante en cualquier punto del espacio, el frente de onda complejo de la misma para cualquier plano podrá escribirse en la forma

$$R(\mathbf{x}, z) \propto \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{x}). \quad (5.6)$$

Por tanto, omitiendo nuevamente factores constantes, la intensidad capturada por el medio de registro podrá expresarse como

$$I_H(\mathbf{x}) = O(\mathbf{x}, d) + 1 + R^*(\mathbf{x}, d)o(\mathbf{x}, d) + R(\mathbf{x}, d)o^*(\mathbf{x}, d). \quad (5.7)$$

Para aislar el término que contiene la información de la distribución compleja de amplitudes propagada del objeto podemos realizar la transformada de

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

Fourier 2D de la captura realizada por el medio de registro, esto es

$$\tilde{I}_H(\mathbf{u}) = DC(\mathbf{u}, d) + \tilde{o}(\mathbf{u}, d) \otimes_2 \delta(\mathbf{u} - \mathbf{k}) + \tilde{o}^*(\mathbf{u}, d) \otimes_2 \delta(\mathbf{u} + \mathbf{k}), \quad (5.8)$$

donde

$$DC(\mathbf{u}, d) = \tilde{O}(\mathbf{u}, d) + \delta(\mathbf{u}). \quad (5.9)$$

En esta expresión, podemos identificar tres términos en el dominio de Fourier: uno centrado en el origen de las frecuencias espaciales que contiene la transformada de Fourier de la distribución de intensidades del haz objeto y del haz de referencia (el orden cero, DC), y otros dos que contienen información complementaria separados simétricamente con respecto a dicho origen una distancia que depende del ángulo del haz de referencia con respecto al plano del medio de registro, a los que llamaremos órdenes +1 y -1.

Idealmente podemos separar los tres términos de forma que sea posible realizar un filtrado del orden +1, es decir, del orden que contiene la información del patrón de difracción de la distribución compleja de amplitudes del objeto⁶⁸. Así pues, multiplicamos la transformada de Fourier 2D de la captura por un filtro genérico al que llamamos $F(\mathbf{u})$ de forma que

$$\tilde{I}_H^F(\mathbf{u}) = \tilde{I}_H(\mathbf{u}) \{F(\mathbf{u}) \otimes_2 \delta(\mathbf{u} - \mathbf{k})\} = \{\tilde{o}(\mathbf{u}, d) \cdot F(\mathbf{u})\} \otimes_2 \delta(\mathbf{u} - \mathbf{k}), \quad (5.10)$$

donde hemos considerado que se filtran el orden cero y la imagen gemela perfectamente⁶⁸ y que, además, el filtro se encuentra centrado con respecto al centro del espectro del orden +1.

En este punto, al igual que en holografía óptica era necesario iluminar con el mismo haz de referencia para obtener la reconstrucción, es preciso generar computacionalmente un haz referencia numérico que tenga las mismas propiedades que el haz que se empleó en el grabado del holograma, es decir, el mismo ángulo de incidencia. Para ello pueden seguirse distintas estrategias. Por un lado, podemos volver al espacio real y tratar de ajustar los ángulos en x e y de la referencia teniendo cierto conocimiento *a priori* de los parámetros físicos de la misma. Tras multiplicar el holograma filtrado por dicha referen-

cia numérica anulamos el factor de fase lineal debido al haz de referencia complejo conjugado. Por otro lado, y quizá la manera más sencilla de realizar el proceso, es localizar el “centro” del espectro del orden +1 y recolocararlo en el origen de las frecuencias espaciales. Nótese que ambos procesos son totalmente equivalentes ya que, una vez centrado el espectro sobre dicho origen, en el espacio real tendremos la distribución compleja de amplitudes del haz objeto sin ningún otro factor de fase añadido. Suponiendo pues que la referencia se compensa de manera óptima y realizando la transformada de Fourier inversa, se obtiene la siguiente distribución compleja de amplitudes

$$\hat{o}(\mathbf{x}, d) = o(\mathbf{x}, d) \otimes_2 \tilde{F}(\mathbf{x}). \quad (5.11)$$

Como puede observarse en la ecuación anterior, la resolución del sistema viene determinada por el filtro empleado para aislar el orden +1. Hemos de recordar que $o(\mathbf{x}, d)$ no es más que un patrón de difracción situado a distancia d del objeto. Así, para recuperar la información del objeto, tanto en amplitud como en fase, es necesario aplicar algoritmos de propagación que nos permitan “reenfocar” en distintos planos en el interior del objeto 3D. Existen distintos algoritmos de propagación que permiten obtener la distribución compleja de amplitudes objeto obtenida a partir de un holograma digital. Dependiendo de la distancia d a la que se grabe el holograma podremos distinguir entre algoritmos basados en el espectro angular o en ecuaciones paraxiales. Dentro de las ecuaciones paraxiales se puede emplear la versión computacional de la integral de Fresnel-Kirchoff o bien la versión de la misma escrita como una convolución⁶⁹.

Finalmente es posible recuperar la intensidad transmitida o reflejada por el objeto como

$$\hat{O}(\mathbf{x}) = |\hat{o}(\mathbf{x}, 0)|^2, \quad (5.12)$$

mientras que la fase del objeto será

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

$$\hat{\phi}_0(\mathbf{x}) = \arctan \left\{ \frac{\text{Im}[\hat{o}(\mathbf{x}, 0)]}{\text{Re}[\hat{o}(\mathbf{x}, 0)]} \right\}. \quad (5.13)$$

Nótese que $\hat{\phi}_0 \in [0, 2\pi)$, es decir, está definida en módulo 2π . De esta forma, si la distribución compleja de amplitudes obtenida tras el proceso de reconstrucción posee saltos de fase mayores a 2π el mapa de fase obtenido se verá truncado en dichos saltos volviendo al valor cero. En dicho caso es necesaria la aplicación de algoritmos de desenvoltura de fase^{70,71}.

A partir de la fase cuantitativa obtenida mediante las reconstrucciones, es posible realizar medidas del grosor de la muestra por medio de la siguiente relación dada por el camino óptico recorrido por un haz²¹

$$\Delta h_i(\mathbf{x}) = \frac{\lambda \hat{\phi}_0(\mathbf{x})}{2\pi \Delta n_i(\mathbf{x})}, \quad (5.14)$$

siendo $\Delta n_i(\mathbf{x})$ una función que describe las variaciones de fase entre las distintas zonas de la muestra y el medio circundante. De la ecuación anterior es posible deducir que, en el caso de muestras complejas con distintas interfases y variaciones de índice de refracción, el cálculo del espesor de la muestra no es una medida directa. Sin embargo, en casos sencillos en los que la muestra puede considerarse homogénea y se conoce su índice de refracción, este mismo cálculo se obtiene directamente sin más que aplicar la siguiente relación

$$h(\mathbf{x}) = \frac{\lambda \hat{\phi}_0(\mathbf{x})}{2\pi (n_2 - n_1)} \quad (5.15)$$

donde n_1 es el índice de refracción del medio en el que se encuentra la muestra (típicamente aire y, por tanto, $n_1=1$) y n_2 es el índice de refracción de la misma.

Durante todo el desarrollo teórico realizado en este apartado hemos omitido los efectos debidos a la naturaleza discreta y finita del medio de registro. A continuación tendremos en cuenta dichos efectos. Supongamos que el medio

de registro posee $N_x \times N_y$ píxeles de tamaño $(\Delta x, \Delta y)$. El holograma digital será una matriz que podremos escribir como

$$I_{DH}(r, l) = I_H(r\Delta x, l\Delta y). \quad (5.16)$$

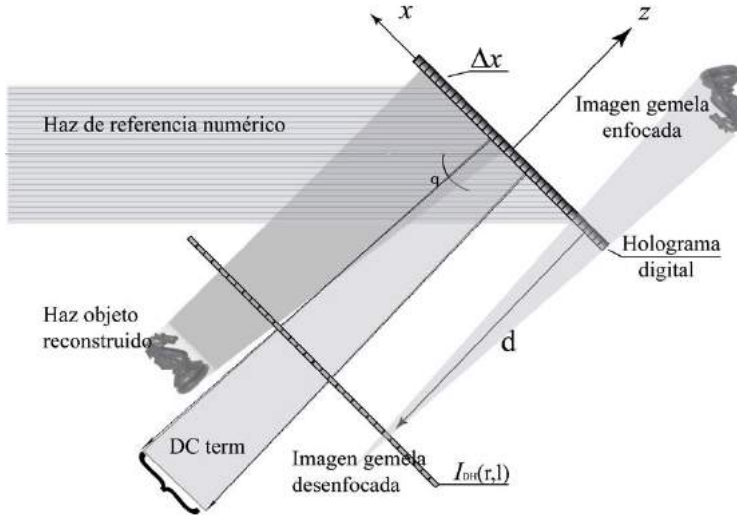


Fig. 44 Esquema del proceso de reconstrucción de un holograma digital.

que contendrá, como ya hemos visto, los términos correspondientes al orden cero, al haz objeto y a la imagen gemela, tal como se ilustra en la Fig. 44. Esta forma puede observarse en la Fig. 45, en la que se muestra el resultado experimental obtenido para la reconstrucción del holograma digital de un test tras emplear un algoritmo de reenfoque y, en el cual, el proceso de filtrado del orden +1 se ha omitido y en su lugar se ha realizado un filtro pasa-alta para minimizar el efecto del orden cero.

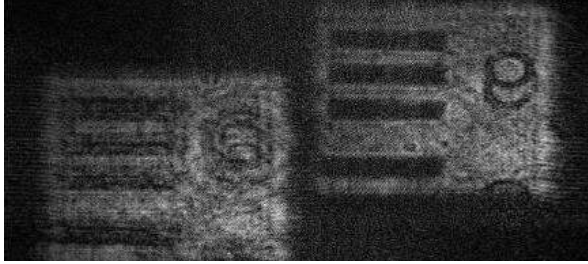


Fig. 45 Reconstrucción de un holograma digital de un test USAF 1951 en el que se ha sustituido el proceso de filtrado del orden +1 por un filtro pasa-alta.

Nótese que la discretización de la función $I_H(\mathbf{x})$ impone, de acuerdo con el teorema de Nyquist, un valor máximo para la frecuencia espacial que puede registrarse en el holograma digital. Esto supone un ángulo máximo para el haz de referencia, es decir, existe un valor límite de la frecuencia espacial del patrón de interferencias creado por la superposición coherente del haz de referencia y el haz objeto. Se puede demostrar⁷² que el valor de dicho ángulo es aproximadamente igual a

$$(\theta_{x,\max}, \theta_{y,\max}) \approx \left(\frac{\lambda}{2\Delta x}, \frac{\lambda}{2\Delta y} \right). \quad (5.17)$$

Así la discretización del medio de registro implica que el sistema posee una frecuencia espacial máxima de registro dada por

$$(u_{\max}, v_{\max}) = (N_x \Delta u, N_y \Delta v), \quad (5.18)$$

siendo

$$(\Delta u, \Delta v) = \left(\frac{1}{N_x \Delta x}, \frac{1}{N_y \Delta y} \right). \quad (5.19)$$

los correspondientes tamaños del pixel en el espacio de Fourier. Es directo ver que la frecuencia espacial máxima que es capaz de registrar el sistema no es más que

$$(u_{\max}, v_{\max}) = \left(\frac{1}{\Delta x}, \frac{1}{\Delta y} \right). \quad (5.20)$$

Si despreciamos el orden cero y si se tiene en cuenta que debemos realizar un filtrado de dicho espacio para eliminar el efecto de la imagen gemela, en la practica el sistema posee un ancho de banda tal que

$$(\hat{u}_{\max}, \hat{v}_{\max}) = \left(\frac{u_{\max}}{2}, \frac{v_{\max}}{2} \right). \quad (5.21)$$

Teniendo en cuenta el efecto del sensor, los algoritmos de propagación del frente de onda deben considerar el tamaño del pixel así como el posible cambio de aumento del campo al realizar la propagación. Por ejemplo, la discretización de la integral de Fresnel-Kirchhoff que debemos emplear para realizar la propagación del frente de onda complejo obtenido mediante holografía digital proporciona una matriz dada por la expresión

$$I_{O^{(1)}}(m, n, d) = \frac{1}{i\lambda d} \exp(i\pi\lambda d) \left[\left(\frac{m}{N_x \Delta x} \right)^2 + \left(\frac{n}{N_y \Delta y} \right)^2 \right] \times \quad (5.22)$$

$$\times DFT \left\{ I_{DH}^F(r, l) R_D(r\Delta x, l\Delta y, d)^* \exp\left(\frac{-ik}{2d} [(r\Delta x)^2 + (l\Delta y)^2] \right) \right\}_{(m,n)}$$

siendo d la distancia de propagación, DFT la operación transformada de Fourier discreta 2D, R_D una onda plana simulada que debe ser lo más parecida posible al haz de referencia real y I_{DH}^F la versión discreta del holograma tras filtrar el orden cero y la imagen gemela. Un ejemplo de la aplicación de este tipo de algoritmo se muestra en la Fig. 46. Como vemos, esta propagación (que se emplea para valores de d tales que el campo puede considerarse paraxial) no está exenta de posibles errores. Por un lado debemos conocer con precisión el tamaño del pixel y la longitud de onda empleados. Por otro lado, una mala estimación de la referencia (en el caso de que ésta sea plana) tendrá como efecto un desplazamiento progresivo en la amplitud reconstruida debido a un factor lineal adicional en la fase calculada (ver Fig. 47).

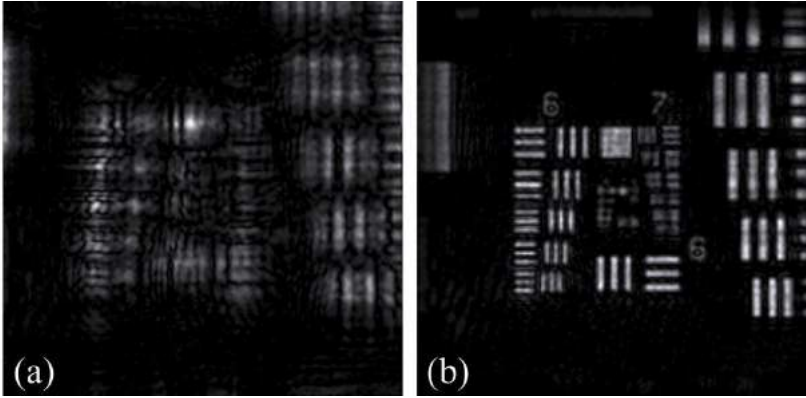


Fig. 46 Ejemplo de la aplicación del algoritmo de reenfoque basado en la integral de Fresnel-Kirchhoff para un holograma digital por transmisión de un test USAF-1951 de alta resolución en negativo.

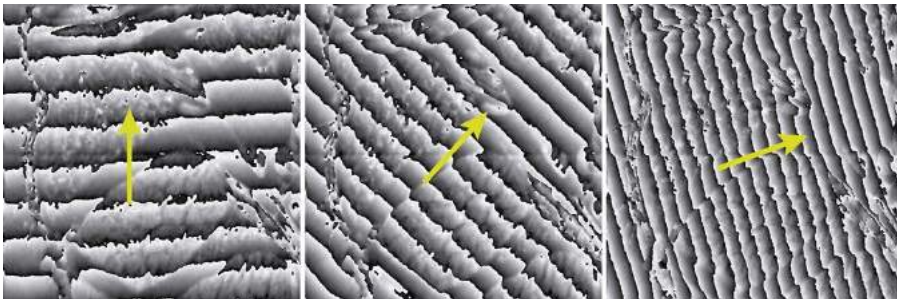


Fig. 47 Ejemplos de la fase obtenida tras el proceso de reconstrucción en holografía digital para una mala estimación del haz de referencia numérico. Las flechas representan la dirección de variación del error de fase residual.

5.3. Holografía digital aplicada a la microscopía

Para realizar el grabado de un holograma digital de una muestra microscópica es necesario introducir un objetivo de microscopio en el haz objeto de tal forma que éste produzca la imagen de la muestra en el espacio imagen. Si bien la holografía implica el registro de la interferencia de un patrón de difracción del objeto con un haz de referencia, en microscopía holográfica digital (DHM) el

haz objeto contiene la información de un patrón de difracción de la imagen de un objeto proporcionada por el objetivo de microscopio. Como veremos, esta técnica permite la reconstrucción del frente de onda complejo difractado por muestras microscópicas, proporcionando además información de su estructura axial con una precisión de, al menos, un orden de magnitud menor que la extensión de la PSF en dicha dirección⁷³. Estrictamente, el sistema no posee resolución axial (ya que carece de seccionado óptico) pero permite obtener información topográfica de la muestra⁷⁴. Típicamente, el objetivo empleado está corregido a distancia finita^{71,75,76}. Esto implica que, como vimos en la sección 2.1, la distribución compleja de amplitudes en el espacio imagen del mismo se encuentra distorsionada por un factor de onda esférico.

El montaje experimental empleado en el desarrollo de este Capítulo, así como un esquema del mismo, se pueden ver en la Fig. 48. En él, empleamos la salida de una fibra óptica acoplada a un láser He-Ne ($\lambda=632.8$ nm) para generar una fuente puntual. Una lente de 200 mm de distancia focal produce un haz colimado, que se divide en dos mediante un divisor de haz (BS1), que junto a una pareja de espejos (M1 y M2) y otro divisor (BS2) constituyen un montaje típico de Mach-Zehnder. Uno de los haces, el haz objeto, atraviesa la muestra, un sistema formador de imágenes compuesto por un objetivo de microscopio corregido al infinito y una lente de tubo situada a una distancia d del plano de la pupila del primero. En el otro haz, el haz de referencia, se coloca una rueda de filtros neutros con el fin de controlar la intensidad relativa entre ambos haces. Tras ser reflejado por un segundo espejo (M2), llega hasta el plano en el cual se sitúa una cámara CCD (1248×1024 píxeles de 6.9 μm de tamaño) con un cierto ángulo respecto al haz objeto generado por el segundo divisor de haz (BS2).

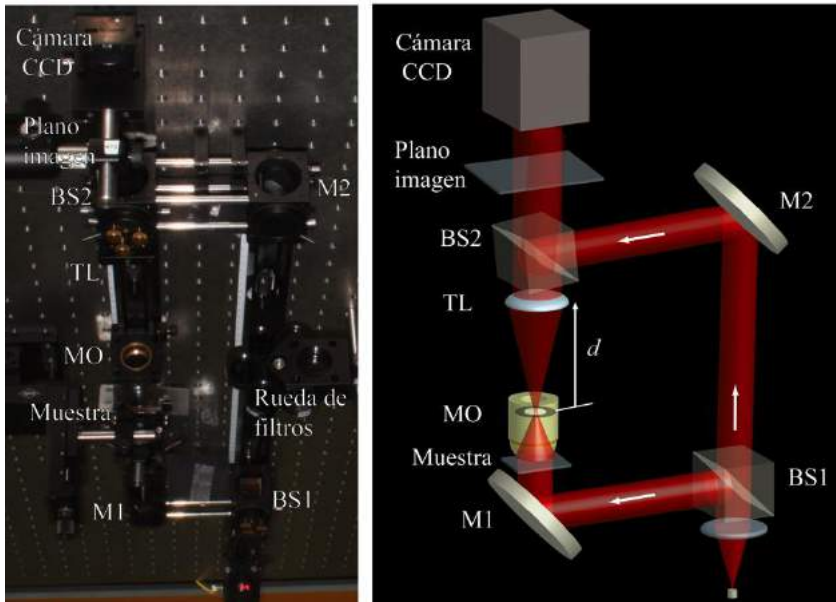


Fig. 48 Fotografía y esquema del montaje experimental del DHM basado en un interferómetro Mach-Zehnder empleado en esta Memoria.

