

ESTIMACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN DE ESPECIMENES EN MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Mauricio Abel Tanus Mafud (1), Javier Eduardo Diaz Zamboni (2) y Víctor Hugo Casco (3).

(1), (2) y (3) Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Entre Ríos. Oro Verde, Argentina.
Email: mtanusmafud@gmail.com

El conocimiento preciso de la función de esparcimiento puntual o PSF (del inglés, *Point Spread Function*) de un microscopio es esencial en el procesamiento y análisis cuantitativo de imágenes. Su importancia reside en la información contenida en la PSF, que describe la imagen formada por una fuente puntual de luz luego de atravesar el sistema óptico del instrumento. Idealmente el microscopio sólo difracta la luz y las imágenes deberían estar libres de aberraciones. En la práctica, sin embargo, las imágenes exhiben aberraciones y ruido. Debido a esto, se han desarrollado varios métodos para aproximar la PSF, clasificables como experimental, teórica y analítica. En la forma experimental se utilizan esferas fluorescentes de subresolución, las que son registradas en las mismas condiciones que el espécimen. Las PSFs así registradas representan sólo una porción del espacio y poseen ruido; sin embargo, tienen la ventaja de generar una PSF más realista, evidenciando aberraciones que son difíciles de modelar en forma teórica. La determinación teórica, por su parte, responde a un conjunto de ecuaciones matemáticas que describen el modelo físico de los sistemas ópticos. Los parámetros del modelo son extraídos de los datos del instrumento y las condiciones de captura. El modelado de ciertas aberraciones y la ausencia de ruido son sus principales ventajas. Finalmente, la forma analítica, combina ambas formas, utilizando técnicas de estimación para ajustar los parámetros de un modelo teórico a partir de datos reales. En este trabajo se presentan los resultados de la estimación del índice de refracción del espécimen (n_s), del modelo teórico escalar de PSF tridimensional, de Gibson y Lanni [1]. Para ello, se obtuvo un estimador basado en la maximización de la función de verosimilitud de los datos q afectados por ruido de disparo (distribución Poisson), al modelo respecto de la variable de ajuste n_s (Ec. 1). La expresión analítica obtenida, se simplificó truncando su expansión en series de Taylor al término de primer orden, obteniéndose una ecuación iterativa (Ec. 2). Adicionalmente, como estándar de comparación, se computó la cota de Cramér-Rao (Ec. 3), la cual establece la máxima precisión teórica que puede alcanzar un estimador [2] [3]. Las pruebas se realizaron por simulación de datos. Para cada nivel de intensidad, se generaron 50 imágenes afectadas por ruido Poisson a partir de una sección bidimensional desenfocada del modelo teórico de Gibson y Lanni con un valor conocido de n_s igual a 1,33; a 5 μm de profundidad y desenfocada 0,5 μm hacia la lente objetiva. Se consideró una lente objetiva de magnificación de 100x NA 1,30 e inmersión en aceite con índice de refracción 1,515. Se asumió una longitud de onda de emisión 530 nm. Los demás parámetros ópticos se consideraron bajo diseño, anulándose así los términos que aportan a la aberración esférica. Como estimaciones iniciales se generaron valores n_s de forma aleatoria distribuidos uniformemente entre 1,32 y 1,34. En la figura 1 se observa que, a medida que aumenta el número de fotones sensados, las estimaciones se agrupan de modo más estrecho en torno al n_s real, evidenciando una mejora en su precisión, conforme se incrementa el nivel de la señal. Una vez estimado el parámetro n_s a partir de imágenes con ruido (Figura 2, izquierda) es posible obtener una imagen libre de ruido (Figura 2, derecha). Las pruebas de hipótesis realizadas con desviaciones estándar de los estimadores obtenidos y la cota teórica de Cramér-Rao arrojaron que, para la mayoría de las condiciones de ruido analizadas, no hay diferencias significativas (prueba Chi cuadrado de igualdad de las varianzas). En relación al desempeño general se observa que el estimador mejora la precisión, aun en condiciones de muy baja intensidad de luz. Sin embargo, esta técnica requiere de una buena aproximación inicial, lo cual puede complementarse con otras técnicas ópticas y/o computacionales. Se propone que el método de estimación analizado puede ser utilizado para estimar índices de refracción de especímenes vivos, también como herramienta para calibración de medios de montaje empleados en distintas situaciones experimentales. Adicionalmente, se propone que podría combinarse conjuntamente con técnicas de desconvolución para reducir aberraciones y ruido generados en el registro de imágenes.

