

Tesis Doctoral

Obtención de imágenes óptimas por técnicas de Fourier. Aplicación al microscopio con análisis de polarización

Ciucci Brazzano, Ligia

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ciucci Brazzano, Ligia. (2011). Obtención de imágenes óptimas por técnicas de Fourier. Aplicación al microscopio con análisis de polarización. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ciucci Brazzano, Ligia. "Obtención de imágenes óptimas por técnicas de Fourier. Aplicación al microscopio con análisis de polarización". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

Obtención de imágenes óptimas por técnicas de Fourier. Aplicación al microscopio con análisis de polarización

Trabajo de Tesis para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Físicas

Lic. Ligia Ciocci Brazzano

Director: Dr. Juan Miguel Simon

Director asistente: Dr. Rodolfo Manuel Echarri

Lugar de trabajo: Grupo de Láser, Óptica de Materiales y Aplicaciones Electromagnéticas,
Departamento de Física, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires

Septiembre de 2011

Resumen

En este trabajo proponemos e implementamos una nueva técnica para la optimización de imágenes del microscopio de gran apertura numérica. En estos sistemas la teoría escalar de la difracción no es una buena aproximación, por lo que para el desarrollo y validación de nuestra técnica, proponemos un modelo numérico original de la teoría vectorial de la difracción. Este modelo permite calcular, en el plano imagen, el campo eléctrico producido por un emisor puntual. Éste basa en una modificación del principio de Huygens-Fresnel, utilizando ondas secundarias esféricas vectoriales, en combinación con un método de integración de Monte Carlo. Aplicando este modelo estudiamos la formación de imágenes en el microscopio, considerando objetos autoluminosos no polarizados, y comparando las predicciones hechas por las teorías escalar y vectorial de la difracción, para microscopios con distintas aperturas numéricas. A partir de estos estudios desarrollamos una técnica de procesamiento de imágenes en el espacio de las frecuencias, a la que denominamos pseudodeconvolución. Ésta se basa en la corrección de la transformada de Fourier de la imagen por un factor dado por la relación simulada entre la función transferencia y una función transferencia meta, con mejores características para la resolución y el contraste. Nuestros estudios con simulaciones numéricas muestran que es posible obtener una mejora en la resolución de entre un 10 y un 15%, y una mejora cualitativa en el contraste. Aplicamos finalmente esta técnica a imágenes experimentales, verificando los resultados obtenidos en las simulaciones numéricas.

Palabras clave: *teoría vectorial de la difracción, gran apertura numérica, formación de imágenes en el microscopio, procesamiento de imágenes, técnicas de Fourier, mejoras en la resolución*

Title: Obtaining optimum images by Fourier techniques. Application to the microscope with polarization analysis

Abstract: In this work we develop a novel technique to optimize images taken with high numerical aperture microscopes. As scalar diffraction theory is a poor approximation for these optical systems, we propose an original numerical model to calculate the image predicted by vector diffraction theory, to validate our technique. This model allows us to calculate the electric field produced in the image plane by a point source. It is based on modification of the Huygens-Fresnel principle that uses spherical vector wavelets, combined with a Monte Carlo integration method. Using this model we investigate image formation in the microscope for self-luminous unpolarized objects, comparing the predictions of scalar and vector diffraction theories, for different numerical apertures. We develop a new image processing technique, named pseudodeconvolution, based on the correction of the Fourier transform of the image. The correction factor is given by the simulated ratio between the transfer function and a goal transfer function, which is selected to provide an improvement in both the resolution and the contrast. Our results show that it is possible to improve the original image resolution by about 10 to 15%, and also obtain a contrast enhancement. Finally, we apply our technique to experimental images, verifying the results obtained by simulated images.

Key words: *vectorial diffraction theory, high numerical aperture, microscope image formation, image processing, Fourier techniques, resolution enhancement*

Contenido

1	Introducción	5
2	Aspectos teóricos	9
2.1	El microscopio	9
2.2	Sistemas lineales invariantes	13
3	Efectos de la polarización en la formación de imágenes	17
3.1	Modelado del proceso de formación de imágenes	17
3.2	Transmisión del sistema óptico	21
3.3	PSF para objetos autoluminosos	23
3.4	Resolución	28
3.5	Sistema de iluminación	34
4	La Función Transferencia	41
4.1	transformada de Fourier discreta de una imagen	41
4.2	Dependencia con la apertura numérica	45
4.3	La MTF cerca de la frecuencia de corte	46
4.4	Efectos de borde	48
5	Obtención de imágenes óptimas	55
5.1	Pseudodeconvolución	55
5.1.1	Corrección de indeterminaciones	57
5.1.2	Dependencia con el tamaño de la PSF	58
5.2	Efectos de borde	64
5.3	Ruido	72
5.4	Polarizadores	77