En la Fig. 49(a) se muestra el mapa de fase obtenido tras compensar el haz de referencia de la imagen de un corte de una cabeza de mosca (*drosophila melanogaster*) empleando un objetivo $10\times NA=0.45$. En la Fig. 49(b) se muestra la reconstrucción final tras corregir el factor esférico empleando un algoritmo típico basado en el ajuste polinomial de dicho factor tras realizar la desenvoltura de la fase mostrada en Fig. 49(a). Como se puede observar, a pesar de que el resultado parece aceptable, tanto la desenvoltura de la fase como la compensación del factor de fase introducen ciertos errores⁷⁷, como veremos más adelante.

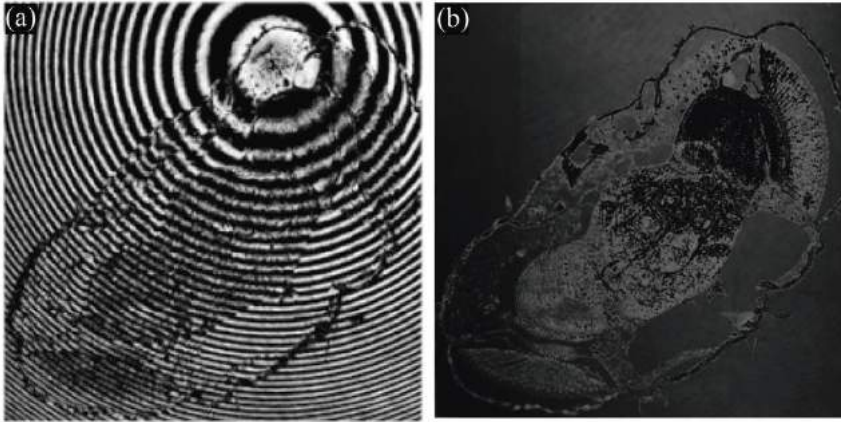


Fig. 49 (a) Mapa de fase obtenida de un corte de la cabeza de una *drosophila melanogaster* en presencia de un factor de fase esférico. (b) Mapa de fase tras la aplicación de un método numérico para compensar la presencia del factor de fase cuadrático.

Con el fin de corregir estas distorsiones de fase se han propuesto distintas estrategias tanto numéricas^{75,78-82} como ópticas⁷⁶. Quizá las más extendidas sean las primeras y todas ellas se basan en encontrar el factor numérico que compensa la curvatura del haz en el plano de reconstrucción. Normalmente, estos métodos exigen de una desenvolvura de la fase con el fin de realizar un ajuste polinomial en dos direcciones perpendiculares de un plano transversal. Con ello es posible encontrar el radio de curvatura y su centro, de manera que para obtener la fase de la muestra se debe sustraer un factor de fase con los parámetros obtenidos tras el ajuste. Por otro lado, es posible compensar físicamente la curvatura del haz introduciendo exactamente los mismos elementos ópticos en el haz de referencia. Obviamente esto implica el aumento del coste del sistema, reduce la flexibilidad a la hora de emplear distintos objetivos de microscopio y, además, requiere de una perfecta alineación de todos los elementos ópticos.

5.4. Sistema afocal-telecéntrico en DHM

Una forma alternativa de corregir o, en este caso, de evitar que se genere un factor de fase esférico residual a la salida del microscopio empleado para producir la imagen del objeto es el uso de un sistema afocal-telecéntrico^{83,84}. Como vimos en la Ec.(2.18), este tipo de sistemas permiten transmitir la distribución compleja de amplitudes del objeto a su imagen sin añadir ninguna distorsión en su fase. Es fácil ver, pues, que si se ilumina la muestra mediante un haz plano y se realiza la imagen de la misma empleando un sistema afocal-telecéntrico, en el espacio imagen tendremos un haz plano distorsionado exclusivamente por las variaciones de fase introducidas por la muestra. En la Fig. 50 se muestran el mapa de fase y su representación 3D obtenidos directamente de la reconstrucción del holograma empleando la misma muestra y el mismo sistema que en la obtenida en la Fig. 49, pero con la lente de tubo y el objetivo en configuración afocal-telecéntrica. Si se comparan ambas imágenes, resulta claro ver que el sistema afocal-telecéntrico proporciona un mejor resultado, libre de modulaciones residuales de fase. Además, el empleo de este tipo de sistemas posee numerosas ventajas con respecto a los comúnmente usados en DHM. La compensación directa del factor de fase cuadrático implica que, en el caso de muestras delgadas, no se requiere emplear un algoritmo de desvoltura de fase los cuales, por lo general, requieren un cierto tiempo de cálculo y son muy sensibles a variaciones grandes de fase debido a la ambigüedad intrínseca de dichas variaciones (podrían existir saltos de fase mayores a 2π , en cuyo caso el algoritmo no sería capaz de detectar dicho salto). Por otro lado, en presencia de una cierta curvatura del haz objeto, el campo en el espacio imagen del microscopio cambia a medida que varía la distancia con respecto al plano de la imagen, según la relación dada por la Ec.(2.7). Por el contrario, empleando un sistema afocal-telecéntrico el campo en el espacio imagen se mantiene prácticamente constante (variará muy ligeramente en su propagación libre debido a la divergencia de un haz láser colimado de unos 15 mm de cintura). Como consecuencia, el holograma capturado a distancias prácticas, en las que apenas se percibe la divergencia del haz, posee el

mismo campo independientemente de la distancia a la que se coloca la cámara CCD con respecto al plano imagen del microscopio.

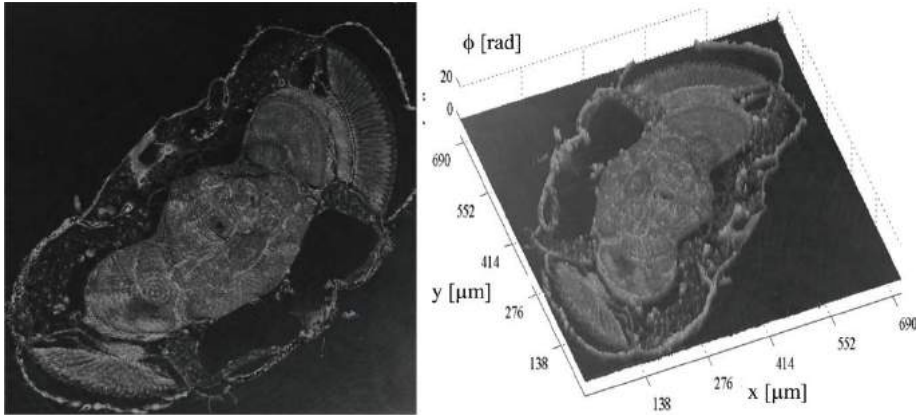


Fig. 50 Mapa de fase y su correspondiente representación 3D para un corte de la cabeza de una *drosophila melanogaster* empleando un objetivo $10\times NA=0.45$ en configuración afocal-telecéntrica con la lente de tubo.

5.5. Optimización de los parámetros de captura

En este apartado realizaremos un estudio general de las condiciones óptimas de captura en un sistema DHM con el fin de obtener una reconstrucción con la mejor calidad posible (tanto en fase como en amplitud) y que aproveche el rendimiento proporcionado por los elementos ópticos del sistema⁸⁵. Tendremos en cuenta la posible curvatura del frente de onda debido a la introducción del objetivo de microscopio en el haz objeto y consideraremos que el haz de referencia es una onda plana. Con el fin de poder estudiar tanto teórica como experimentalmente el efecto de la distorsión del frente de onda objeto por una curvatura cualquiera C , partiremos de un sistema formado por un objetivo de microscopio y una lente de tubo separados una cierta distancia d . Variando dicha distancia es posible generar distintas curvaturas del haz a la salida de la lente de tubo (TL) tal como se muestra en la Fig. 51. Como hemos visto, me-

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

diante la holografía digital tenemos acceso a la distribución compleja de amplitudes del haz objeto por lo que, en primer lugar, estudiaremos la formación de imágenes a través del sistema de manera puramente coherente. Así, si suponemos que tenemos un objeto delgado, de transmitancia en amplitud $o(\mathbf{x})$, situado en el foco objeto del objetivo del microscopio, la distribución compleja de amplitudes en el plano de su pupila vendrá dada por

$$U_p(\mathbf{x}) = \frac{\exp(i2kf_{MO})}{i\lambda f_{MO}} \tilde{o}\left(\frac{\mathbf{x}}{\lambda f_{MO}}\right) p(\mathbf{x}), \quad (5.23)$$

donde f_{MO} es la focal del objetivo de microscopio. Dado que la configuración del sistema no tiene por qué ser afocal-telecéntrica en este caso, el frente de onda en el plano focal imagen de la lente de tubo será

$$U'(\mathbf{x}) = \frac{-\exp[ikL_0]}{i\lambda^2 f_{MO} f_{TL}} \exp\left[ik \frac{1-d/f_{TL}}{2f_{TL}} |\mathbf{x}|^2\right] \int \int_{-\infty}^{\infty} d^2\mathbf{x}_0 \tilde{o}\left(\frac{\mathbf{x}_0}{\lambda f_{MO}}\right) p(\mathbf{x}_0) \exp\left[-i \frac{2\pi}{\lambda f_{TL}} (\mathbf{x}_0 \cdot \mathbf{x})\right], \quad (5.24)$$

donde f_{TL} es la distancia focal de la lente de tubo, $L_0 = 2f_{MO} + d + f_{TL}$ y d es la separación entre el plano de la pupila del objetivo de microscopio y dicha lente de tubo. Identificando la transformada de Fourier 2D en la Ec.(5.24), es posible escribir dicha ecuación como

$$U'(\mathbf{x}) = \exp[ikL_0] \exp\left[\frac{ik}{2C} |\mathbf{x}|^2\right] \left\{ \frac{1}{M} o\left(\frac{\mathbf{x}}{M}\right) \otimes_2 \tilde{p}\left(\frac{\mathbf{x}}{\lambda f_{TL}}\right) \right\}, \quad (5.25)$$

siendo $M = -f_{TL}/f_{MO}$ el aumento lateral del microscopio y $C = f_{TL}^2/(f_{TL} - d)$ el radio curvatura del frente de onda complejo en el plano imagen de la lente de tubo.

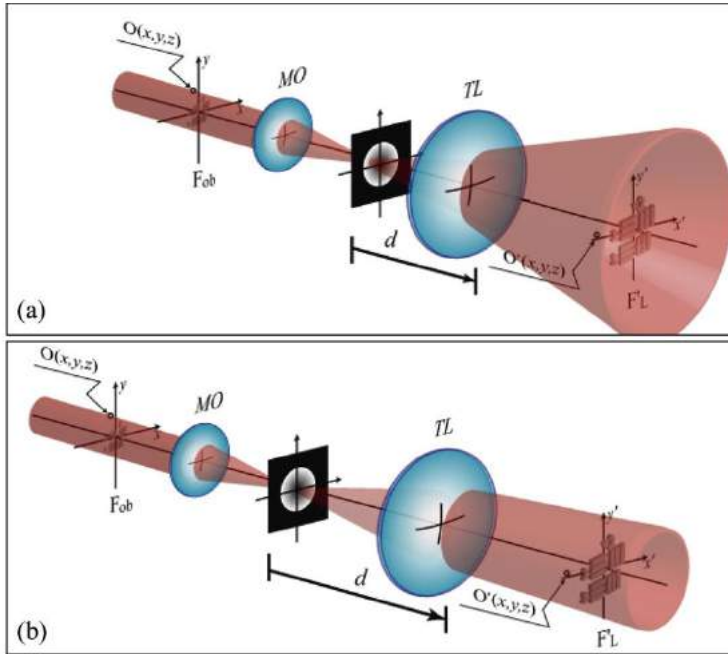


Fig. 51 Esquema del sistema formador de imágenes coherente empleado por nuestro DHM para (a) d tal que el frente de onda complejo a la salida de la lente de tubo presenta una cierta curvatura, y; (b) caso en el que d es tal que a la salida se tiene un frente compuesto por la información de la imagen del objeto y un haz plano.

Como vemos, tenemos un factor de fase cuadrático que multiplica a la distribución compleja de amplitudes imagen proporcionada por el microscopio. Nótese que si se detecta la distribución de intensidades del campo, dicho factor de fase no tiene ningún efecto en la formación de imágenes. Sin embargo, como hemos visto, mediante la holografía digital es posible recuperar el frente de onda complejo difractado por el objeto y, por tanto, dicho factor de fase tendrá un gran efecto en la formación de imágenes a través del sistema, no solo en fase sino también en amplitud. Considerando pues el registro de un holograma digital mediante la interferencia de una referencia plana con un patrón de difracción de $U'(\mathbf{x})$ localizado a una distancia z de este, tenemos la

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

siguiente distribución de intensidades en el plano de captura

$$I_z(\mathbf{x}) = |U_z(\mathbf{x})|^2 + |R(\mathbf{x})|^2 + U_z(\mathbf{x})R^*(\mathbf{x}) + U_z^*(\mathbf{x})R(\mathbf{x}), \quad (5.26)$$

siendo

$$U_z(\mathbf{x}) = \frac{i}{\lambda z} \exp[ikz] U'(\mathbf{x}) \otimes_2 \exp\left[\frac{ik}{2z} |\mathbf{x}|^2\right]. \quad (5.27)$$

Nuevamente, realizando la transformada de Fourier 2D de la distribución de intensidades dada por la Ec.(5.26) obtenemos

$$\tilde{I}_z(\mathbf{u}) = DC(\mathbf{u}) + \tilde{U}_z(\mathbf{u}) \otimes_2 \delta(\mathbf{u} - \mathbf{k}) + \tilde{U}_z^*(\mathbf{u}) \otimes_2 \delta(\mathbf{u} + \mathbf{k}), \quad (5.28)$$

siendo \mathbf{k} el vector de onda del haz de referencia con respecto al eje óptico.

A continuación estudiaremos la forma que poseen los tres términos de la ecuación anterior y el espacio que ocupan en el dominio de Fourier. En primer lugar, consideremos el orden cero (DC), esto es

$$DC(\mathbf{u}) = \delta(\mathbf{u}) + \{\tilde{o}(M\mathbf{u})p(\lambda f_{TL}\mathbf{u})\} *_2 \{\tilde{o}(M\mathbf{u})p(\lambda f_{TL}\mathbf{u})\}. \quad (5.29)$$

Como era de esperar, este término no posee ninguna información de fase y, por tanto, su forma no dependerá del factor de fase cuadrático. Su extensión vendrá fijada por el tamaño de la función pupila $p(\mathbf{x})$. Para una pupila circular clara tenemos

$$p(\lambda f_{TL}\mathbf{u}) = \text{circ}\left(\frac{\lambda f_{TL}}{r} |\mathbf{u}|\right). \quad (5.30)$$

donde r es el radio en el plano de la pupila del sistema. Por tanto, el radio de la función pupila en el espacio de Fourier vendrá dado por $\rho = r/\lambda f_{TL}$. Dado que la extensión del término DC está determinada por la autoconvolución de dos pupilas, su extensión en el dominio de Fourier se corresponderá con la de un círculo de radio 2ρ .

Los otros dos términos contienen información de la distribución compleja de amplitudes del haz objeto y, por tanto, su forma dependerá fuertemente de

la curvatura de dicho haz. Empezaremos tratando el caso límite en el cual dicha curvatura sea nula o, lo que es lo mismo, el radio de curvatura tienda a infinito.

Caso límite: $C \rightarrow \infty$

A partir de la definición del radio de curvatura C del frente de onda es fácil ver que dicho factor tiende a infinito únicamente si se cumple que $d = f_{TL}$, es decir, cuando el sistema es afocal-telecéntrico. En este caso el factor de fase cuadrático multiplicativo en la Ec.(5.25) desaparece y, por tanto, en el dominio de Fourier el orden +1 del holograma digital puede expresarse en la forma

$$\tilde{U}_z(\mathbf{u})|_{C \rightarrow \infty} = \{\tilde{o}(M\mathbf{u}) p(\lambda f_2 \mathbf{u})\} \exp[-i\pi\lambda z |\mathbf{u}|^2]. \quad (5.31)$$

El orden -1 presentará la misma forma exceptuando un cambio de signo en los factores de fase. Podemos concluir, a partir de la ecuación anterior, que los términos +1 y -1 serán sendos círculos de radio ρ y que, además, la forma de ambos términos será completamente independiente de la distancia de adquisición del holograma digital.

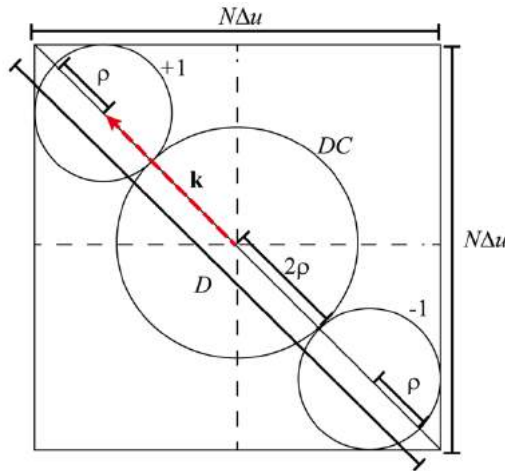


Fig. 52 Representación del ancho de banda de un holograma digital capturado mediante un sistema afocal-telecéntrico en el cual éste se optimiza.