REFERENCIAS

- [1] Gibson S., (1991) “Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy”. *J Opt Soc Am A*, 8(10): 1601-1613.
- [2] Aguet F., (2005) “A maximum-likelihood formalism for sub-resolution axial localization of fluorescent nanoparticles”. *Opt Express*, 13(26): 10503–10522.
- [3] Frieden R., (2001) “*Probability. statistical optics, and data testing: a problem solving approach*”, Berlin, Springer, pp. 387-416.

FIGURAS Y ECUACIONES

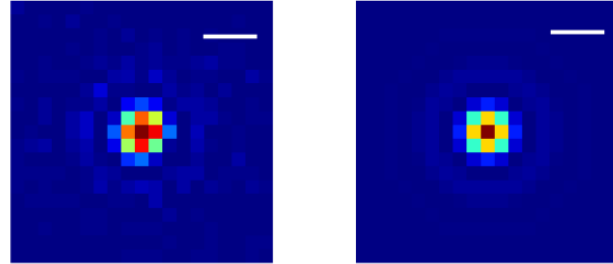
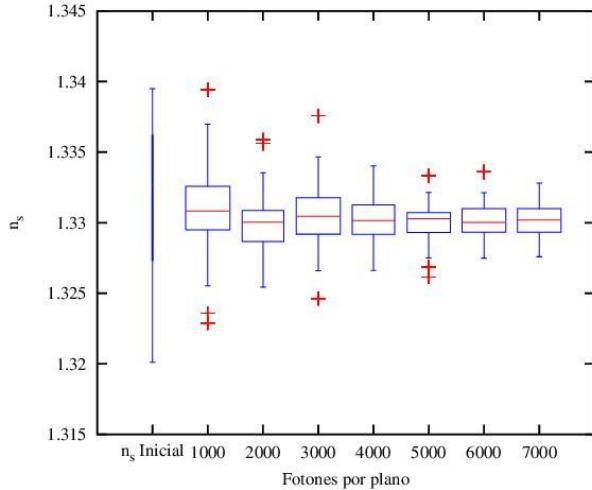


Fig. 2. Izquierda: imagen pseudocoloreada con ruido Poisson (5000 fotones totales en el plano). Derecha: imagen generada a partir de la estimación del valor de n_s . Escala, 0,36 μ m.

Fig. 1. Estimaciones del parámetro n_s , en función del incremento del número de fotones registrados en el plano. Los cálculos se realizaron a partir de un conjunto pequeño de estimaciones iniciales distribuidos uniformemente.

$$\frac{\partial}{\partial n_s} [\ln(L(q; n_s))] = \frac{\partial}{\partial n_s} \left[\ln \left[\prod_{n=1}^N \prod_{x,y \in S} \left(\frac{e^{-\bar{q}} \bar{q}^q}{q!} \right) \right] \right] \equiv 0$$

$$n_s^{m+1} = n_s^m - \frac{\sum_{n=1}^N \sum_{x,y \in S} \left(\frac{\partial \bar{q}}{\partial n_s} \left(\frac{q}{\bar{q}} - 1 \right) \right)}{\sum_{n=1}^N \sum_{x,y \in S} \left(\frac{\partial^2 \bar{q}}{\partial n_s^2} \left(\frac{q}{\bar{q}} - 1 \right) - \frac{q}{\bar{q}^2} \left(\frac{\partial \bar{q}}{\partial n_s} \right)^2 \right)}$$

$$Var(n_s) \geq \frac{1}{I(n_s)} = \frac{1}{-E \left[\frac{\partial^2}{\partial n_s^2} \ln(L(q; n_s)) \right]} = \frac{1}{\sum_{n=1}^N \sum_{x,y \in S} \left(\frac{1}{\bar{q}} \left(\frac{\partial \bar{q}}{\partial n_s} \right)^2 \right)}$$

Ec. 1. Maximización de la función de verosimilitud. N número de planos, q fotones en la imagen; x,y coordenadas de los píxeles en el plano del sensor.

Ec. 2. Ecuación iterativa para la estimación del n_s , a partir de una estimación inicial. El parámetro m indica iteración.

Ec. 3. Cota de Cramér-Rao. $I(n_s)$ información de Fisher del parámetro n_s . $E[\cdot]$, representa el valor esperado.