6 Pseudodeconvolución de imágenes experimentales	83
6.1 Obtención de las imágenes	83
6.2 Corrección de efectos instrumentales	85
6.3 Pseudodeconvolución	87
6.4 Aplicación a objetos conocidos	93
7 Conclusiones y perspectivas	97

Capítulo 1

Introducción

El microscopio óptico es una herramienta ampliamente utilizada tanto en los laboratorios de investigación como en la industria. Se han desarrollado una gran variedad de técnicas que permiten su utilización para el estudio de distintos tipos de objetos, desde células hasta aleaciones metálicas. Por ejemplo, la microscopía por fluorescencia (e.g. Huang et al. 2009 y sus referencias) es de particular utilidad en la biología y las ciencias biomédicas para investigar, entre otros, la morfología y función celular (e.g. Pepperkok & Ellenberg 2006 y sus referencias, Comeau et al. 2006, Schermelleh et al. 2010). La microscopía confocal (e.g. Webb 1996 y sus referencias) se utiliza, entre otros, en la caracterización de partículas coloidales (e.g. Prasad et al. 2007) o en endoscopía para hacer imágenes de secciones del epitelio gastrointestinal (e.g. Evans & Nishioka 2005). La microscopía con análisis de polarización (e.g. Kubota & Inoué 1959) se aplica en el diagnóstico de la malaria (e.g. Maude et al. 2009), en la adquisición de imágenes de tejidos como cartílagos y tendones (e.g. Farahat 2010) o en el estudio metalográfico de dendritas (e.g. LaLonde et al. 2004), entre otros. Si bien estas técnicas han alcanzado un elevado grado de desarrollo, permitiendo obtener resoluciones superiores a la microscopía convencional, esta última es aún ampliamente utilizada. Esto se debe en parte a que hay objetos que no pueden ser estudiados con las técnicas avanzadas, y en parte a que los microscopios ópticos son mucho más económicos, sus condiciones de operación son más sencillas y la técnica es no invasiva.

Dado que el objetivo de toda técnica de microscopía es estudiar la estructura de un objeto con el mayor detalle posible, la resolución, entendida como la mínima distancia entre dos objetos puntuales de igual intensidad que el instrumento es capaz de distinguir, es una propiedad importante del sistema. Todas las técnicas de microscopía tienen un límite en su resolución, en parte debido a la difracción, y en parte debido al sistema óptico y de

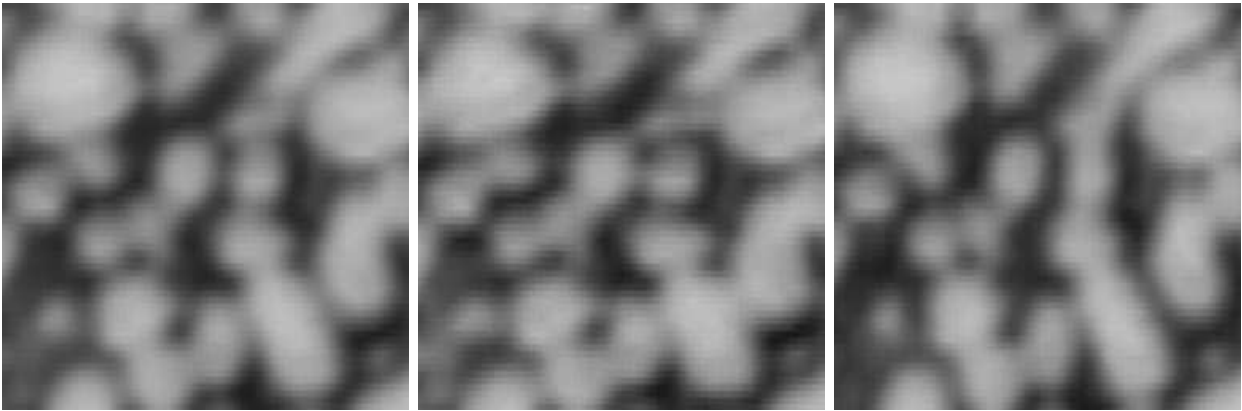


Figura 1.1: Imágenes episcópicas de un mismo objeto metalográfico. A la izquierda se puede ver la imagen sin colocar el analizador, en el centro con un analizador con su eje de absorción vertical, y a la derecha con un analizador con su eje de absorción horizontal. Notar que, al utilizar analizadores, la imagen presenta un ensanchamiento en la dirección ortogonal al eje de absorción del analizador.