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

En este punto se pueden establecer las condiciones de uso optimizado del sistema formador de imágenes a partir del máximo aprovechamiento del espacio-ancho de banda del holograma digital. Como hemos visto el radio de la pupila en el espacio de Fourier vale $\rho = r/\lambda f_{TL}$, que puede reescribirse en función de los parámetros del sistema formador de imágenes, esto es, en función de su aumento lateral y su apertura numérica, de forma que $\rho = NA/(\lambda M)^{54}$. Por simplicidad, consideraremos que nuestra cámara es un detector cuadrado de $N \times N$ pixeles de $(\Delta p, \Delta p)$ de tamaño. Siguiendo la relación de tamaños entre el espacio imagen y su espacio recíproco al realizar la transformada de Fourier discreta, el ancho de banda total vendrá dado por $N \Delta u$, siendo Δu el tamaño correspondiente del pixel en el espacio de Fourier. En la Fig. 52 la línea solida representa el caso en el que se aprovecha al máximo posible el ancho de banda del sistema sin que exista solapamiento entre el orden cero y el orden +1, a la vez que se tiene un sistema limitado por difracción. Es fácil ver, a partir de cálculos geométricos, que la relación entre el radio y la diagonal del ancho de banda del sensor debe cumplir la siguiente condición

$$D = 2\rho'_{TM} (3 + \sqrt{2}), \quad (5.32)$$

siendo ρ'_{TM} el radio que optimiza el ancho de banda para el caso de un sistema afocal-telecéntrico. Teniendo en cuenta que $\Delta u = 1/(N\Delta p)$, el tamaño de la diagonal del ancho de banda será $D = \sqrt{2}/\Delta p$. A partir de estas fórmulas, llegamos a la conclusión que, para que el sistema esté limitado en difracción y que, además, no exista solapamiento entre órdenes, el radio de la pupila en el espacio de Fourier del sistema telecéntrico debe cumplir la siguiente condición

$$\rho_{TM} \leq \frac{1}{\sqrt{2}(\sqrt{2} + 3)\Delta p}, \quad (5.33)$$

con lo que

$$\frac{NA}{M} \leq \frac{\lambda}{\sqrt{2}(\sqrt{2}+3)\Delta p}. \quad (5.34)$$

Como era de esperar, esta condición depende tanto de los parámetros del sistema óptico como del sensor. En la Fig. 53 se representa el valor mínimo que debe tener el píxel para cumplir esta condición para algunos objetivos de microscopio de uso común y $\lambda=632.8$ nm. En un primer momento podría sorprendernos que la condición impuesta para una captura óptima no dependa del número de píxeles del sensor, si bien podemos entender que esto ocurra a partir del siguiente argumento: a pesar de que hemos logrado encontrar una relación que optimiza el sistema en el espacio de Fourier, dicha relación no es más que la imposición de un cierto muestreo sobre la APSF2D del sistema de captura. Como vemos, esta condición es distinta a la obtenida en un sistema convencional (ver ANEXO 3). El número de píxeles controlará, obviamente, el campo que estamos capturando y, a su vez, el muestreo que realizamos del espacio de Fourier. En la Fig. 54 mostramos la simulación de la captura de un holograma digital limitado por la difracción y con ancho de banda optimizado mediante un sistema afocal-telecéntrico para distinto número de píxeles del sensor. Si bien es difícil imponer una condición objetiva, en este caso vemos que para un bajo número de píxeles ($N=128$) es posible distinguir los tres órdenes del holograma con lo que, podríamos realizar el filtrado del orden +1.

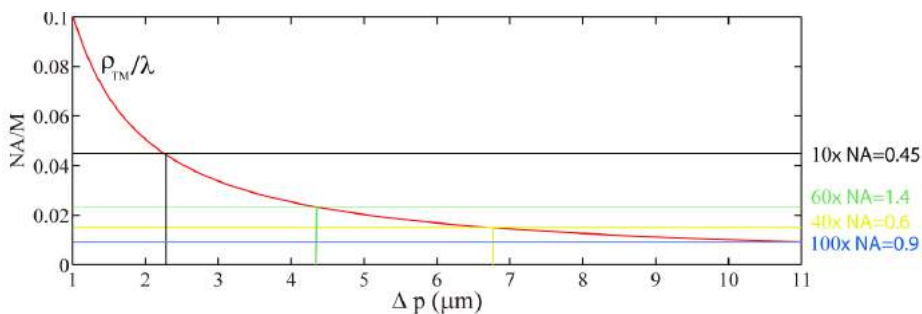


Fig. 53 Representación del valor de la pupila del sistema que optimiza la captura de hologramas digital en DHM en función del tamaño del píxel.

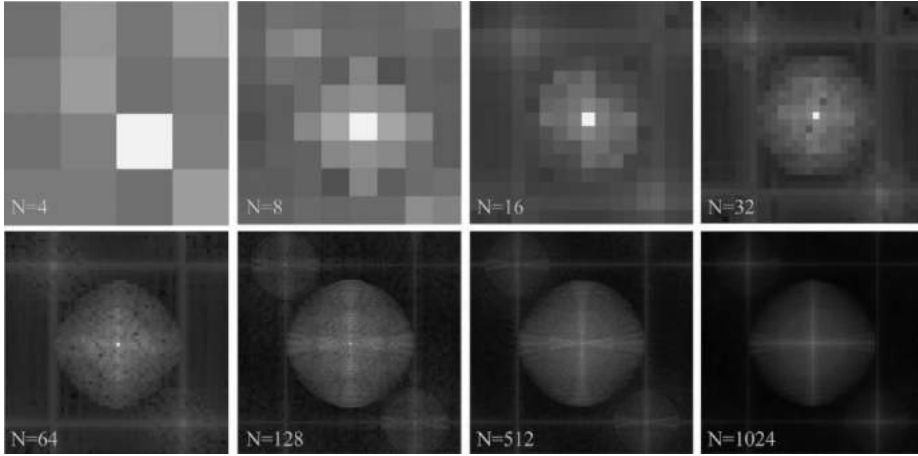


Fig. 54 Simulación del espacio de Fourier de un holograma digital limitado en difracción y con uso optimizado del espacio ancho de banda del sensor para distinto número de píxeles del mismo. Como objeto se emplea un test USAF 1951.

Para poder obtener la Ec.(5.34) hemos asumido que los órdenes +1 y -1 están completamente separados del orden cero, tal como muestra la Fig. 52. Sin embargo, para que esto se cumpla debemos añadir una nueva condición al ángulo del haz de referencia, es decir, se tiene que cumplir que $|\mathbf{k}_{TM}| \leq 3\rho_{TM}$, donde \mathbf{k}_{TM} es el vector de onda del haz de referencia del sistema afocal-telecéntrico y, al emplear un sensor cuadrado, $k_{TM,x} = k_{TM,y}$. Sustituyendo obtenemos que

$$\frac{NA}{M} \leq \frac{2\sqrt{2}\pi}{3} \sin \theta, \quad (5.35)$$

donde θ es el ángulo formado por el vector de propagación del frente de onda objeto y el correspondiente para el haz de referencia. Esto añade una nueva condición al ángulo del haz de referencia. Recordemos que la Ec. (5.17) nos daba el máximo ángulo permitido para poder registrar el holograma, mientras que ahora tenemos un ángulo mínimo que garantiza el solapamiento entre órdenes. Juntando ambas condiciones obtenemos

$$\sin^{-1}\left(\frac{3}{2\sqrt{2\pi}}\frac{NA}{M}\right) \leq \theta \leq \frac{\lambda}{2\Delta p}. \quad (5.36)$$

Podemos concluir que siempre que se cumplan las condiciones anteriores en un DHM que emplee un sistema afocal-telecéntrico estaremos garantizando que nuestro sistema está limitado por la difracción (no por los parámetros del sensor) y que, además, las reconstrucciones obtenidas mediante el mismo estarán libres del posible ruido fruto del solapamiento entre el orden +1 y el orden cero.

Caso general: C tomando un valor cualquiera

Estudiemos ahora el caso en el que la curvatura puede tomar cualquier valor, es decir, opera de forma que el sistema no es afocal-telecéntrico. Dado que el orden cero no se ve afectado por dicha curvatura, seguirá presentando la misma forma que en el caso anterior. Sin embargo, como puede verse de la Ec. (5.25), tanto el orden +1 como el -1 se verán afectados de cierta forma por el valor de C . De hecho, si realizamos la transformada de Fourier de dicha ecuación obtenemos que

$$U'(\mathbf{u}) = K \exp\left[-i\pi\lambda C|\mathbf{u}|^2\right] \otimes_2 \left\{ \tilde{o}(M\mathbf{u}) p(\lambda f_{TL}\mathbf{u}) \right\}, \quad (5.37)$$

donde K es una cierta constante irrelevante. Por tanto, Los órdenes +1 y -1 de un holograma digital capturado mediante un sistema que no sea afocal-telecéntrico son tales que lo que podríamos llamar el “espectro puro” de la imagen aparece convolucionado por un factor de fase cuadrático. Recordando la Ec.(2.1), podemos deducir que en la transformada de Fourier del holograma los órdenes +1 y -1 vendrán dados por lo que podríamos considerar como un patrón de difracción del espectro de la imagen. Además, si comparamos la Ecs. (2.1) y (5.38), vemos que la variación en dicha propagación equivalente va a ocurrir de forma rápida, es decir, que pequeñas variaciones del factor de curvatura C supondrán grandes cambios en la transformada de Fourier. Tanto es así, que en la transformada de Fourier del holograma digital simulado empleando un test USAF 1951 como muestra que se presenta en la Fig. 55(b),

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

para un factor de curvatura equivalente a $C=266$ mm y teniendo en cuenta los parámetros de captura de nuestro sistema ($\lambda=632.8$ nm, 1024×1024 pixeles de $6.9 \mu\text{m}$), los órdenes +1 y -1 presentan una forma similar a un patrón de difracción próximo al objeto. Podemos entender este hecho a partir del siguiente razonamiento: para dicho valor de curvatura el espectro se convoluciona con un factor de fase cuadrático tal que éste sufre una propagación equivalente a un plano próximo a lo que consideraríamos difracción de Fraunhofer²⁰ en el espacio real, es decir, cercano a un plano en el que se tiene la transformada de Fourier del espectro de la imagen (o lo que es lo mismo, la propia imagen).

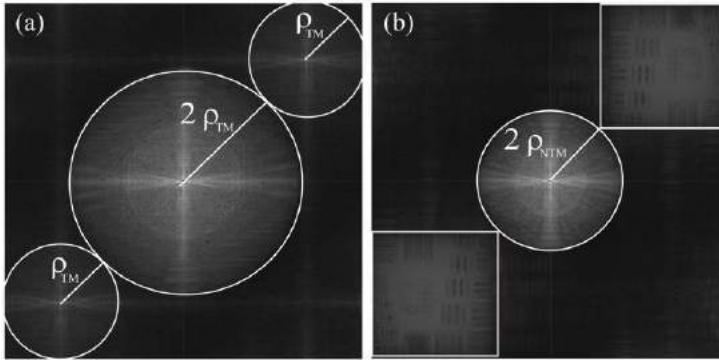


Fig. 55 Espectros de los hologramas obtenidos en un DHM limitado en difracción para: (a) el caso afocal-telecéntrico, y; (b) $C=266$ mm.

Como se puede ver en la comparación de la Fig. 55, cuando el microscopio empleado es tal que genera un factor de fase esférico a la salida del mismo, tenemos que emplear otras condiciones para la optimización del proceso de filtrado (tanto para la pupila como para el ángulo de la referencia) si queremos que los tres órdenes del holograma digital permanezcan aislados. Para poder hacer una estimación teórica de dicha variación, realizamos la siguiente consideración: dado que el ensanchamiento de los órdenes +1 y -1 puede verse como una propagación en el espacio de Fourier que, además, ocurre muy rápidamente supondremos que toda la información espectral del objeto está

contenida en una ventana cuadrada cuya anchura viene dada por el elemento “más difractante” del espectro, esto es, el pixel central de cada uno de los órdenes. Esta consideración se ilustra en la Fig.56, en la cual podemos ver la forma del orden +1 conforme la curvatura aumenta, o lo que es lo mismo, a medida que el radio de curvatura disminuye.

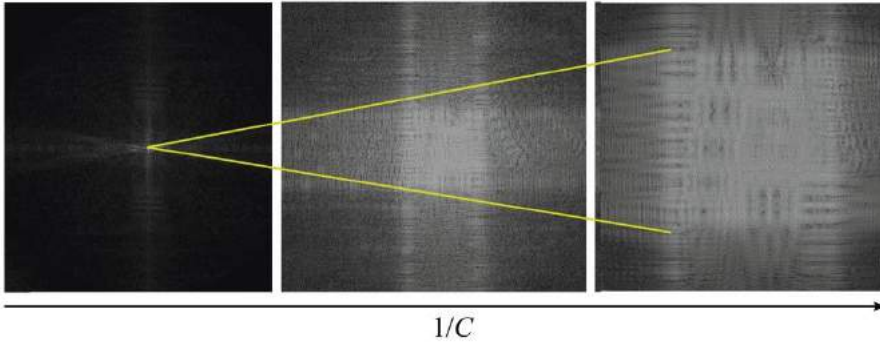


Fig. 56 Simulación de la forma del espectro del orden +1 de un holograma digital de un test USAF 1951 conforme el valor de la curvatura C aumenta.

A partir de la consideración anterior, es fácil obtener cual será el tamaño de la ventana en función de los parámetros de la cámara, así como del radio de curvatura⁸⁵. Si consideramos únicamente el pixel central del orden +1, suponiendo que éste está centrado en el origen de las frecuencias espaciales, tendremos que la ventana de salida tendrá la siguiente forma

$$\tilde{U}_z(\mathbf{u}) = \exp[-i\pi\lambda(C+z)|\mathbf{u}|^2] \mathfrak{F}\left(\text{rect}(\mathbf{u}_0/\Delta u) \exp(-i\pi C|\mathbf{u}_0|^2)\right), \quad (5.39)$$

donde la relación de tamaños entre el pixel considerado y la ventana de salida viene dada directamente por la relación de los espacios considerados en la transformada de Fourier (el espacio del espectro imagen puro y el espacio del espectro propagado). Obtenemos por tanto la siguiente relación

$$\Delta u = \frac{N^2 \Delta p^2 (C+z)}{\lambda C^2} \Delta u_0. \quad (5.40)$$

De la ecuación anterior sacamos las siguientes conclusiones:

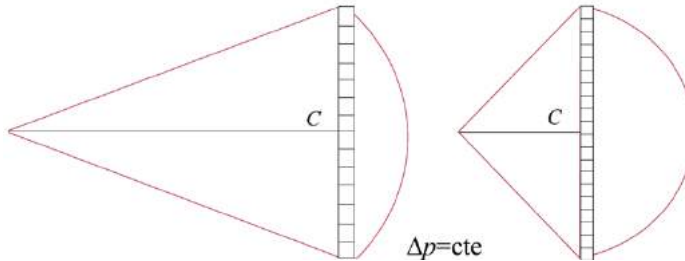


Fig. 57 Representación de la variación de la curvatura capturada del frente de ondas complejo capturado por el sensor en un DHM si se aumenta el número de píxeles para un tamaño de los mismos constante.

i) El tamaño de la ventana de salida tiene una dependencia cuadrática con el tamaño del sensor. Esto es fácil de entender ya que, si fijamos por ejemplo el tamaño del píxel, un mayor número de píxeles hará que el sensor sea más sensible a la curvatura del haz, tal como se ilustra en la Fig. 57.

ii) Existe, como era de esperar, una dependencia con la distancia de captura. Nótese que dicha distancia es orientada y que, por tanto, para planos posteriores al plano imagen z tendrá un valor negativo. En consecuencia, si se aumenta la distancia de captura del holograma es posible reducir el efecto de la curvatura.

A pesar de la conclusión (ii), se ha demostrado que el algoritmo de reconstrucción que mejores resultados presenta a la hora de emplear hologramas digitales es el basado en la propagación por medio del espectro angular⁸⁶. Dicho algoritmo requiere valores de z pequeños, despreciables con respecto a la curvatura típica de un objetivo de microscopio corregido a distancia finita.

Consideraremos que la distancia de grabado del holograma z es despreciable con respecto a C , con lo que el tamaño de la ventana de salida con respecto al tamaño del píxel en el espacio de Fourier será

$$\Delta u = \frac{N^2 \Delta p^2}{\lambda C} \Delta u_0 . \quad (5.41)$$

Con el fin de comprobar que la variación del tamaño de los órdenes +1 y -1 ocurre tal como dicta la ecuación anterior, realizamos el siguiente experimento. Empleando un objetivo 10×, $NA=0.45$, se realiza la adquisición de 90 hologramas sin objeto, partiendo de la posición telecéntrica y alejándonos del plano imagen con pasos de 2 mm. Realizando la transformada de Fourier de cada uno de ellos y trazando el promedio de los perfiles en las direcciones vertical y horizontal de la misma, de forma que ambos contengan el pixel central del orden +1, se obtiene la gráfica que se representa en la Fig. 58.

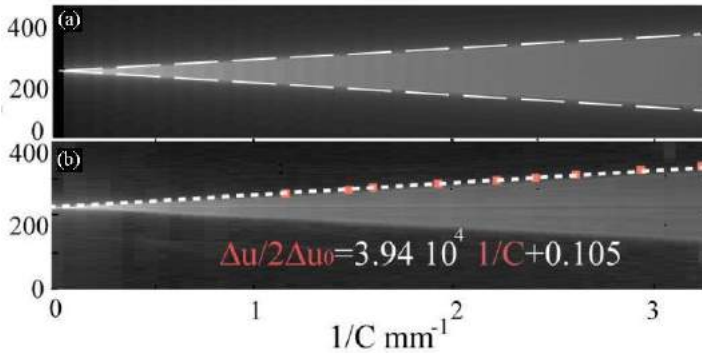


Fig. 58 Comparación del (a) valor teórico de la expansión de los órdenes +1 y -1 de un holograma digital para distintos valores del radio de curvatura según predice la Ec.(5.41) con (b) el valor experimental obtenido de la adquisición de 90 hologramas variando progresivamente la distancia entre la lente de tubo y el objetivo de microscopio.

Trazando una recta a partir de los puntos que delimitan el tamaño del orden +1 para distintos valores de la curvatura, podemos hacer un ajuste lineal de la misma. Teniendo en cuenta que estamos midiendo la mitad de la ventana de salida, se obtiene un valor para la pendiente de $3.94 \cdot 10^4$ mm con una correlación de 0.996. Si realizamos el cálculo teórico de ese mismo valor, introduciendo los parámetros experimentales en la Ec. (5.41) se obtiene un valor $3.9496 \cdot 10^4$ mm. Comprobamos con ello que la predicción teórica realizada se cumple.

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

Una vez conocida como es la variación del tamaño de los órdenes +1 y -1 en función de la curvatura y basándonos en el esquema presentado en la Fig. 59, podemos definir una serie de condiciones que optimicen la captura para cualquier valor de C . Distinguiremos tres casos posibles:

$$(1) C \geq \frac{\sqrt{2}N\Delta p}{2\lambda\rho_{TM}}$$

Para este valor de C el tamaño de la ventana de salida es menor que el círculo que delimita el orden +1 en el sistema afocal-telecéntrico por lo que, idealmente, consideraremos que podemos seguir filtrando de la misma manera que lo hacíamos para dicho sistema.

$$(2) \frac{\sqrt{2}N\Delta p}{2\lambda\rho_{TM}} > C \geq \frac{N\Delta p}{2\lambda\rho_{TM}}$$

Conforme el valor de C disminuye, los órdenes +1 y -1 se expanden a una ventana mayor que el círculo que define el espectro puro del objeto. En este caso, el espacio ancho de banda aprovechable, teniendo en cuenta la presencia del orden cero, disminuye ligeramente, concretamente siguiendo la siguiente ecuación

$$\rho_{NTM} \approx \frac{\sqrt{2}}{4\Delta p} - \frac{\sqrt{2}\Delta p}{4\lambda C}. \quad (5.42)$$

En otras palabras, la pupila permitida por el sistema bajo estas condiciones es ligeramente menor que aquella que podemos emplear en el caso afocal-telecéntrico.

(Nota: Para estos dos primeros casos, el valor del vector \mathbf{k} es el mismo que para el caso telecéntrico.)

$$(3) C < \frac{N\Delta p}{2\lambda\rho_{TM}}$$

En este caso el espaciamiento de los órdenes es tal que debemos cambiar el ángulo de la referencia, siguiendo la relación siguiente

$$|\mathbf{k}_{NTM}| \leq \frac{\sqrt{2}}{2} \left(\frac{1}{\Delta p} - \frac{N\Delta p}{\lambda C} \right) \quad (5.43)$$

y permitiendo un radio de la pupila cada vez menor conforme C disminuye, siguiendo la tendencia de la Ec.(5.42).

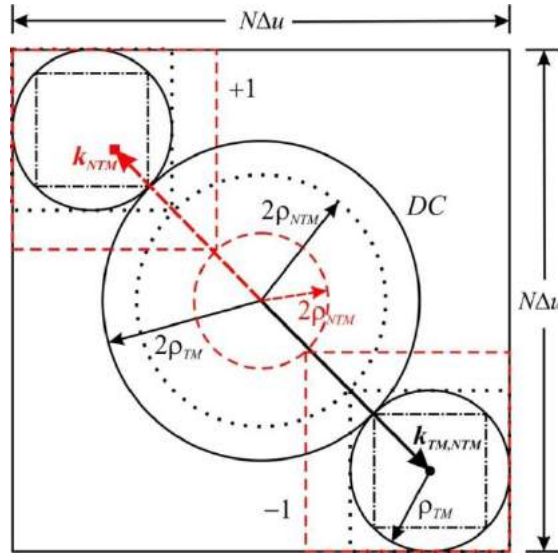


Fig. 59 Optimización del espacio de Fourier para distintos casos: la línea sólida representa el caso telecéntrico mientras que las líneas discontinuas representan casos en los que el haz objeto posee una cierta curvatura.

A la vista de las condiciones anteriores podemos decir que, si se emplea un objetivo que optimice el espacio-ancho de banda para el sistema afocal-telecéntrico, en presencia de una curvatura y para un mismo aumento, la NA del sistema se ve reducida.

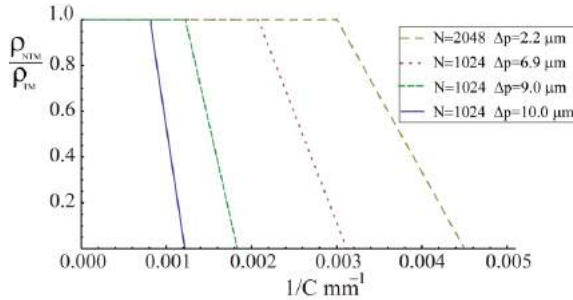


Fig. 60 Relación entre los radios de la pupila que permiten la optimización del espacio de Fourier para los casos afocal-telecéntrico (ρ_{TM}) y cuando existe una curvatura $1/C$ en el frente de onda objeto (ρ_{NTM}).

La relación entre los tamaños de pupila permitidos para la optimización del espacio de Fourier del holograma, en función de la curvatura y distintas características del sensor, se representa en la Fig. 60. Como podemos ver, la elección del tamaño del sensor puede ser crítica si existe un factor de fase cuadrático en el frente de onda objeto.

Por último, para representar cada uno de los casos expuestos anteriormente, realizamos el siguiente experimento como prueba de concepto. Empleando un objeto $2\times$ y $NA=0.075$, se realiza una captura con un sistema afocal-telecéntrico tal que optimiza el espacio-ancho de banda del sensor. Colocamos un diafragma de apertura variable en un plano próximo al de la pupila (idealmente debería ser dicho plano pero no tenemos acceso físico a él debido a la estructura del objetivo). Realizamos dos capturas más, para dos curvaturas distintas ($C=333\text{mm}$ y $C=250\text{mm}$) obtenidas mediante la variación de la distancia entre la lente de tubo y el objetivo de microscopio. Dado que estamos empleando el mismo aumento, cuando la curvatura disminuye debemos cerrar progresivamente el diafragma para que no exista superposición con el orden cero. Ello supone una disminución de la NA del sistema y, por tanto, una reducción equivalente de la resolución espacial del mismo. Las transformadas

de Fourier correspondientes a los distintos casos así como las reconstrucciones en amplitud obtenidas a partir de los mismos se muestran en la Fig. 61.

De todos los resultados obtenidos en esta sección y en la anterior podemos concluir que:

El empleo de un sistema afocal-telecéntrico en DHM no sólo evita la presencia de un factor de fase cuadrático que distorsiona la fase del objeto, sino que además permite una optimización más sencilla y cuyo único requerimiento es un buen muestreo de la PSF para el espacio-ancho de banda disponible para el orden +1. La detección de la referencia en este sistema es prácticamente directa, ya que viene dada por el pixel central del orden +1, el cual es claramente identificable. En presencia de curvatura, dicho pixel está esparcido de forma que la compensación del ángulo de la referencia no es trivial. Es posible plantearnos la captura en el plano imagen y no en un plano desenfocado cuando tenemos un sistema afocal-telecéntrico, siempre que la muestra que estemos empleando sea relativamente delgada en comparación a la profundidad del objetivo de microscopio. En el caso de presencia de curvatura, especialmente para objetivos corregidos a distancia finita, este proceso puede resultar imposible ya que la curvatura en dicho plano es mínima.

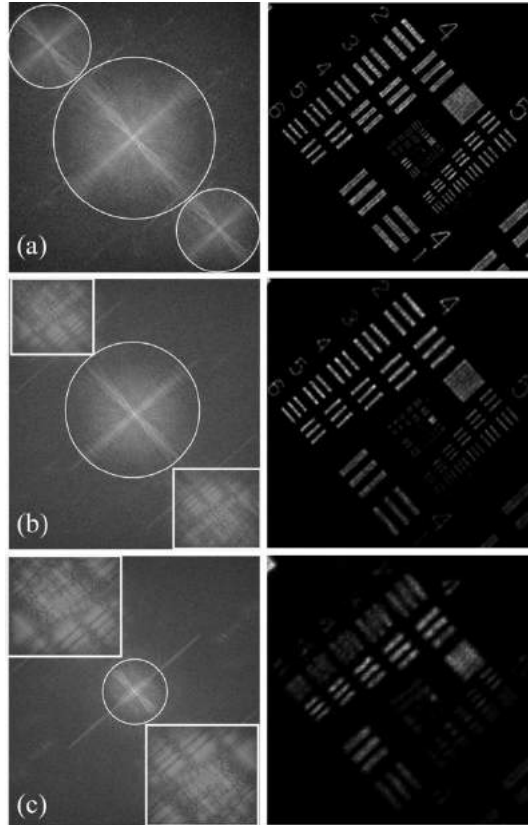


Fig. 61 Resultados obtenidos de los hologramas digitales por transmisión de un test USAF 1951 en negativo para valores de la curvatura (a) $C \rightarrow \infty$; (b) $C=333$ mm, y; (c) $C=250$ mm. Para optimizar el espacio-ancho de banda del sensor se emplea un diafragma de tamaño variable que impide el solapamiento entre órdenes.

5.6. Aplicación de la optimización de parámetros a la medida cuantitativa de fase de muestras biológicas

Basándonos en la optimización presentada en la sección anterior, el proceso de reconstrucción de los hologramas así como la medida de fase cuantitativa en muestras biológicas supone un proceso relativamente sencillo: en este caso no es necesario compensar el factor de fase cuadrático residual, lo que reduce

el número de parámetros necesarios para la obtención de la medida así como minimiza los posibles errores introducidos por los mismos y evita el proceso de desenvoltura de la fase para muestras delgadas^{77,87,88}. Como vimos en la sección 5.4 los efectos generados en el proceso pueden arruinar el mapa de fases cuantitativo obtenido, llegando a una medida errónea. Por otro lado la resolución del sistema viene fijada por las características de los elementos ópticos. Además, si sumamos la captura en plano imagen podemos implementar dicho sistema en un microscopio comercial añadiendo un pequeño número de elementos adicionales y reduciendo el número de operaciones necesarias para obtener una reconstrucción, lo cual disminuye notablemente el tiempo de cálculo del algoritmo de reconstrucción⁸⁹.

Actualmente el uso de esta técnica se está extendiendo al mostrarse su utilidad en la medida cuantitativa de cultivos celulares en tiempo real^{90,91}. Como ejemplo, en la Fig. 62 se muestra una la representación 3D de una medida cuantitativa en profundidad realizada con nuestro sistema y nuestro software (ver ANEXO 2) de un frotis de glóbulos rojos empleando un objetivo 50× y $NA=0.55$.

Por todo lo dicho en este Capítulo, conviene exigir al sistema sus máximas prestaciones para que las medidas sean fieles a la realidad, así como reproducibles bajo las mismas condiciones de captura. Para ello, debemos visualizar la técnica DHM como un proceso formador de imágenes a dos pasos: el primero basado en las propiedades puramente físicas del sistema formador de imágenes y el segundo debido al proceso numérico de reconstrucción.

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

Tabla 1

Procesos físicos	Procesos numéricos
Sistema formador de imágenes (PSF)	Filtrado espacial
Ángulo de grabado	Referencia numérica
Propagación en el espacio libre	Algoritmo de propagación

En la Tabla 1 se resumen tanto los procesos físicos como los numéricos necesarios para implementar la técnica DHM. Como puede observarse, los procesos listados para una misma fila son básicamente análogos por lo que para optimizar el sistema debemos imponer que cada proceso numérico sea lo más parecido a su equivalente físico. Nosotros hemos centrado nuestros esfuerzos en la optimización del filtrado espacial. Sin embargo, implícitamente, hemos dado con una solución sencilla para la compensación del ángulo de referencia, la cual no puede llevarse a cabo si no es con el empleo de un sistema afocal-telecéntrico. Para muestras que puedan considerarse delgadas, si imponemos la captura en el plano imagen, la tercera de las filas no sería requerida y, por lo tanto, podríamos decir que el sistema afocal-telecéntrico optimizado (en el que la resolución del sistema viene dada por los elementos ópticos) nos permite obtener la mejor reconstrucción de la distribución compleja de amplitudes que permite el método.

Todo lo dicho nos permitiría implementar nuestro sistema en un microscopio comercial añadiendo un pequeño número de elementos adicionales (como el del esquema mostrado en la Fig. 63) y reduciendo el número de operaciones necesarias para obtener la distribución compleja de amplitudes de la muestra, disminuyendo así el tiempo de cálculo del algoritmo de reconstrucción⁸⁹.

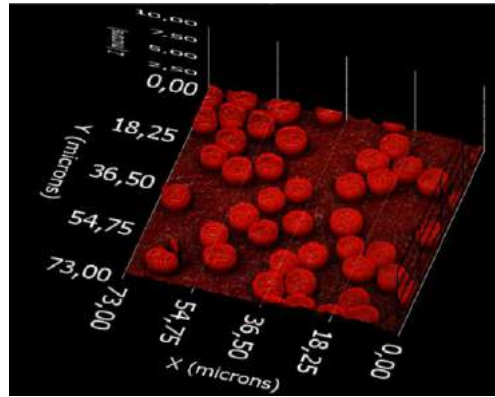


Fig. 62 Gráfica 3D de la medida en profundidad realizada mediante nuestro sistema DHM y nuestro software de captura (ver ANEXO 3) de una muestra de glóbulos rojos.

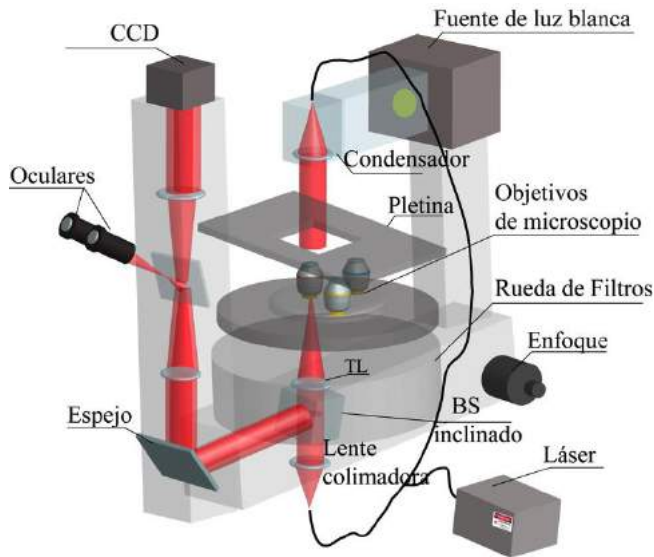


Fig. 63 Esquema de la incorporación de nuestro sistema DHM a un microscopio comercial invertido.

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

6. Microscopía holográfica digital por iluminación estructurada

The number of different optical phenomena has become in our time so great that caution must be taken so as to avoid being deceived, and also to refer the phenomena to the simple laws.

Joseph Von Fraunhofer, Memoirs (1810)

En el Capítulo 4 estudiamos la posibilidad de extender el soporte de la OTF en un microscopio por fluorescencia mediante el empleo de iluminación estructurada. Por otro lado, en el Capítulo 5 vimos que es posible recuperar la información del frente de onda complejo difractado por una muestra por medio de la microscopía holográfica digital.

En este Capítulo veremos que es posible aunar ambas técnicas con el fin de recuperar la información de la muestra con mayor resolución espacial, tanto en amplitud como en fase. Esta técnica y otras similares que consiguen mejorar la resolución de la reconstrucción obtenida mediante un microscopio holográfico digital han sido publicadas por distintos autores⁹²⁻⁹⁴, si bien en la mayor parte de los casos, se muestra una mejora de la resolución exclusivamente en la imagen reconstruida pero no en la fase.

6.1. Iluminación estructurada aplicada a DHM

Para poder aplicar la técnica de iluminación estructurada a un sistema de mi-

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

Microscopía holográfica digital (SI-DHM) es necesario proyectar un patrón cosenoidal sobre la muestra sin que dicho patrón afecte al haz de referencia. De esta forma, una vez se capture el holograma digital, se tendrán dos frecuencias espaciales portadoras: una de ellas correspondiente al holograma en sí y la otra generada por el patrón de iluminación estructurada.

Supongamos, pues, que tenemos un sistema DHM fuera de eje por transmisión en el cual una transmitancia objeto $o(\mathbf{x})$ se ilumina mediante un patrón cosenoidal. Si el microscopio está formado por un objetivo de microscopio y una lente de tubo en configuración afocal-telecéntrica, la distribución compleja de amplitudes en su plano imagen vendrá dada por

$$o'(\mathbf{x}) = \{o(\mathbf{x}/M) \cos[2\pi\mathbf{f} \cdot \mathbf{x}/M]\} \otimes_2 h(\mathbf{x}), \quad (6.1)$$

siendo $\mathbf{f} = (f_x, f_y)$ la frecuencia espacial del patrón cosenoidal, $h(\mathbf{x})$ la respuesta impulsional en amplitud (APSF2D) del microscopio, y M el aumento lateral del mismo.

En un cierto plano situado a una distancia z del plano imagen, tendremos un patrón de difracción de la distribución compleja de amplitudes dada por la Ec.(6.1), es decir

$$o'_z(\mathbf{x}) = \frac{\exp[ikz]}{i\lambda z} o'(\mathbf{x}) \otimes_2 \exp\left[\frac{ik}{2z} |\mathbf{x}|^2\right]. \quad (6.2)$$

En dicho plano se realiza la interferencia con un haz de referencia plano y, por tanto, la distribución de intensidades en éste se podrá expresar como

$$I_z(\mathbf{x}) = |o'_z(\mathbf{x})|^2 + |R(\mathbf{x})|^2 + o'_z(\mathbf{x})R^*(\mathbf{x}) + o_z^*(\mathbf{x})R(\mathbf{x}). \quad (6.3)$$

Consideremos que el sistema está limitado por la difracción, es decir, cumple las condiciones expuestas en la sección 5.5 y, además, obviemos los efectos de la discretización. Con esto, la ecuación anterior representará el holograma digital y la resolución del sistema vendrá fijada por el sistema formador de imágenes y no por las características del medio de registro. La transformada de Fourier del holograma digital será

$$\tilde{I}_z(\mathbf{u}) = DC(\mathbf{u}) + \tilde{o}_z(\mathbf{u}) \otimes_2 \delta(\mathbf{u} - \mathbf{k}) + \tilde{o}_z^*(\mathbf{u}) \otimes_2 \delta(\mathbf{u} + \mathbf{k}), \quad (6.4)$$

donde \mathbf{k} es el vector de onda del haz de referencia. Nuevamente tenemos tres órdenes: el orden cero (DC) centrado en el origen del dominio frecuencial y las transformadas de Fourier del haz objeto (orden +1) y su complejo conjugado (orden -1) desplazadas simétricamente con respecto a dicho origen una *cantidad* \mathbf{k} .

En primer lugar, analicemos la forma que presenta el orden +1. Para ello, realizamos la transformada de Fourier de la Ec.(6.2), sustituyendo la expresión del haz objeto que incluye la iluminación estructurada

$$\tilde{o}'_z(\mathbf{u}) = \exp[-i\lambda z |\mathbf{u}|^2] \left[\tilde{o}(M\mathbf{u}) \otimes_2 \{ \delta(M\mathbf{u} - \mathbf{f}) + \delta(M\mathbf{u} + \mathbf{f}) \} \right] H(\mathbf{u}), \quad (6.5)$$

donde hemos omitido factores constantes irrelevantes y $H(\mathbf{u})$ es la CTF2D del sistema. El orden -1 presentará básicamente la misma forma salvo los cambios de signo debidos a que éste es el complejo conjugado del orden +1. Como puede verse en la Ec.(6.5), al introducir la iluminación estructurada se generan, dentro de los órdenes +1 y -1, dos deltas de Dirac que desplazan el espectro del objeto simétricamente con respecto al centro de cada uno de ellos, respectivamente. A dichos espectros desplazados los llamaremos órdenes de iluminación estructurada con el fin de distinguirlos de los correspondientes al holograma.

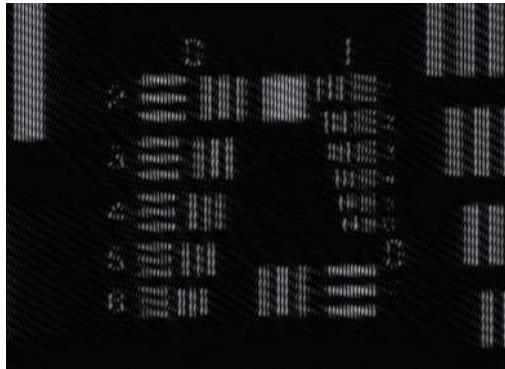


Fig. 64 Simulación de un holograma digital con iluminación estructurada de un test USAF 1951. Se pueden observar las frecuencias espaciales portadoras del holograma (en diagonal) y de la iluminación estructurada (en vertical).