adquisición de imágenes. Mejorar la resolución del microscopio ha sido la meta de una gran cantidad de investigaciones desde los albores de la microscopía (e.g., den Dekker & van den Bos 1997 y sus referencias).

Existen numerosas técnicas para mejorar la resolución en un microscopio óptico, que pueden dividirse en dos grandes grupos: las que se basan en modificaciones del arreglo experimental, y las que utilizan el procesamiento de imágenes. En el primer grupo, diversos autores investigaron el uso de pupilas anulares (e.g., Horikawa 1994; Sheppard & Choudhury 2004 y sus referencias), para las que el disco central del patrón de difracción se angosta, mejorando la resolución. También se emplean con este mismo fin los condensadores anulares (McKechnie 1972; Nayyar & Verma 1976). En el segundo grupo, existen numerosos estudios sobre procesamiento de imágenes que mejoran la resolución. Estas técnicas se basan en descripciones teóricas del sistema óptico, y buscan corregir defectos producidos por el mismo presentes en la función ensanchamiento. Estas se conocen como técnicas de restauración de la imagen o de deconvolución, y son ampliamente utilizadas en una gran variedad de problemas (una buena introducción al tema se puede encontrar en Bertero & Boccacci 1998). También hay técnicas que no sólo pretenden corregir defectos debidos a aberraciones o desenfoque, sino también corregir los producidos por la difracción. Estas técnicas se conocen como de superresolución (e.g. Bertero & Boccacci 2003).

Tanto las técnicas experimentales como las de procesamiento de imágenes presentan

problemas. Dentro del primer grupo, si bien tanto la obstrucción de la pupila como del condensador hacen que el disco central del patrón de difracción se angoste, mejorando de esta manera la resolución, los anillos exteriores se hacen más intensos, lo que se traduce en una pérdida de contraste en las imágenes y hace necesario el uso de técnicas complementarias para reducir su intensidad. En el segundo grupo, los algoritmos de cálculo suelen ser muy complejos, y la descripción teórica del sistema óptico en la que se basan no suele tener en cuenta la naturaleza vectorial de la luz. El tratamiento de la difracción de la luz con la teoría escalar es correcto dentro del rango de validez de la aproximación de ángulos pequeños. Un ejemplo de la insuficiencia de la aplicación de esta teoría para el estudio de algunos problemas lo constituye un interferómetro de Lloyd en el que nos alejamos considerablemente de la incidencia rasante (e.g., Simon et al. 1987).

En el caso de los microscopios de gran apertura numérica, los semiángulos de entrada alcanzan valores de $\sin \alpha = 0.9$ ($\alpha \sim 64^\circ$) e incluso $\sin \alpha = 0.95$ ($\alpha \sim 71, 7^\circ$), por lo que en estos casos el tratamiento vectorial de la luz es imprescindible. Un ejemplo de esto se observa en la figura 1.1, en la que mostramos una imagen de solidificaciones dendríticas tomada con un microscopio metalográfico con análisis de polarización, que es una variante del microscopio con luz polarizada en la que el objeto se ilumina con luz natural pero se utiliza un polarizador lineal (analizador) para analizar la polarización de la imagen. En esta figura se pueden apreciar tres imágenes del mismo objeto tomadas en distintas condiciones: la de la izquierda corresponde a una imagen sin analizador, la central corresponde a una imagen tomada colocando un analizador cuyo eje de absorción está orientado verticalmente respecto a la imagen, y finalmente la de la derecha corresponde a una imagen tomada colocando un analizador cuyo eje de absorción está orientado horizontalmente respecto a la imagen. Es notorio que las imágenes presentan un ensanchamiento en la dirección ortogonal al eje de absorción del analizador, y por consiguiente la resolución no es la misma en ambas direcciones. Este efecto se debe a la naturaleza vectorial de la luz.