En la Fig. 64 se muestra un holograma digital con iluminación estructurada, y en la Fig. 65 se muestra un ejemplo de la transformadas de Fourier de la simulación de un holograma digital limitado en difracción para dos frecuencias distintas del patrón estructurado. Como puede verse, dentro del orden cero aparecen tres órdenes de iluminación estructurada mientras que en los órdenes +1 y -1 únicamente aparecen dos.

A continuación, veremos cómo aislar las componentes generadas en el espacio de Fourier por la iluminación estructurada y como recomponer el espectro para obtener una mejora en la resolución tanto en amplitud como en fase.

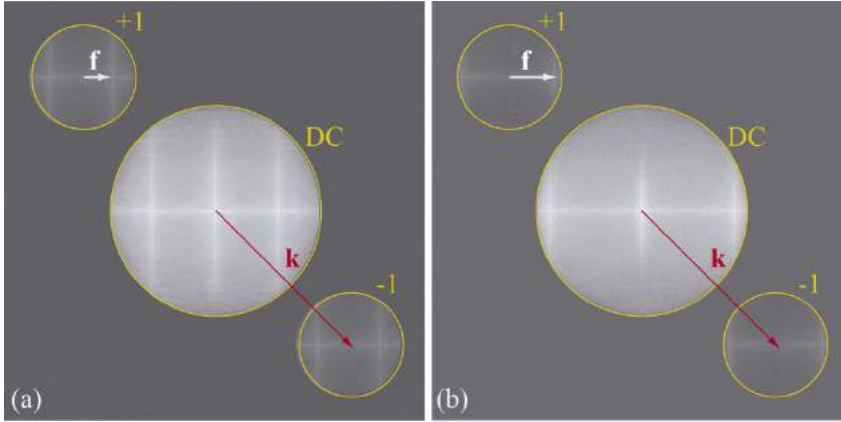


Fig. 65 Transformadas de Fourier de la simulación de un holograma digital en el cual el haz objeto contiene un patrón cosenoidal con dos frecuencias distintas. Como muestra se emplea un test USAF 1951.

6.2. Reconstrucción en SI-DHM

Para poder aislar las componentes generadas por la iluminación estructurada en los órdenes del holograma debemos proceder de la misma forma que hicimos cuando tratamos el problema en microscopía por fluorescencia. Si bien, este caso resulta más sencillo ya que únicamente tenemos dos incógnitas cuyo valor deseamos obtener⁹⁵.

Consideremos pues que podemos variar la fase inicial del patrón estructurado de forma controlada. En el plano imagen del objetivo de microscopio tendremos entonces la siguiente distribución compleja de amplitudes

$$o'_j(\mathbf{x}) = \left\{ o(\mathbf{x}/M) \cos\left(2\pi\mathbf{f} \cdot \mathbf{x}/M + (\phi_j + \phi_0)\right) \right\} \otimes_2 h(\mathbf{x}), \quad (6.6)$$

siendo ϕ_0 la fase inicial del patrón y ϕ_j el desplazamiento de fase que se introduce con respecto a dicha fase inicial.

Consideremos por simplicidad un sistema en el cual la captura se realice en régimen de espectro angular, es decir, en el que $z \rightarrow 0$. Dado que el sistema está limitado en difracción, es posible filtrar el orden +1 sin que exista pérdida

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

de resolución ni ruido añadido debido al solapamiento entre órdenes. Bajo estas condiciones, después de filtrar el orden +1 y corregir el desplazamiento del mismo debido al haz de referencia, la transformada de Fourier de la distribución compleja de amplitudes restante se podrá expresar como

$$\begin{aligned} \tilde{U}_j^R(\mathbf{k}) = \frac{1}{2} \left\{ \tilde{O}(M\mathbf{k}) \otimes_2 \left(\exp[i(\phi_j + \phi_0)] \delta(\mathbf{k} - M\mathbf{f}) \right. \right. \\ \left. \left. + \exp[-i(\phi_j + \phi_0)] \delta(\mathbf{k} + M\mathbf{f}) \right) \right\} H(\mathbf{k}), \end{aligned} \quad (6.7)$$

donde hemos reubicado el origen de las frecuencias espaciales al centro del orden +1. Podemos reescribir la ecuación anterior en función de dos incógnitas, llamémoslas F_1 y F_2

$$\tilde{U}_j^R(\mathbf{k}) = \frac{1}{2} \left\{ F_1(\mathbf{k}) \exp[i(\phi_j + \phi_0)] + F_2(\mathbf{k}) \exp[-i(\phi_j + \phi_0)] \right\}. \quad (6.8)$$

Si capturamos dos hologramas digitales I_1 e I_2 con corrimientos de fase respectivos $\phi_1 = 0$ y $\phi_2 = \phi$ y llevamos a cabo los procesos de filtrado del orden +1 y de compensación del haz de referencia, encontramos las siguientes soluciones para el sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas

$$\begin{aligned} F_1(\mathbf{k}) &= \left(\tilde{U}_1^R(\mathbf{k}) \exp[-i(\phi/2 - \phi_0)] - \tilde{U}_2^R(\mathbf{k}) \right) / \cos(\phi/2). \\ F_2(\mathbf{k}) &= \left(\tilde{U}_2^R(\mathbf{k}) \exp[i(\phi/2 - \phi_0)] - \tilde{U}_1^R(\mathbf{k}) \right) / \cos(\phi/2). \end{aligned} \quad (6.9)$$

en el cual ϕ debe ser distinto de 0, $\pi/2$ y π . Si el corrimiento de fase es conocido es directo obtener las soluciones. Hecho esto, no tenemos más que relocalizar las componentes en su posición “natural”, compensando el peso de las mismas en las posibles zonas de solapamiento, es decir,

$$F(\mathbf{k}) = F_1^W(\mathbf{k}) \otimes_2 \delta(\mathbf{k} + M\mathbf{f}) + F_2^W(\mathbf{k}) \otimes_2 \delta(\mathbf{k} - M\mathbf{f}), \quad (6.10)$$

donde $F_j^W(\mathbf{k})$ son los órdenes generados por la iluminación estructurada con el peso apropiado para compensar sus zonas comunes.

Es posible aplicar el mismo procedimiento para distintas orientaciones del

patrón estructurado. Si, por ejemplo, tenemos S patrones de iluminación rotados un cierto ángulo, la composición de los órdenes generados por la iluminación estructurada vendrá dada por

$$F(\mathbf{k}) = \sum_{s=1}^S F_{1,s}^W(\mathbf{k}) \otimes_2 \delta(\mathbf{k} + M\mathbf{f}_s) + F_{2,s}^W(\mathbf{k}) \otimes_2 \delta(\mathbf{k} - M\mathbf{f}_s). \quad (6.11)$$

Sustituyendo las incógnitas por su valor, se llega a

$$F(\mathbf{k}) = \tilde{o}(M\mathbf{k}) \sum_{s=1}^S (H^W(\mathbf{k} + M\mathbf{f}_s) + H(\mathbf{k} - M\mathbf{f}_s)), \quad (6.12)$$

donde podemos identificar una nueva CTF sintética dada por

$$H_{synth}(\mathbf{k}) = \sum_{s=1}^S \{H^w(\mathbf{k} + M\mathbf{f}_s) + H^w(\mathbf{k} - M\mathbf{f}_s)\}. \quad (6.13)$$

Como puede verse, al final del proceso se obtiene una CTF sintética cuya extensión depende de la frecuencia espacial del patrón de iluminación estructurada. Es notorio que dicha CTF opera sobre el espectro de la distribución compleja de amplitudes del haz objeto, con lo cual, es de esperar una mejora en resolución espacial tanto en la amplitud como en la fase de las reconstrucciones obtenidas mediante este método.

Es importante hacer notar la diferencia a la hora de realizar reconstrucciones mediante esta técnica con respecto al caso de un microscopio por iluminación estructurada como el tratado en el Capítulo 4. En este caso, la complejidad es mucho menor ya que, por un lado, se tienen únicamente dos órdenes de iluminación estructurada y, por tanto, solo se requiere la toma de dos imágenes con un desplazamiento de fase relativo del patrón entre ellas. Por otro, dado que tenemos la respuesta puramente coherente del sistema, la función de transferencia del mismo es plana por lo que no es necesaria la aplicación de un filtro de Wiener para compensar su forma.

Para probar la validez del método, realicemos una simulación del mismo empleando la captura de un holograma digital limitado en difracción usando

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

como objeto un test USAF 1951. Simularemos en primer lugar un test modulado en intensidad y realizaremos su reconstrucción para los casos de DHM estándar y SI-DHM. Para ello, la frecuencia espacial del patrón estructurado se seleccionará de tal forma que sea igual a la frecuencia espacial de corte de la CTF del sistema óptico (tal como se muestra en la Fig. 65(b)). Simulamos entonces la captura de cuatro hologramas: dos para dos orientaciones perpendiculares del patrón de iluminación y para cada orientación de dicho patrón dos hologramas con un corrimiento de fase relativo entre ellos. Tras llevar a cabo el proceso de filtrado y compensación de la referencia, se aíslan las componentes generadas por la iluminación estructurada y se recolocan en su posición natural (ver Fig. 66(d)). En este punto se compensa el peso debido a las posibles zonas de solapamiento de las cuatro componentes en el espacio de Fourier. De esta forma, se obtiene una CTF de ancho de banda extendido en comparación con la que se obtiene en un DHM estándar (véase Fig. 66(a)). Si se comparan las reconstrucciones en amplitud para ambos sistemas, se observa que para el DHM estándar se llega a resolver el elemento 3 del grupo 0 mientras que con el SI-DHM la mejora en resolución permite alcanzar a resolver el elemento 3 del grupo 1, lo que supone que éste último posee el doble de resolución que el primero.

A continuación realizamos el mismo proceso pero esta vez codificamos el test USAF 1951 en fase, es decir, otorgamos un valor de fase 0 al fondo y a los grupos una fase igual a $\pi/2$. En la Fig. 66(c)-(f) se muestran los resultados obtenidos en nuestra simulación y, tal como predice la Ec(6.13), se duplica la resolución también en la fase cuantitativa obtenida tras el proceso de reconstrucción.

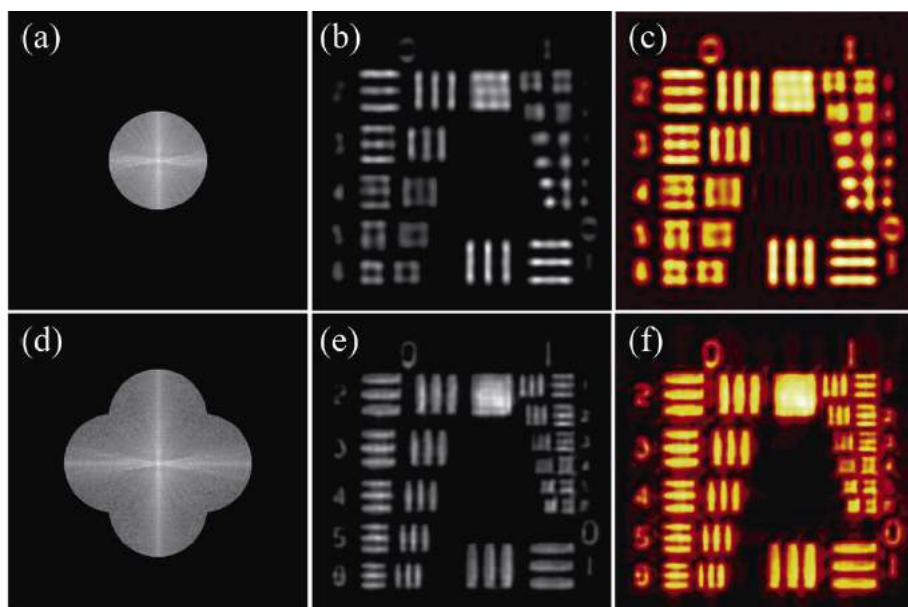


Fig. 66 Comparación de las imágenes obtenidas para una simulación de un DHM estándar (fila superior) y un SI-DHM para dos direcciones perpendiculares del patrón de iluminación (fila inferior). Como puede verse, la extensión de la CTF es notable, permitiendo doblar la resolución tanto en amplitud ((b)-(e)) como en fase para la muestra utilizada ((c)-(f)) ya que se llega a resolver el mismo elemento de un grupo superior.

6.3. Reconstrucción para un corrimiento de fase desconocido

En este apartado veremos un método para poder obtener las componentes generadas por la iluminación estructurada sin tener un conocimiento *a priori* del corrimiento de fase existente entre las mismas. Éste es un método iterativo que se basa en localizar las componentes generadas por la iluminación estructurada dentro el orden +1 del holograma⁹⁶.

Supongamos que tenemos un sistema SI-DHM como el presentado en la sección anterior. Si se realiza correctamente el proceso de filtrado, tendremos aislado en el espacio de Fourier el orden +1 del holograma con sus correspon-

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

dientes dos órdenes debidos a la iluminación estructurada. Dado que el sistema presenta una menor complejidad con respecto al caso incoherente presentado en el Capítulo 2, únicamente tenemos dos incógnitas. Además, la relación entre ambas viene dada por un solo corrimiento de fase. Gracias a ello es posible detectar cualquier corrimiento de fase (siempre que éste no sea 0 o π) a partir de la composición de ambas imágenes empleando la Ec.(6.9). Introduciendo en estas soluciones una raíz, es decir, un valor para el desplazamiento de fase cualquiera, obtendremos una primera aproximación a la solución (que por lo general será muy burda). Previamente hemos detectado la posición de los órdenes generados por la iluminación estructurada empleando un procedimiento similar al de la sección 4.6, pero sin necesidad de emplear un filtro de Wiener. De esta forma, realizamos un proceso iterativo en el cual se va variando progresivamente el valor del corrimiento de fase y comparando la intensidad relativa del centro del espectro de las componentes dadas por la solución de la Ec.(6.9). Si otorgamos un cierto valor de tolerancia al algoritmo podemos obtener la solución con dicho margen de error. Es decir, tenemos un parámetro (peso relativo entre los órdenes +1 y -1 de la iluminación estructurada para cada solución del sistema de ecuaciones) cuyo valor queremos maximizar.

Para mostrar el funcionamiento del algoritmo hacemos una simulación. En está, empleamos la imagen de un test USAF en negativo modulada por un patrón cosenoidal. Tomamos dos capturas de un holograma digital de dicha imagen para un desplazamiento de fase igual a 0.444444. Aplicamos el algoritmo de estimación de la fase suponiendo el corrimiento de la misma desconocido. Tras cien iteraciones obtenemos una estimación igual a 0.44445, es decir, con un error del orden del 10^{-5} %. En la Fig. 67 se muestra una de las soluciones obtenidas después de un número de iteraciones igual a $m=10, 50$ y 100. Como vemos, para 100 iteraciones uno de los órdenes de la iluminación estructurada aparece aislado y, por tanto, podemos concluir que el valor de la fase obtenido es tal que permite obtener las componentes de Fourier puras generadas por la iluminación estructurada. A pesar de que en el método pro-

puesto estamos considerando un valor del corrimiento de fase desconocido, es posible aplicar el mismo método cuando se tiene una cierta estimación de la variación de fase entre las capturas con el fin de optimizar los resultados obtenidos.

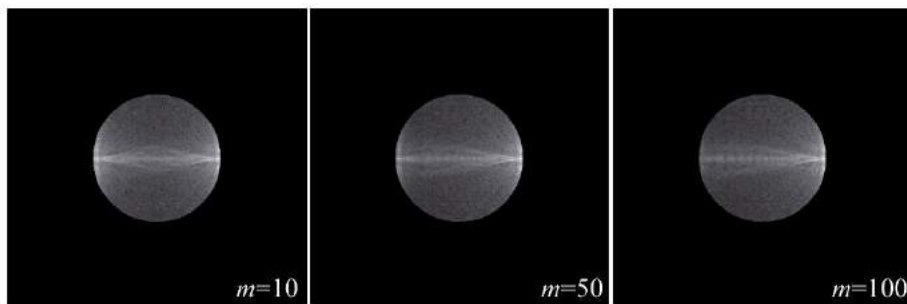


Fig. 67 Una de las soluciones obtenidas tras aplicar el algoritmo de estimación de la fase propuesto. Como vemos, para $m=100$ obtenemos uno de los órdenes aislado, es decir, la componente espectral pura correspondiente a dicho orden.

Con el fin de recolocar las componentes hacemos uso de la posición detectada para cada orden de la iluminación estructurada. Si referimos dicha posición con respecto al pixel central del espectro, podemos hacer un desplazamiento de las componentes +1 y -1 a la que sería su posición natural. De esta manera no sólo se compensa la posición desplazada de las componentes de iluminación estructurada, sino que al tiempo se está calculando una referencia numérica que es igual a la referencia empleada en el proceso de registro y, por lo tanto, la fase obtenida tras el proceso de reconstrucción será la fase pura de la muestra.

6.4. SI-DHM empleando un biprisma de Fresnel

En nuestro caso, hemos implementado un sistema SI-DHM⁹⁵, cuyo esque-

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

ma se presenta en la Fig. 68. Éste está formado por el esquema típico de captura de hologramas digitales en DHM basado en un interferómetro Mach-Zehnder. En éste se incluyen tres nuevos elementos: la combinación de un biprisma de Fresnel y una lente (TL1) se emplea para realizar la proyección de dos fuentes puntuales coherentes sobre un primer objetivo de microscopio (MO1). Estos elementos ópticos generan un patrón estructurado en las proximidades del foco de dicho objetivo. En dicho plano se sitúa una muestra. La imagen de la distribución generada tras la interacción entre la muestra y la iluminación estructurada se realiza empleando un segundo objetivo de microscopio (MO2) corregido al infinito en configuración afocal-telecéntrica con la lente de tubo (TL2). En las proximidades del plano imagen de este segundo sistema se coloca una cámara CCD que realiza el registro de la superposición de un patrón de difracción de la imagen y el haz de referencia. Para que el sistema funcione de manera óptima, el medio de registro y el sistema formador de imágenes deben cumplir las condiciones impuestas en el Capítulo 5 para que el sistema se encuentre limitado por la difracción. A continuación mostraremos algunos resultados obtenidos por medio del sistema anterior.