En una serie de trabajos, Richards y Wolf (Wolf 1959; Richards & Wolf 1959) introdujeron un método teórico para obtener una representación integral aproximada del campo eléctrico producido por un sistema óptico en el plano imagen, teniendo en cuenta el carácter vectorial de la luz. Este método se basa en una modificación del principio de Huygens-Fresnel, en el que se consideran ondas secundarias planas, vectoriales, en vez de ondas secundarias esféricas escalares. Estos autores fueron los primeros en estudiar la formación de imágenes producidas por un haz paralelo linealmente polarizado que entra a un objetivo de microsco-

pio, suponiendo imagen perfecta (Richards & Wolf 1959). En la actualidad, la mayoría de los modelos que utilizan la teoría vectorial de la difracción se basan en el método de Wolf y Richards (e.g. Zhan 2009 y sus referencias), aunque otros autores siguieron investigando en esta dirección (e.g. Sheppard et al. 1977).

En este trabajo desarrollamos un modelo numérico (Ciocci et al. 2010) para describir la formación de imágenes en sistemas de gran apertura numérica, a partir de primeros principios y considerando el carácter vectorial de la luz. Nuestro modelo se basa, al igual que el de Wolf y Richards, en la modificación del principio de Huygens-Fresnel. A diferencia de estos autores, nosotros consideramos ondas secundarias esféricas vectoriales. Este modelo sienta las bases para el desarrollo y validación de las técnicas de procesamiento de imágenes que proponemos en este trabajo, y con las que buscamos mejorar la resolución en las imágenes obtenidas con un microscopio convencional de gran apertura numérica, y particularmente en microscopios con análisis de polarización.

En el capítulo 2 presentamos los aspectos teóricos que es necesario tener presentes para la comprensión de este trabajo. En el capítulo 3 desarrollamos nuestro modelo numérico aplicando la teoría vectorial de la difracción al estudio de la formación de imágenes en sistemas con gran apertura numérica. Particularmente estudiamos la dependencia de la función ensanchamiento y la resolución del sistema con la apertura numérica, comparando los resultados obtenidos al considerar la teoría vectorial de la difracción y la teoría escalar. En el capítulo 4 estudiamos las propiedades de la función transferencia, en particular su dependencia con la apertura numérica del sistema y los efectos de borde, y analizamos diversas estrategias para eliminarlos. En el capítulo 5 desarrollamos distintos métodos para mejorar la calidad de una imagen por medio de transformaciones en el espacio de las frecuencias, para lo que aplicamos nuestro modelo de la teoría vectorial de la difracción tanto a la simulación de imágenes de múltiples puntos como a la simulación de la función ensanchamiento del sistema. En el capítulo 6 investigamos la aplicación de los métodos que desarrollamos en el capítulo anterior a imágenes experimentales. Finalmente en el capítulo 7 presentamos las conclusiones de este trabajo.

Capítulo 2

Aspectos teóricos

Para la comprensión de este trabajo es necesario tener presentes algunos conceptos fundamentales acerca de los principios de funcionamiento del microscopio y las magnitudes que lo caracterizan. Dado que es posible considerar al microscopio como un sistema lineal invariante (isoplanático), es importante también conocer el comportamiento de este tipo de sistemas. En este capítulo describimos brevemente estos conceptos.

2.1 El microscopio

La teoría del funcionamiento del microscopio óptico convencional, tanto desde el punto de vista geométrico como desde el punto de vista de la óptica ondulatoria, es muy conocida y está descripta en numerosos libros de texto (e.g., Jenkins & White 1957; Born & Wolf 1987; Hecht 1987). El microscopio óptico convencional está diseñado para explorar sistemas que, debido a sus pequeñas dimensiones, no pueden ser estudiados a simple vista. El esquema más sencillo de un microscopio óptico convencional es el que muestra la figura 2.1. Consta de dos sistemas formadores de imágenes: el *objetivo*, caracterizado por una distancia focal f_{ob} , y el *ocular*, con una distancia focal $f_{oc} > f_{ob}$. Si bien éste es un esquema muy simplificado comparado con el de un microscopio real, en el que sólo el objetivo puede estar compuesto por unas 15 lentes, es muy útil para comprender su funcionamiento. Dado un objeto ubicado a una distancia del objetivo $z > f_{ob}$, éste forma una imagen intermedia aumentada de ese objeto. El ocular toma como objeto dicha imagen intermedia y forma a su vez una imagen en el infinito, cuyo tamaño angular es mayor al del objeto visto en condiciones de visión normal. De esta manera el aumento efectivo del microscopio se produce en dos etapas. También es posible reemplazar el ocular por un sistema óptico que forme una imagen en el elemento

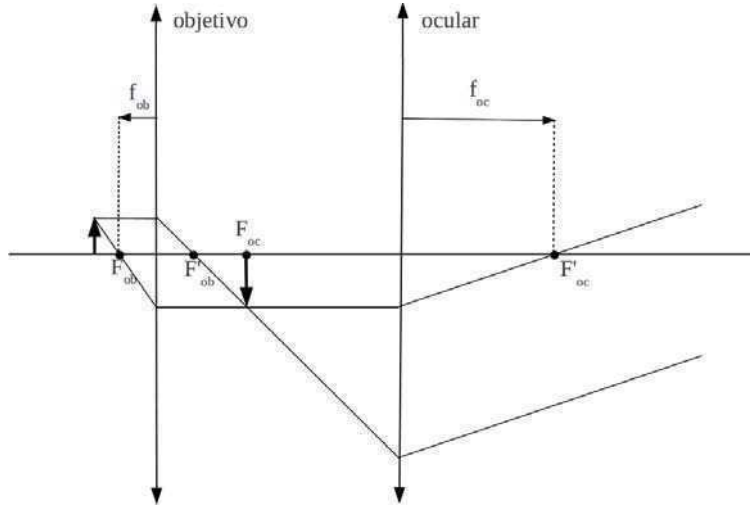


Figura 2.1: Esquema simplificado de un microscopio. La primera lente convergente representa al objetivo, con distancia focal f_{ob} , cuyos focos objeto e imagen son F_{ob} y F'_{ob} respectivamente. La segunda representa al ocular, con distancia focal f_{oc} , cuyos focos objeto e imagen son F_{oc} y F'_{oc} respectivamente.

sensible de un sistema de adquisición, para obtener un registro fotográfico del objeto.

Desde el punto de vista de la óptica geométrica hay dos magnitudes de relevancia para caracterizar un microscopio: su aumento efectivo M y su apertura numérica NA . El aumento efectivo de un instrumento mide la relación entre el tamaño angular Θ' de la imagen de un objeto visto a través del sistema óptico, y el tamaño angular Θ del mismo objeto visto con el ojo desnudo y ubicado a la distancia de visión normal, que usualmente se la considera 25 cm,

$$M = \frac{\Theta'}{\Theta}. \quad (2.1)$$

Es fácil demostrar que el aumento efectivo del microscopio está dado por

$$M = m_{ob} M_{oc}, \quad (2.2)$$

donde m_{ob} es el aumento lateral del objetivo y M_{oc} es el aumento efectivo del ocular (por ejemplo en Simon & Comastri 2005 hay una buena deducción de esta ecuación).

Sin embargo, es importante notar que el grado de detalle con que se pueden observar las estructuras presentes en el objeto no está dado sólo por el aumento efectivo del microscopio,

que es una medida de la escala con la que se reproduce el objeto. Abbe mostró que el grado de detalle con el que se puede observar un objeto, relacionado con el poder resolvente, está determinado solamente por la longitud de onda de la luz que se utiliza para la observación y por la apertura numérica. Ésta es una magnitud que mide la capacidad del objetivo para coleccionar luz y que está definida por

$$NA = n \operatorname{sen}\theta, \quad (2.3)$$

donde n es el índice de refracción del medio en el que se halla inmerso el objeto y θ el semiángulo del cono de rayos que emerge de un punto objeto axial y que es captado por el objetivo. Si bien la resolución es una característica muy importante, no tiene una única definición. La forma clásica de estudiar la resolución de un sistema óptico limitado por difracción (en el que la performance del sistema está determinada sólo por la difracción, debida al tamaño finito de los componentes del sistema óptico), es a través del análisis de la imagen de dos objetos puntuales cercanos, calculada teóricamente. Este análisis permite establecer criterios para determinar la resolución del sistema que están determinados pura y exclusivamente por la forma calculada de la figura de difracción asociada a un emisor puntual. Uno de los criterios más tradicionales para el límite de resolución es el de Rayleigh, que establece que dos fuentes puntuales están justamente resueltas cuando el máximo central del patrón de difracción producido por una de ellas coincide con el primer mínimo del patrón de difracción producido por la otra. Esto hace que el límite de difracción, de acuerdo con este criterio, sea la distancia entre el máximo central de la figura de difracción producida por un emisor puntual y su primer mínimo de intensidad.