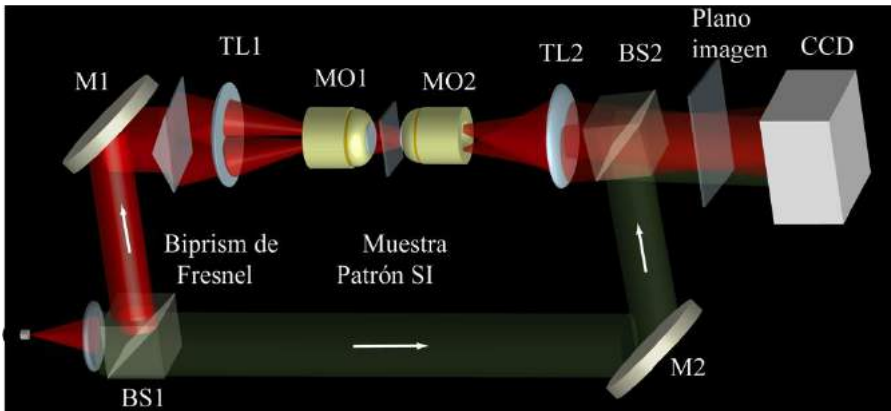


Fig. 68 Esquema de un SI-DHM empleando un biprisma de Fresnel para generar la iluminación estructurada en el plano de la muestra.

En un primer experimento empleamos un láser de He-Ne ($\lambda=632.8$ nm), un biprisma de Fresnel ($\delta=5^\circ$, $n=1.51$), un MO2 de $2\times$ y $NA=0.075$, y una lente TL2 con distancia focal 200 mm. Las fuentes puntuales virtuales tienen una separación tal que el patrón generado en el espacio objeto de MO2 posee una frecuencia espacial aproximadamente igual a la frecuencia de corte de dicho objetivo. Por ello, empleamos directamente el patrón generado por el biprisma en el espacio objeto de MO2 sin incluir ningún otro elemento en el sistema de iluminación. Como medio de registro se emplea una cámara CCD de 1248×1024 píxeles de $6.6\ \mu\text{m}$ de tamaño. El biprisma se encuentra montado en un soporte que permite tanto su rotación como su desplazamiento transversal. Mediante este sistema se realiza la captura de un holograma de un test USAF 1951 de alta resolución en negativo. Algunos de los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 69.

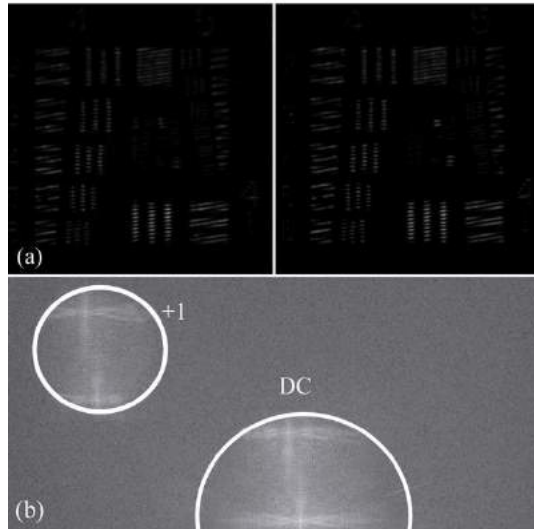


Fig. 69 (a) Hologramas digitales por iluminación estructurada de un test USAF 1951 en negativo capturadas mediante un objetivo $2\times NA=0.075$ y con un corrimiento relativo de la fase del patrón estructurado desconocido.(b) Mitad superior de la transformada de Fourier de los hologramas mostrados en (a).

A partir de únicamente dos tomas es decir, para un único ángulo y con un corrimiento de fase del patrón entre ambas desconocido, se aplica el algoritmo de reconstrucción presentado en la sección anterior (6.3). El resultado espectro obtenido tras la aplicación del algoritmo así como la reconstrucción en amplitud del test USAF se muestran en la Fig. 70 . A parte del buen funcionamiento del algoritmo presentado en un caso experimental, de los resultados obtenidos podemos concluir que la técnica SI-DHM presenta la mejora en resolución esperada. En esta prueba de concepto únicamente empleamos un ángulo del patrón y, por lo tanto, la APSF2D del sistema obtenido es anisótropa. Prueba de ello es la reconstrucción mostrada en la Fig. 70(b) en la que existe una diferencia entre la resolución obtenida para elementos verticales y horizontales del test USAF de más de un grupo.

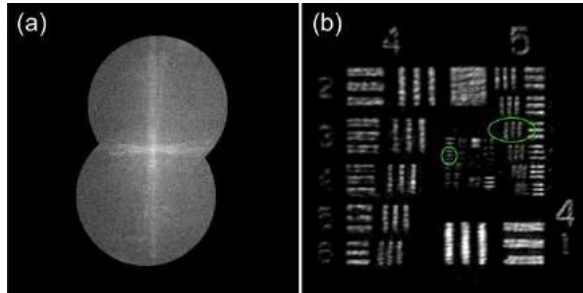


Fig. 70 Demostración del funcionamiento de la técnica SI-DHM y del algoritmo de reconstrucción propuesto para la misma empleando un test USAF 1951 en negativo como muestra y un objetivo de microscopio $2\times NA=0.075$

Por último, para comprobar el funcionamiento del sistema a aperturas numéricas altas y empleando una muestra biológica a fin de obtener mejora en la resolución tanto en amplitud como en fase, realizamos algunos cambios en el sistema. Empleamos una lente TL1 con una distancia focal 100 mm y un objetivo MO1 $40\times$ y $NA=0.65$ en configuración afocal-telecéntrica como sistema de iluminación. En el sistema de colección usamos un objetivo MO2 $50\times$ y $NA=0.55$ de larga distancia de trabajo. La combinación del biprisma y el sistema de iluminación permiten generar una frecuencia del patrón tal que los órdenes de la iluminación estructurada se encuentran próximos a la frecuencia espacial de corte del sistema de colección. La muestra empleada es un corte de la cabeza de una mosca (*drosophila melanogaster*). En la Fig. 71 se muestran los espectros obtenidos a partir de dicha muestra, tanto para un DHM convencional como para el SI-DHM. En esta misma figura se presentan las reconstrucciones en amplitud obtenidas. Se puede observar una clara mejora en el aspecto de la imagen obtenida mediante SI-DHM con respecto al caso convencional.

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

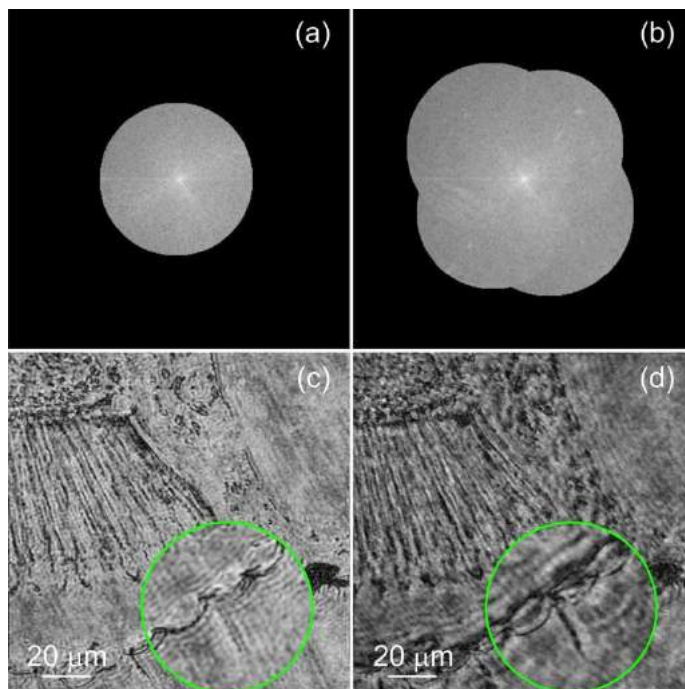


Fig. 71 Transformadas de Fourier obtenidas (empleando como muestra una sección de una *drosophila melanogaster* y un objetivo de colección 50 \times , NA=0.55) tras la reconstrucción en un (a) DHM y (b) mediante nuestro sistema SI-DHM. Las imágenes en amplitud correspondientes se muestran en (c) y (d), respectivamente.

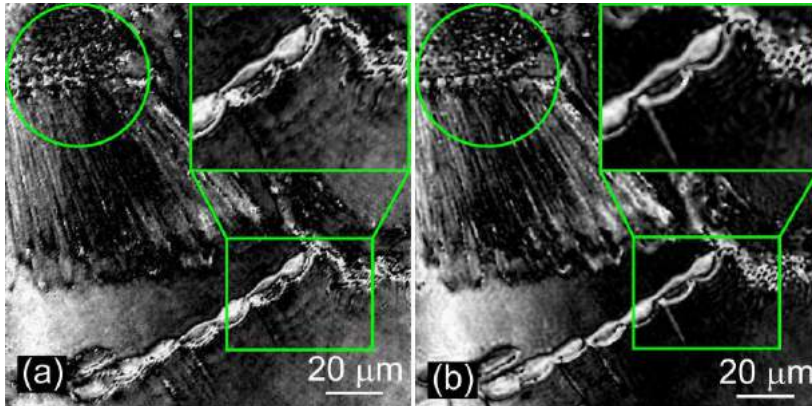


Fig. 72 Imágenes de la fase reconstruida correspondiente a los casos mostrados en la Fig. 71: (a) DHM, y; (b) SI-DHM.

Finalmente, en la Fig. 72 puede observarse esa misma comparación para los mapas de fase obtenidos en ambos casos. Claramente se aprecia una mejora en la resolución transversal del mapa de fase obtenido para el caso SI-DHM.

En vista de los resultados obtenidos podemos concluir que la SI-DHM es una técnica que permite doblar la resolución tanto en fase como en amplitud con respecto a las obtenidas mediante un sistema DHM convencional. Si bien podríamos argumentar que esta técnica añade complejidad al sistema y requiere de dos tomas podemos justificar el empleo de la misma, sobretodo, si analizamos otros métodos de reconstrucción diciendo que:

- i) En la holografía digital en eje se requiere de tres tomas para obtener un ancho de banda doble con respecto a la holografía digital fuera de eje. Mediante este método se consigue aislar el orden +1 del orden cero y el -1 aprovechando todo el espacio ancho de banda de la cámara. Sin embargo, si empleamos la optimización del sistema DHM fuera de eje presentada en el Capítulo 5 para la captura de hologramas limitados en difracción, ello no supondría ninguna mejora en la resolución además de tener la desventaja de

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

la posible presencia de artefactos debido a componentes frecuenciales remanentes de los órdenes cero y -1.

ii) En algunos sistemas DHM que usan objetivos corregidos a distancia finita se emplean dos tomas (una con objeto y otra sin él) simplemente para compensar la fase del haz de referencia.

iii) Si se emplean un sistema mecánico estable y rápido para realizar el corrimiento de fase y una cámara con un tiempo de adquisición bajo, la técnica se puede implementar de manera sencilla realizando dos capturas por holograma y procesándolas posteriormente.

7. Conclusiones

En el desarrollo de esta Tesis hemos tratado diferentes técnicas dentro de la microscopía óptica no convencional. Éste es un campo cada vez más extenso, en el que aparecen nuevas técnicas y alternativas que progresivamente permiten mejorar la resolución y la capacidad de seccionado de los microscopios con el fin de lograr detalles cada vez más finos y estructuras dentro de muestras biológicas cuyo estudio sería imposible sin la aparición de las mismas. Por otro lado existen otro tipo de novedosas técnicas que permiten la obtención de información extra de la muestra, como es el caso de la holografía digital mediante la cual podemos realizar medidas cuantitativas y visualizar detalles de células *in vivo* sin necesidad de introducir en ellas elementos externos (como son los tintes) que pueden alterar tanto su comportamiento natural como su forma. Prueba de esto es el interés y la inversión crecientes de las casas comerciales en nuevas técnicas dentro de la microscopía óptica, que están dando sus frutos atrayendo cada vez más usuarios de campos tales como la Biología, Bioquímica y Medicina a la aplicación de dichas técnicas.

En la actualidad, si bien existen sistemas comerciales SIM y DHM, estos no están exentos de posibles mejoras y/o variantes que permitan tanto una optimización del sistema como una mejoría en el uso y en los resultados obtenidos a partir de los mismos. Asimismo, la combinación de distintas técnicas (como la SI-DHM), o la reinterpretación de técnicas ya existentes (como por ejemplo la microscopía confocal con muestreo en el plano del detector) hacen de la microscopía moderna un campo que se encuentra en continua evolución. Como ejemplo, nuestro grupo se encuentra actualmente implementando un microscopio a partir de una técnica empleada a escala macroscópica^{97,98} con el fin de obtener información tridimensional de un espécimen a partir de una única toma.

Todo ello implica cada vez más requerimientos, tanto técnicos como de conocimiento, ya que podemos decir que los microscopios actuales han dejado de ser una herramienta exclusiva para la observación directa de muestras con el ojo desnudo para pasar a convertirse en sistemas complejos cuyo desarrollo requiere de la última tecnología, aplicaciones *software*, elaboración de algoritmos de reconstrucción y un conocimiento teórico avanzado de los sistemas formadores de imágenes y de la teoría de la difracción para poder comprender su principio de funcionamiento.

Quisiera destacar algunos de los puntos desarrollados en el transcurso de esta Memoria:

i) Hemos desarrollado una técnica alternativa para la adquisición de imágenes en CSM. Dicha técnica permite la obtención de una mayor cantidad de información para cada posición de barrido de la muestra. De esta forma, es posible emplear la propuesta con el fin de aumentar tanto la resolución como el seccionado óptico proporcionado por un microscopio confocal de barrido convencional.

ii) Para la técnica SIM se han presentado una serie de propuestas que incluyen:

- a. Un algoritmo de reconstrucción alternativo insensible a los posibles errores en la estimación del corrimiento de fase del patrón y que, además, permite el cálculo del parámetro de Wiener empleado de manera sencilla.
- b. Un sistema de iluminación mediante el cual es posible variar la frecuencia espacial del patrón de manera sencilla y que aumenta la eficiencia luminosa con respecto a los sistemas actuales. Se ha indicado también una generalización para la microscopía por iluminación estructurada 3D, que es incoherente y que actualmente está en fase de implementación.

iii) Para la obtención de mejores resultados en la medida cuantitativa de

Microscopía: Mejora en resolución, seccionado y fase cuantitativa

fase en la técnica DHM, hemos empleado un sistema formado por un objetivo de microscopio corregido al infinito en configuración afocal-telécéntrica con la lente de tubo. Mediante este sistema se reduce el número de operaciones necesarias en el proceso de reconstrucción así como se minimiza los posibles errores presentes por una mala determinación de la curvatura y el centro de frentes de onda objeto distorsionados por un factor de fase cuadrático. Dicha configuración nos ha llevado a un desarrollo teórico de este tipo de sistemas en el que mostramos cuáles son las condiciones que se deben cumplir para poder considerar que el sistema se encuentra limitado por la difracción y no por el medio de registro, incluso en presencia de una distorsión de fase cuadrática del frente de onda objeto.

iv) A partir de la combinación de las técnicas SIM y DHM (SI-DHM) hemos implementado un sistema que permite duplicar la resolución, tanto en amplitud como en fase, de las reconstrucciones obtenidas por medio de un DHM convencional. Además, el desarrollo teórico necesario para realizar dicha técnica nos ha llevado a un proceso de reconstrucción sencillo, el cual es capaz de estimar el corrimiento de fase del patrón estructurado sin un conocimiento previo del mismo.

ANEXOS

ANEXO 1

En este Anexo se resumen los acrónimos empleados durante el desarrollo de esta tesis. Dichos acrónimos están relacionados con la denominación anglosajona como se puntualiza en el texto cuando aparecen por primera vez

Relación acrónimos que aparecen en el texto:

Respuesta impulsional en amplitudes:	<i>APSF</i>
Respuesta impulsional:	<i>PSF</i>
Función de transferencia coherente:	<i>CTF</i>
Función de transferencia óptica:	<i>OTF</i>
Microscopía confocal de barrido laser:	<i>CLSM</i>
Microscopía confocal de barrido por fluorescencia:	<i>CFSM</i>
Microscopía por iluminación estructurada:	<i>SIM</i>
Microscopía holográfica digital:	<i>DHM</i>
Tubo fotomultiplicador:	<i>PMT</i>
Cámara digital de carga acoplada:	<i>CCD</i>
Orden cero de la difracción:	<i>DC</i>
Apertura numérica:	<i>NA</i>
Transformada de Fourier rápida:	<i>FFT</i>
Modulador espacial de luz:	<i>SLM</i>
Microscopía holográfica digital por ilum. estructurada:	<i>SI-DHM</i>
Stimulated emission depletion microscopy:	<i>STED</i>
Microscopía a dos fotones:	<i>2PEM</i>

ANEXO 2

En este anexo presentaremos algunos de los programas empleados en el desarrollo de esta Memoria. Todo ellos fueron programados en la plataforma LabVIEW©.

Microscopía confocal con muestreo espacial en el plano del detector

Una imagen de algunos de los paneles empleados en este software se muestran en la Fig.A. 1. Dicho programa permite en primer lugar una visualización de la imagen capturada por una cámara CCD. A partir de dicha imagen se puede localizar la distribución de intensidades imagen generada por una cierta muestra situada en el espacio objeto del microscopio confocal. El software permite controlar el tiempo de exposición y seleccionar un número de píxeles activos y la posición de los mismos, simulando la acción del *pinhole*. Asimismo es posible cambiar la posición de la muestra por medio del desplazamiento axial del sistema de barrido piezo-eléctrico de forma que es posible encontrar la zona axial en la que se encuentra localizada la muestra. Es posible elegir entre dos tipos de capturas: una en la que se obtiene exclusivamente la imagen confocal y otra en la que se captura la imagen resultante del barrido para un *pinhole* virtual de un cierto número de píxeles, otra con un *pinhole* virtual más pequeño y la imagen substractiva (todas las imágenes se calculan en paralelo a partir de las señales proporcionadas por el *pinhole* virtual de mayor tamaño). En dicho punto podemos escoger entre un barrido transversal o un barrido axial, definiendo a su vez el tamaño de la región de barrido y el paso del mismo. Para el segundo tipo de adquisición es necesario realizar una primera toma de calibrado para escoger el valor del factor de peso en la combinación de señales a partir de la cual se obtiene la imagen substractiva.

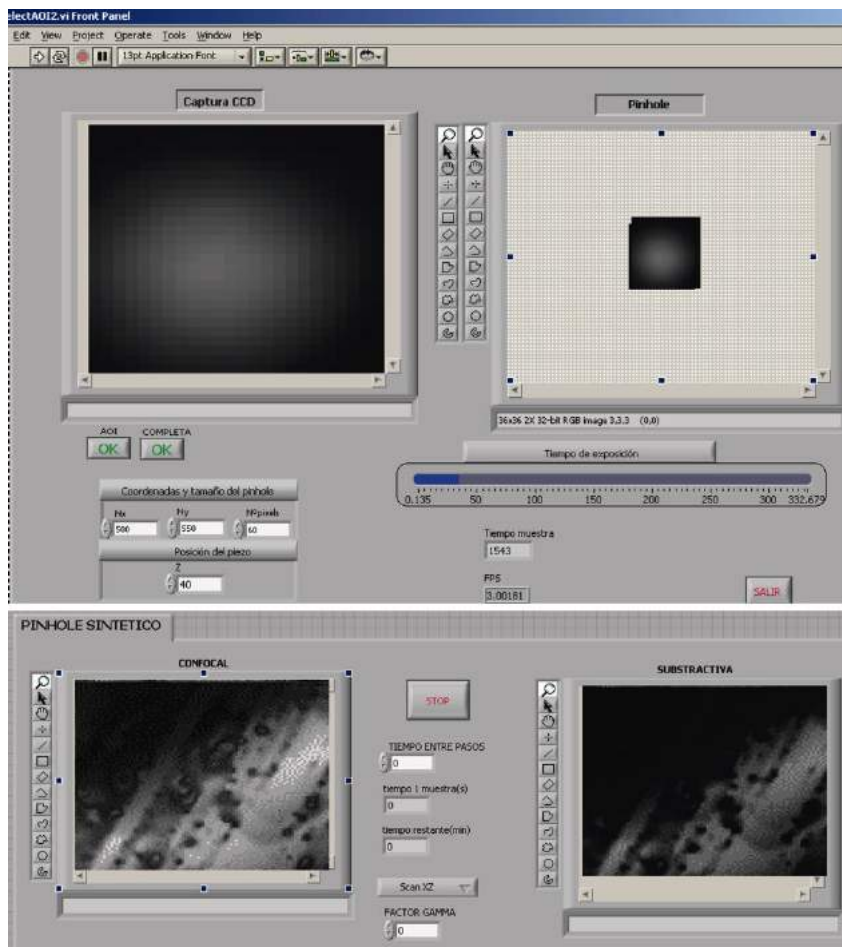


Fig.A. 1. Software de captura del microscopio confocal de barrido con muestreo espacial.

SIM: Software de captura, calibrado y reconstrucción para 1 ángulo del patrón de iluminación

El software de captura de imágenes empleado en nuestro sistema SIM de frecuencia variable se muestra en la Fig.A. 2. Dicho programa consta de numerosos paneles. En un primer panel podemos ver la imagen capturada en tiempo real por la cámara, permitiendo un enfoque automático por medio de un control del motor de pasos sobre el que se sitúa la muestra. Es posible visualizar la transformada de Fourier de dicha imagen con el fin de elegir la frecuencia espacial del patrón y su ángulo. Mediante un proceso de calibrado, para cada patrón se calcula automáticamente su frecuencia espacial así como el corrimiento que se genera debido al desplazamiento en un paso del motor sobre el que se encuentra situado el biprisma. El programa permite hacer reconstrucciones, si bien, sólo para un ángulo del patrón. Por ello incorpora la opción de capturar las imágenes elementales de forma que se puede variar el ángulo haciendo capturas sucesivas.

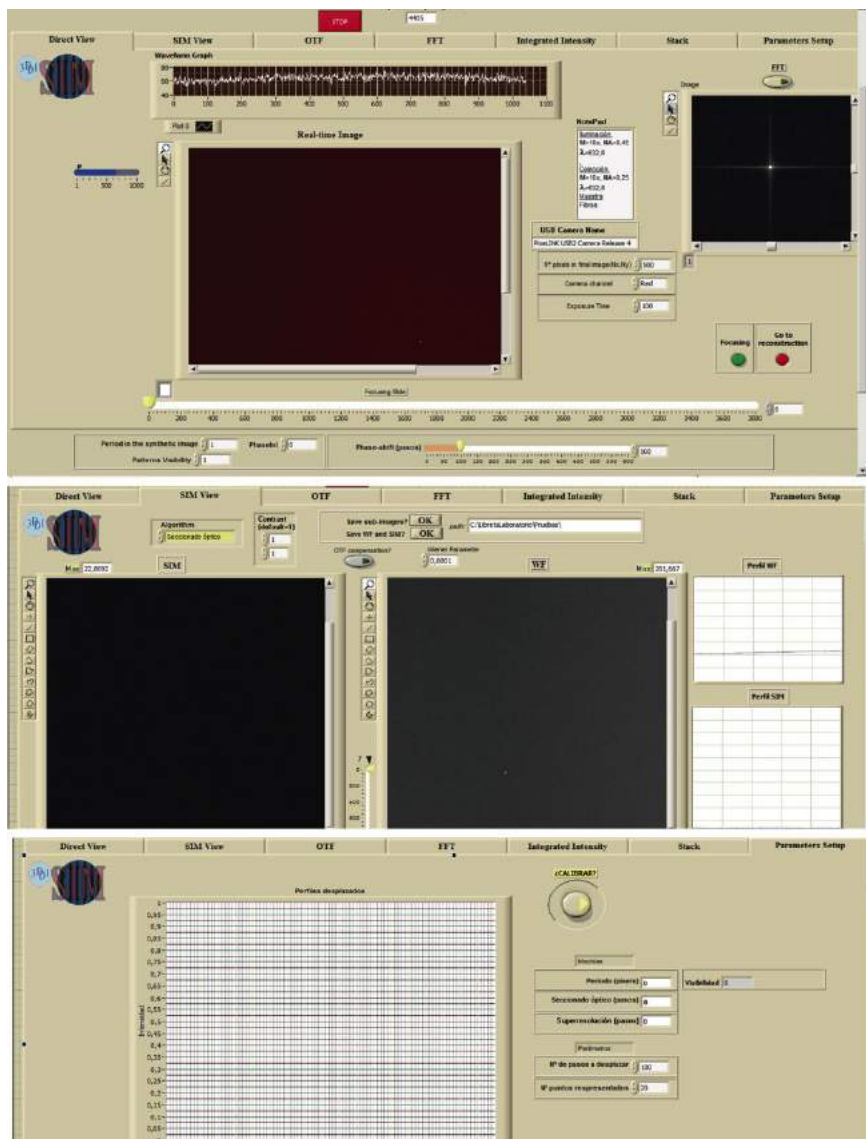


Fig.A. 2 Algunos de los paneles del software de captura de imágenes desarrollado para el sistema SIM de frecuencia variable.

SIM: Software de reconstrucción para 3 ángulos del patrón de iluminación

El *software* desarrollado para realizar la reconstrucción en SIM2D para 3 ángulos de proyección del patrón estructurado se puede ver en la Fig.A.3. Éste incorpora el algoritmo presentado en la sección 4.6 de esta Memoria. Consta de dos paneles, el primero de los cuales muestra las transformadas de Fourier de las imágenes elementales. En dicho panel se estima el radio de la OTF (cuyo valor debemos comparar con el valor teórico) y se introduce el corrimiento de fase para cada uno de los ángulos. El otro panel muestra las reconstrucciones de la imagen de campo amplio y por iluminación estructurada obtenidas. En éste existen una serie de opciones: número de píxeles de la imagen final, parámetro de Wiener (se puede variar “a mano” o calcularlo a partir del propio algoritmo de detección de la posición de los órdenes), mostrar o no cada una de las componentes y los niveles de grises otorgados a la imagen reconstruida.

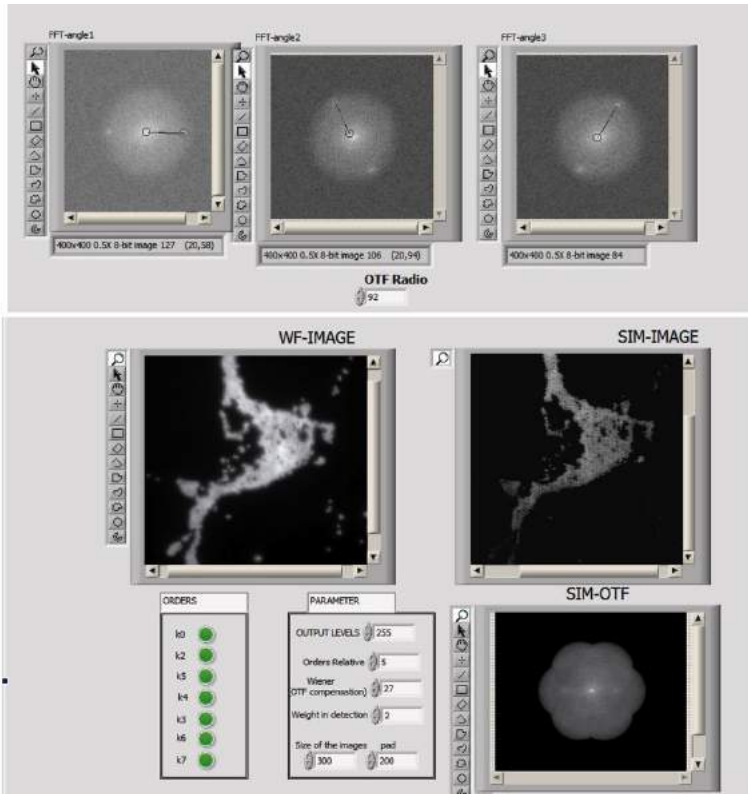


Fig.A.3 Software de reconstrucción en SIM varios ángulos desarrollado mediante el algoritmo presentado en la sección 4.6.

DHM: Software de filtrado y reconstrucción dinámicos del holograma y reconstrucción 3D de la fase

Una captura de pantalla del programa diseñado para la reconstrucción dinámica de la amplitud y la fase en DHM se muestra en la Fig.A. 4. En un primer panel del programa se visualiza el holograma y su transformada de Fourier. Superpuesto con ésta última aparece el dibujo del filtro que se va a emplear en el filtrado espacial del holograma. El tamaño y la posición del mismo se varía de manera sencilla, mediante un controlador numérico y un par de barras deslizante que desplazan el filtro en cada una de las direcciones transversales. Una vez elegidos el filtro, se pasa al panel de reconstrucción. Este requiere una serie de datos de entrada: longitud de onda de la iluminación, tamaño del pixel, variación de índice de refracción (sólo si se quiere hacer una medida cuantitativa en profundidad) y distancia de reconstrucción (cuyo proceso se puede omitir si se captura en el plano imagen). Asimismo se presentan los valores obtenidos para la compensación de la referencia. Dichos valores se pueden variar manualmente. Incorpora asimismo un compensador de la curvatura del haz objeto el cual no es necesario emplear en nuestro sistema afocal-telecéntrico. En un último panel se posee la opción de hacer una reconstrucción en superficie a partir de la información de la fase cuantitativa calculada.

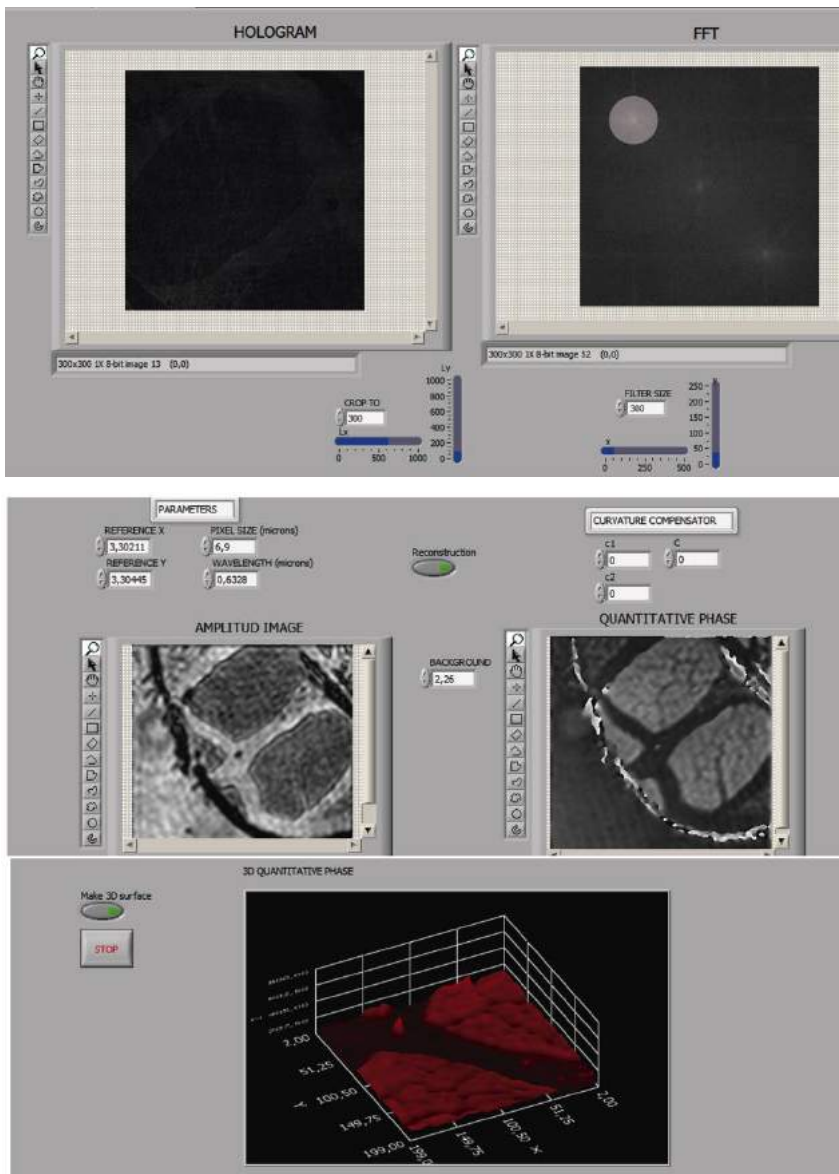


Fig.A. 4 Programa de reconstrucción dinámica desarrollado para el sistema DHM.

ANEXO 3

Sistemas limitados por la difracción

Durante gran parte de la memoria se considera que el sistema óptico que se emplea está limitado por la difracción, esto es, que la resolución del mismo viene dada por el *spot* generado por un punto situado en el plano del espacio objeto conjugado con el plano en el que se sitúa el medio de registro. Sin embargo, cuando se lleva a cabo dicha suposición estamos diciendo implícitamente que el medio de registro, en concreto el tamaño del píxel, no influye en el proceso de formación de imágenes. Esto no tiene por qué ser necesariamente cierto, si bien ocurrirá cuando se cumpla la condición de Nyquist-Shannon^{99,100} para un muestreo óptico del *spot* de difracción.

Si bien esta condición es completamente válida y nos permite optimizar el sistema en términos de resolución óptica y cantidad de información capturada, en algunos casos (particularmente si se quiere mejorar la resolución sistema) resulta muy práctico analizar el sistema en el dominio de Fourier. Consideremos pues que nuestro medio de registro es un cuadrado con $N \times N$ píxeles de tamaño Δp . Las relaciones de la transformada de Fourier discreta nos dicen que, para cada dirección transversal, el tamaño del sensor, L , y el ancho de banda del espacio de Fourier, B , se relacionan de la siguiente forma

$$L = N \cdot \Delta p \quad B = \frac{1}{\Delta p}, \quad (6.14)$$

y, dado que la transformada de Fourier discreta posee el mismo número de píxeles que la imagen, el tamaño del píxel en el dominio espacio-frecuencial será

$$\Delta u = \frac{1}{N \cdot \Delta p} \quad (6.15)$$

Como se demuestra en el Capítulo 2, para un sistema afocal-telecéntrico formado por un objetivo de microscopio y una lente de tubo con una pupila circular, el tamaño de la OTF 2D en el dominio de Fourier viene dado por

$$\rho = \frac{2NA}{\lambda f_2} \quad (6.16)$$

La ecuación anterior se puede escribir en la forma

$$\rho = \frac{2 \sin(\alpha)}{\lambda M} \quad (6.17)$$

siendo α la mitad del ángulo de abertura de la lente.

Para que el sistema esté limitado por difracción es necesario que el soporte de la OTF 2D sea menor que el ancho de banda del sensor, por tanto debe cumplirse $2\rho \leq B$, es decir

$$\Delta p \leq \frac{\lambda M}{4 \sin(\alpha)}, \quad (6.18)$$

donde hemos relacionado el tamaño del píxel del sensor con los parámetros físicos que caracterizan el sistema óptico (sin necesidad de establecer un criterio).

Como vemos, la condición es independiente del número de píxeles del sensor. No es sorprendente ya que, al igual que al aplicar el criterio de Nyquist, estamos imponiendo un cierto muestreo sobre el espacio real. Dado la reciprocidad entre dominio espacial y el dominio de Fourier, el número de píxeles afectará en última instancia al muestreo que se realiza del espacio de Fourier ya que dicho parámetro cambia el tamaño del píxel en dicho espacio.

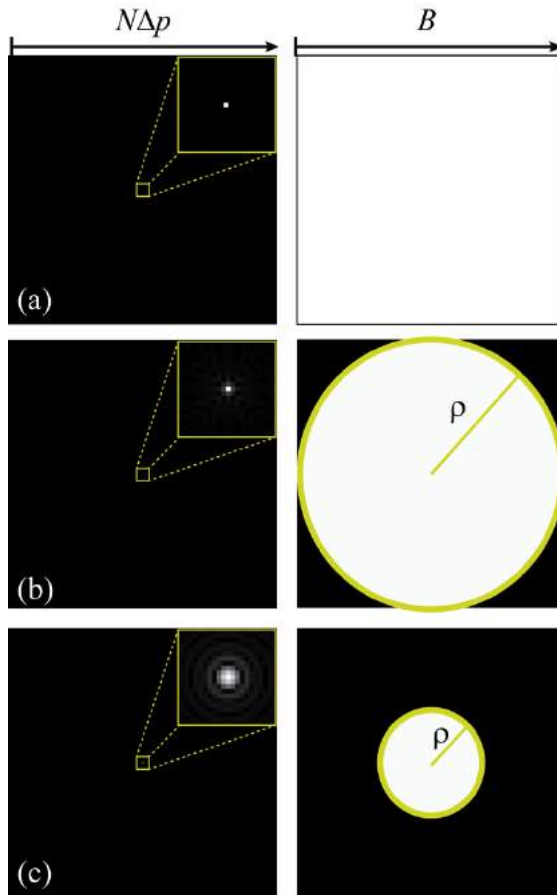


Fig.A. 5 Simulación del muestreo de una PSF mediante un medio de registro matricial (1ª columna) y su correspondiente transformada de Fourier discreta (2ª columna) para los casos (a) sistema limitado en resolución por el sensor, (b) sistema limitado en difracción con muestreo óptimo de la PSF y (c) sistema limitado en difracción con sobremuestreo de la PSF.

Bibliografia

- 1 A. Leeuwenhoek, H., Samuel. *The selected works of Antony van Leeuwenhoek : containing his microscopical discoveries in many of the works of nature.* (London: G. Sidney, 1800).
- 2 Hooke, R. *Micrographia: or some Physiological Descriptions of Minute Bodies made by Magnifying Glasses. With Observations and Inquiries thereupon.*, (Jo. Martyn and Ja .Allestry for the Royal Society, 1665).
- 3 Minsky, M. Microscopy apparatus. (1961).
- 4 Minsky, M. Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *SCANNING* **10**, 128-138 (1988).
- 5 Pawley, J. B. *Handbook of biological confocal microscopy.* 3rd edn, (Plenum Press, 2006).
- 6 M. Gu, and C. J. R. Sheppard. Confocal fluorescent microscopy with a finite-sized circular detector. *J. Opt. Soc. Am. A* **9**, 151-153 (1992).
- 7 W. Denk, J. Strickler, W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**, 73-76 (1990).
- 8 Wichmann, S. W. Hell and J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy *Opt Lett.* **19**, 780-782 (1994).
- 9 M. J. Rust, M. Bates and X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods* **3**, 793-795 (2006).
- 10 E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess & I. maging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642-1645 (2006).
- 11 Gustafsson, M. G. L. Surpassing the lateral resolution by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* **198**, 82-87 (2000).
- 12 H. Ooki, Y. Iwasaki, and J. Iwasaki Differential interference contrast microscope with differential detection for optimizing image contrast. *Appl. Opt.* **35**, 2230-2234 (1996).