Es posible calcular en forma teórica el límite de resolución establecido por el criterio de Rayleigh calculando la figura de difracción producida por un objeto puntual al atravesar una abertura. De acuerdo con el principio de Huygens-Fresnel, el campo producido en un punto (x, y) debido a un campo incidente en una apertura difractante $U(\xi, \eta)$ (ver figura 2.2) está dado por

$$U(x, y) = \frac{z}{j\lambda} \iint_{\Sigma} U(\xi, \eta) \frac{\exp[-jk\sqrt{z^2 + (x - \xi)^2 + (y - \eta)^2}]}{z^2 + (x - \xi)^2 + (y - \eta)^2} d\xi d\eta, \quad (2.4)$$

donde λ es la longitud de onda de la luz, $k = 2\pi/\lambda$, Σ es la superficie de la apertura difractante y x, y, z, ξ y η son las coordenadas definidas en la figura 2.2. En la aproximación

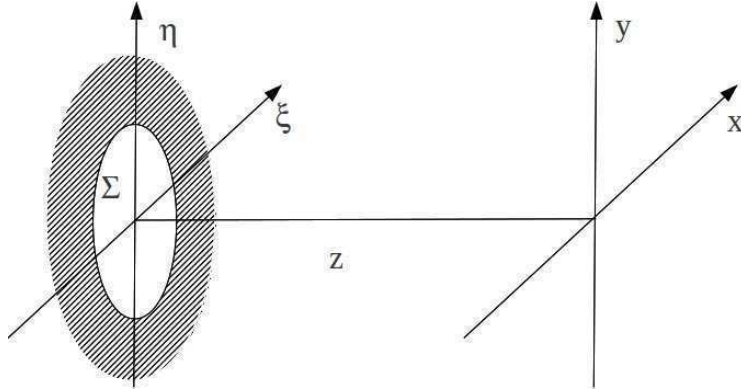


Figura 2.2: Definición de las variables asociadas a la difracción. Las variables ξ y η definen un punto sobre la apertura difractora Σ , z es la distancia al plano de observación, y las variables x e y definen el punto de observación sobre dicho plano.

de Fraunhofer este campo toma la forma

$$U(x, y) = \frac{e^{jkz} e^{jk(x^2+y^2)/2z}}{j\lambda z} \iint_{\Sigma} U(\xi, \eta) \exp[-j\frac{2\pi}{\lambda z}(x\xi + y\eta)] d\xi d\eta. \quad (2.5)$$

Esta expresión nos permite calcular la intensidad del patrón de difracción $I(r)$ producido por un objeto puntual al incidir sobre una apertura circular de radio a , correspondiente al objetivo,

$$I(r) = \left(\frac{A}{\lambda z}\right)^2 \left[2\frac{J_1(kar/z)}{kar/z}\right]^2 \quad (2.6)$$

donde r es la coordenada radial en el plano imagen, $A = \pi a^2$ y $J_1(x)$ es la función de Bessel de primera especie de orden 1. A este patrón de difracción se lo denomina patrón de Airy. Como mencionamos anteriormente, la distancia ρ entre el máximo central de este patrón y el primer mínimo de su intensidad, es el límite de resolución que predice Rayleigh para este sistema,

$$\rho = 1.22 \frac{\lambda z}{a} = 0.61 \frac{\lambda}{NA}. \quad (2.7)$$

Otro criterio para estudiar la resolución un poco más acorde con la capacidad de medición en la actualidad es el de Sparrow, que establece que el límite de difracción es la mínima

separación entre dos fuentes puntuales para la cual el perfil de intensidades conjuntas presenta una depresión central. Para una discusión más exhaustiva sobre este tema se puede ver, por ejemplo, el trabajo de den Dekker & van den Bos (1997).

La deducción de la ecuación 2.5 está hecha en el marco de la teoría escalar de la difracción (de ahora en más TED), que considera que la luz es un fenómeno escalar, y por lo tanto es válida cuando se pueden despreciar los efectos de la polarización (ver por ejemplo Goodman 2005). En determinados sistemas, por ejemplo en sistemas ópticos con gran apertura numérica, como mencionamos en el capítulo 1, no es posible despreciar los efectos de la polarización, por lo que es necesario considerar el carácter vectorial de la luz para obtener una expresión del campo eléctrico. No hay una única teoría que describa el fenómeno de la difracción considerando la naturaleza vectorial de la luz (teoría vectorial de la difracción, de ahora en más TVD). Una aproximación analítica a dicha teoría es la desarrollada por Wolf y Richards (Wolf 1959; Richards & Wolf 1959). En este trabajo presentaremos una aproximación numérica a la teoría vectorial de la difracción.