- 13 E. CuChe, F. Bevilacqua, and C. Depeursinge. Digital holography for quantitative phase-contrast imaging. *Opt. Lett.* **24**, 291-293 (1999).
- 14 Gu, M. *Advanced Optical Imaging Theory*. (Springer, 1999).
- 15 Murphy, D. B. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. (Wiley-Liss, 2001).
- 16 Abbe, E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung *Arch. Mikrosk. Anat* **9**, 413 (1873).
- 17 I. Escobar, E. Sánchez-Ortiga, G. Saavedra, and M. Martínez-Corral. in *Optical Fluorescence Microscopy. From the Spectral to the nano Dimension*. (ed A. Diaspro) Ch. 5, 85-100 (Springer, 2011).
- 18 G. Saavedra, I. Escobar, R. Martínez-Cuenca, E. Sánchez-Ortiga, and M. Martínez-Corral. Reduction of spherical-aberration impact in microscopy by wavefront coding *Optics Express* **17**, 13810-13818 (2009).
- 19 Z. Kavehvas, S. Bagheri, K. Mehrany, B. Javidi, E. Sánchez-Ortiga and M. Martinez-Corral. Extension of depth of field using amplitude modulation of the pupil function for bio-imaging. *Proc. SPIE* **7690** (2010).
- 20 J.W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*. (McGraw-Hill, 2005).
- 21 M. Born and E. Wolf, E. *Principles of optics*. (Pergamon, 1980).
- 22 J. Pawley, M. Blouke, and J. Janesick. The CCDiode: An optimal detector for laser confocal microscopes. *Proc. SPIE* **2655**, 125-129 (1996).
- 23 C. J. R. Sheppard, and T.Wilson. Image Formation in Scanning Microscope with Partially Coherent Source and Detector. *Opt. Acta* **25**, 315-325 (1978).
- 24 T. Wilson, and R. Carlini. Effect of detector displacement in confocal imaging system. *Appl. Opt.* **27**, 3791-3799 (1988).
- 25 T. Wilson, and R. Carlini. Size of the detector in confocal imaging systems. *Opt. Lett.* **12**, 227-229 (1987).
- 26 Wilson, T. *Confocal Microscopy*. (Academic Press, 1990).
- 27 Wilson, T. Confocal Microscopy with Detector Offset. *Journal of Modern Optics* **40**, 401-412 (1993).

- 28 P. Török, Z. Laczik, and C. J. R. Sheppard. Effect of half-stop lateral misalignment on imaging of dark-field and stereoscopic confocal microscopes. *Appl. Opt.* **35**, 6732-6740 (1996).
- 29 I. J. Cox, C. J. R. Sheppard, and T. Wilson. Improvement in resolution by nearly confocal microscopy. *Appl. Opt.* **5**, 778-782 (1982).
- 30 Sheppard, C. J. R. Super-resolution in Confocal Imaging. *Optik* **80**, 53-54 (1988).
- 31 Wilson, T. Images of phase edges in conventional and scanning optical microscopes. *Appl. Opt.* **20**, 3238-3245 (1981).
- 32 S. Schmitta, J. F. Eversb, C. Duchb, M. Scholza, K. Obermayera. New methods for the computer-assisted 3-D reconstruction of neurons from confocal image stacks. *NeuroImage* **23**, 1283-1298 (2004).
- 33 C. J. R. Sheppard, and C. J. Cogswell. Confocal microscopy with detector arrays. *Journal of Modern Optics* **37**, 267-279 (1990).
- 34 M. Barth, and E. H. K. Stelzer. Boosting the optical transfer function with a spatially resolving detector in a high numerical aperture confocal reflection microscope. *Optik* **96**, 53-58 (1994).
- 35 E. Sánchez-Ortiga, C. J. R. Sheppard, G. Saavedra, M. Martínez-Corral, A. Doblas, and A. Calatayud. Subtractive imaging in confocal scanning microscopy using a CCD camera as a detector. *Opt. Lett.* **37**, 1280-1282 (2012).
- 36 E. Sánchez-Ortiga, G. Saavedra, C.J.R. Sheppard, A. Doblas, M. Martínez-Corral, and P. Andrés. Scanning microscopy with spatial sampling of the detector plane *Opt. Pur. Apl.* **46**, 137-146 (2013).
- 37 E. Sánchez-Ortiga, G. Saavedra, M. Martínez-Corral, A. Doblas, A. Calatayud. Confocal scanning microscope using a CCD camera as a pinhole-detector sytem. *IEEE Workshop on Information Optics (WIO), 10th Euro-American Workshop* (2010).
- 38 C. B. Müller, and J. Enderlein. Image Scanning Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **104**, 198101 (2010).

- 39 R. Heintzmann, V. Sarafis, P. Munroe, J. Nailon, Q. S. Hanley, and T. M. Jovin. Resolution enhancement by subtraction of confocal signals taken at different pinhole sizes. *Micron* **34**, 293-300 (2003).
- 40 Wang, Y., Kuang, C., Gu, Z., & Liu, X.. Image subtraction method for improving lateral resolution and SNR in confocal microscopy. *Optics & Laser Technology* **48**, 489-494 (2013).
- 41 Giulia M.R. De Luca, Ronald M.P. Breedijk, Rick A.J. Brandt, Christiaan H.C. Zeelenberg, Babette E. de Jong, Wendy Timmermans, Leila Nahidi Azar, Ron A. Hoebe, Sjoerd Stallinga, and Erik M.M. Manders. Re-scan confocal microscopy: scanning twice for better resolution. *Biomedical Optics Express* **4**, 2644-2656 (2013).
- 42 L. Li, C. Kuang, Y. Xue, and X. Liu. Nano-displacement measurement based on virtual pinhole confocal method. *Measurement Science and Technology* **24**, 035003 (2013).
- 43 A. G. York, S. H. Parekh, D. D. Nogare, R. S. Fischer, K. Temprine, M. Mione, A. B. Chitnis, . A. Combs, H. Shroff. Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy. *Nature Methods* **9**, 749-754 (2013).
- 44 J. R. Choi, and D. Kim. Enhanced image reconstruction of three-dimensional fluorescent assays by subtractive structured-light illumination microscopy. *JOSA A* **29** (2012).
- 45 X. Hao, C. Kuang, Z. Gu, S.Li, J. Ge, and X. Liu. Optical super-resolution by subtraction of time-gated images. *Optics letters* **38**, 1001-1003 (2013).
- 46 R. Heintzmann, and C. Cremer. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. *Proc. SPIE* **3568**, 185-196 (1999).
- 47 A. Brunner, G. Best, R. Amberger, P. Lemmer, T. Ach, S. Dithmar, R. Heintzmann and C. Cremer, Fluorescence Microscopy with Structured Excitation Illumination, *Handbook of Biomedical Optics*, (ed D. A. Boas, C. Pitris, N. Ramanujam), CRC Press (2011).
- 48 Gustafsson, M. G. L. Extended resolution fluorescence microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 627-634 (1999).

- 49 Lukosz, W. Optical systems with resolving powers exceeding the classical limit. *J. Opt. Soc. Am. A* **53**, 1463-1471 (1966).
- 50 Lukosz, W. Optical systems with resolving powers exceeding the classical limit. II. *J. Opt. Soc. Am. A* **57**, 932-941 (1967).
- 51 M. A. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *J. Opt. Soc. Am. A* **22**, 1905-1907 (1997).
- 52 E. Mudry, K. Belkebir, J. Girard, J. Savatier, E. Le Moal, C. Nicoletti, M. Allain, and A. Sentenac. Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns. *Nature Photonics* **6**, 312-315 (2012).
- 53 R. Fiolka, M. Beck, and A. Stemmer. Structured illumination in total internal reflection fluorescence microscopy using a spatial light modulator. *Opt. Lett.* **33**, 1629-1631 (2008).
- 54 G. Saavedra, M. Martínez-Corral. in *Progress in Optics* Vol. 53 (ed E. Wolf) 1-68 (Elsevier, 2009).
- 56 M. G. L. Gustafsson, L. Shao, P. M. Carlton, C. J. R. Wang, I. N. Golubovskaya, W. Z. Cande, D. A. Agard, and J. W. Sedat, "," *Biophysical J.* 94(12), 4957-4970 (2008). Three-Dimensional Resolution Doubling in Wide-Field Fluorescence Microscopy by Structured Illumination. *Biophysical J.*, 4957-4970 (2008).
- 57 L.H. Schaefer, D. Schuster, and J. Schaffer. Structured illumination microscopy: artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach. *J Microsc.* **216**, 165-174 (2004).
- 58 Wicker K, Mandula O, Best G, Fiolka R, Heintzmann R. Phase optimisation for structured illumination microscopy. *Opt Express.* **21**, 2032-2049 (2013).
- 59 E. Sánchez-Ortiga, M. Shaw, P. Tôrok, G. Saavedra, M. Martínez-Corral, and J. Garcia-Sucerquia. Phase-shift tolerant reconstruction method for 2D structured illumination microscopy. *Appl. Opt.* (en redacción).
- 60 E. Sánchez-Ortiga, A. Doblas, G. Saavedra, M. Martínez-Corral, and J. Garcia-Sucerquia. Flexible light-efficient production of structured illumination microscopy by using a Fresnel biprism. *Opt. Lett.* (en redacción).

- 61 A. Doblas, G. Saavedra, M. Martínez-Corral, J. C. Barreiro, E. Sánchez-Ortiga, and A. Llavador. Axial resonance of periodic patterns by using a Fresnel biprism. *J. Opt. Soc. Am. A* **30**, 140-148 (2013).
- 62 Gabor, D. A new microscopic principle. *Nature* **161**, 777-778 (1948).
- 63 Gabor, D. Holography, 1948-1971. *Science* **177** (1972).
- 64 Hariharan, P. *Optical Holography: Principles, techniques, and applications*. (Cambridge University Press, 1996).
- 65 J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, S. K Jericho, P. Klages, M. H. Jericho, H. J. Kreuzer. Digital in-line holographic microscopy. *Appl. Opt.* **45**, 836-850 (2006).
- 66 Jüptner, U. Schnars and W. Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction. *Appl. Opt.* **33**, 179-181 (1994).
- 67 Schnars, U. Direct phase determination in hologram interferometry with use of digitally recorded holograms. *J. Opt. Soc. Am. A* **11**, 2011–2015 (1994).
- 68 E. Cuche, P. Marquet, and C. Depeursinge. Spatial filtering for zero-order and twin-image elimination in digital off-axis holography. *Appl. Opt.* **39**, 4070–4075 (2000).
- 69 D.P. Kelly, B.M. Hennelly, N.Pandey,T.J. Naughton, and W.T. Rhodes. Resolution limits in practical digital holographic systems. *Optical Engineering* **48**, 095801(095801-095813) (2009).
- 70 Gutmann, B. & Weber, H. Phase unwrapping with the branch-cut method: role of phase-field direction. *Applied optics* **39**, 4802-4816 (2000).
- 71 Hwang, W. J., Cheng, S. C. & Cheng, C. J. Efficient phase unwrapping architecture for digital holographic microscopy. *Sensors (Basel)* **11**, 9160-9181 (2011).
- 72 Nicolas Verrier, and Michael Atlan. Off-axis digital hologram reconstruction: some practical considerations. *Appl. Opt.* **34** (2011).

- 73 P. Marquet, B. Rappaz, P. J. Magistretti, E. CuChe, Y. Emery, T. Colomb, and C. Depeursinge. Digital holographic microscopy: a non-invasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. *Opt Lett.* **30**, 468-471 (2005).
- 74 Sheppard, S. S. Kou and C. J. R. Imaging in digital holographic microscopy. *Opt Express.* **15**, 13640-13648 (2007).
- 75 F. Montfort, F. Charrière, T. Colomb, E. CuChe, P. Marquet, and C. Depeursinge. Purely numerical compensation for microscope objective phase curvature in digital holographic microscopy: influence of digital phase mask position. *J. Opt. Soc. Am. A* **23**, 2944–2953 (2006).
- 76 Q. Weijan, Y. Yingjie, C. O. Choo, and A. Asundi. Digital holographic microscopy with physical phase compensation. *Opt Lett.* **34**, 276–1279 (2009).
- 77 A. Doblaz, E. Sánchez-Ortiga, M. Martínez-Corral, G. Saavedra, P. Andrés, and J. Garcia-Sucerquia. Inaccuracies in quantitative phase digital holographic microscopy introduced by quadratic phase factors. *Opt. Lett.* **38**, 1352-1354 (2013).
- 78 T. Colomb, J. Kühn, F. Charière, and C. Depeursinge. Total aberrations compensation in digital holographic microscopy with a reference conjugated hologram. *Opt. Express* **14** (2006).
- 79 T. Colomb, F. Montfort, J. Kühn, N. Aspert, E. CuChe, A. Marian, F. Charrière, S. Bourquin, P. Marquet, and C. Depeursinge. Numerical parametric lens for shifting, magnification, and complete compensation in digital microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A* **23**, 3177–3190 (2006).
- 80 Coppola, G., Di Caprio, G., Gioffre, M., Puglisi, R., Balduzzi, D., Galli, A., Miccio, L., Paturzo, M., Grilli, S., Finizio, A. & Ferraro, P. Digital self-referencing quantitative phase microscopy by wavefront folding in holographic image reconstruction. *Optics letters* **35**, 3390-3392, doi:10.1364/OL.35.003390 (2010).
- 81 P. Ferraro, S. De Nicola, A. Finizio, C. Coppola, S. Grilli, C. Magro, and G. Pierattini. Compensation of the inherent wave front curvature in digital holographic coherent microscopy for quantitative phase-contrast imaging. *Appl. Opt.* **42**, 1938–1946 (2003).

- 82 K. W. Seo, Y. S. Choi, E. S. Seo, S. J. Lee. Aberration compensation for objective phase curvature in phase holographic microscopy. *Opt. Lett.* **23**, 4976-4978 (2012).
- 83 E. Sánchez-Ortiga, P. Ferraro, M. Martínez-Corral, G. Saavedra, and A. Doblás. Digital holographic microscopy with pure-optical phase compensation. *J. Opt. Soc. Am. A* **28**, 1410-1417 (2011).
- 84 G Saavedra, E. Sanchez-Ortiga, M Martínez-Corral, A Doblás, and P Ferraro. Optically undistorted digital holographic microscopy for quantitative phase imaging. *IEEE Workshop on Information Optics (WIO), 10th Euro-American Workshop* (2010).
- 85 E. Sánchez-Ortiga, A. Doblás, G. Saavedra, M. Martínez-Corral, and J. Garcia-Sucerquia. Off-axis Digital Holographic Microscopy: practical design parameters for operating at diffraction limit *Appl. Opt.* **53**(9), (2014).
- 86 P. Picart, and J. Leval. General theoretical formulation of image formation in digital Fresnel holography. *J. Opt. Soc. Am. A* **25**, 1744-1762 (2008).
- 87 A. Doblás, E. Sánchez-Ortiga, M. Martínez-Corral, G. Saavedra, and J. Garcia-Sucerquia. Accurate quantitative phase imaging of biological specimens with telecentric digital holographic microscopy. *JBO* (aceptado).
- 88 E. Sánchez-Ortiga, A. Doblás, M. Martínez-Corral, G. Saavedra, and J. Garcia-Sucerquia. . Aberration compensation for objective phase curvature in phase holographic microscopy: comment *Opt. Lett.* **39**(3), 417-417,(2014).
- 89 E. Sánchez-Ortiga, A. Doblás, G. Saavedra, M. Martínez-Corral, P. Andrés, and J. Garcia-Sucerquia. Módulo adaptable a un microscopio óptico para obtener imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital (MAMHD). (P201331584).
- 90 Merola, F., Miccio, L., Memmolo, P., Di Caprio, G., Galli, A., Puglisi, R., Balduzzi, D., Coppola, G., Netti, P. & Ferraro, P. Digital holography as a method for 3D imaging and estimating the biovolume of motile cells. *Lab on a chip*, doi:10.1039/c3lc50515d (2013).

- 91 Coppola, G., Di Caprio, G., Wilding, M., Ferraro, P., Esposito, G., Di Matteo, L., Dale, R. & Dale, B. Digital holographic microscopy for the evaluation of human sperm structure. *Zygote*, 1-9, doi:10.1017/S0967199413000026 (2013).
- 92 C. Yuan, G. Situ, G. Pedrini, J. Ma, and W. Osten. Resolution improvement in digital holography by angular and polarization multiplexing. " *Appl. Opt.* **2011**, B6-B11 (2011).
- 93 P. Gao, G. Pedrini, and W. Osten,. Structured illumination for resolution enhancement and autofocusing in digital holographic microscopy. *Opt. Lett.* **38**, 1328-1330 (2013).
- 94 V. Mico, Z. Zalevsky, C. Ferreira, and J. García. Superresolution digital holographic microscopy for three-dimensional samples. *Opt. Express* **16**, 19260-19270 (2008).
- 95 E. Sánchez-Ortiga, M. Martínez-Corral, G. Saavedra, and J. Garcia-Sucerquia. Doubling spatial resolution in digital holographic microscopy by biprism structured illumination *Opt. Lett.* (en revisión).
- 96 E. Sánchez-Ortiga, G. Saavedra, M. Martínez-Corral, and J. Garcia-Sucerquia. Unknown phase-shift reconstruction method for structured illumination-digital holographic microscopy. (en redacción).
- 97 P. Latorre-Carmona, E. Sánchez-Ortiga, X. Xiao, F. Pla, M. Martínez-Corral, H. Navarro, G. Saavedra, and B. Javidi. Multispectral integral imaging acquisition and processing using a monochrome camera and a liquid crystal tunable filter. *Opt. Express* **20**, 25960-25969 (2012).
- 98 H. Navarro, E. Sánchez-Ortiga, G. Saavedra, A. Llavador, A. Dorado, M. Martínez-Corral, and B. Javidi. Non-homogeneity of lateral resolution in integral imaging. *J. Display Technol.* **9**, 37-43 (2013).
- 99 Nyquist, H. Certain topics in telegraph transmission theory. *Trans. AIEE* **47**, 617-644 (1928).
- 100 Shannon, C. E. Communication in the presence of noise. *Proc. Institute of Radio Engineers* **37**, 10-21 (1949).