2.2 Sistemas lineales invariantes

Dado que es posible considerar al microscopio como un sistema lineal invariante, es importante estudiar el comportamiento de este tipo de sistemas. Un sistema es lineal si para cualquier combinación de señales de entrada $g_1(x, y)$ y $g_2(x, y)$, su respuesta es la misma combinación lineal de las respuestas del sistema a cada una de ellas $S(g_1(x, y))$ y $S(g_2(x, y))$, lo que se puede expresar como

$$S(ag_1(x, y) + bg_2(x, y)) = aS(g_1(x, y)) + bS(g_2(x, y)). \quad (2.8)$$

Toda señal puede ser descompuesta en una suma de señales elementales $\delta(x, y)$, de forma tal que una señal compleja $g(x, y)$ puede ser descripta mediante

$$g(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} g(\xi, \eta) \delta(x - \xi, y - \eta) d\xi d\eta. \quad (2.9)$$

En virtud de la linealidad del sistema, su respuesta $f(x, y)$ a esta señal de entrada se puede encontrar como

$$f(x, y) = S(g(x, y)) = \iint_{-\infty}^{\infty} g(\xi, \eta) S(\delta(x - \xi, y - \eta)) d\xi d\eta. \quad (2.10)$$

Se define la función ensanchamiento (de ahora en más PSF por la siglas de Point Spread Function) $h(x, y; \xi, \eta)$ como la respuesta del sistema a una señal elemental

$$h(x, y; \xi, \eta) = S(\delta(x - \xi, y - \eta)). \quad (2.11)$$

De esta forma, la salida del sistema se puede expresar en función de la respuesta del sistema a un impulso elemental como

$$f(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} g(\xi, \eta) h(x, y; \xi, \eta) d\xi d\eta, \quad (2.12)$$

que es la integral de superposición. Si el sistema, además de ser lineal es invariante espacial o isoplanático, es decir que cumple con la propiedad de que la PSF depende solo de las distancias entre el punto de excitación (ξ, η) y el punto de la respuesta (x, y) , la integral de superposición toma la forma

$$f(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} g(\xi, \eta) h(x - \xi, y - \eta) d\xi d\eta. \quad (2.13)$$

Por lo tanto, en el caso particular de un sistema lineal isoplanático, la integral de superposición toma la forma de una convolución. Esto muestra que la respuesta de un sistema con estas características se puede obtener como la convolución entre la señal de entrada y la PSF.

Estos sistemas tienen una descripción particularmente sencilla en el espacio de las frecuencias, a partir de la transformada de Fourier. Transformando Fourier en cada miembro de la ecuación 2.13,

$$F(f_x, f_y) = G(f_x, f_y) H(f_x, f_y), \quad (2.14)$$

donde $F(f_x, f_y)$ y $G(f_x, f_y)$ son las transformadas de Fourier de la respuesta del sistema y de la entrada, respectivamente, y $H(f_x, f_y)$ la transformada de Fourier de la PSF

$$H(f_x, f_y) = \iint_{-\infty}^{\infty} h(x - \xi, y - \eta) e^{-j2\pi(f_x\xi + f_y\eta)} d\xi d\eta. \quad (2.15)$$

A esta función se la conoce como función transferencia (de ahora en más TF por las siglas de Transfer Function), y describe completamente la acción del sistema en el espacio de las frecuencias. En general la TF será una función de variable compleja, y por lo tanto tendrá un módulo y una fase asociados a ella. Al módulo de la TF se lo denomina función transferencia de modulación (de ahora en más MTF, por las siglas de Modulation Transfer Function), y a su fase función transferencia de fase (de ahora en más PTF, por las siglas de Phase Transfer Function). En este trabajo investigaremos métodos de optimización de imágenes basados en operaciones en el espacio de las frecuencias, por lo que estas propiedades son de gran importancia.

Capítulo 3

Efectos de la polarización en la formación de imágenes

Anteriormente mencionamos que el tratamiento escalar de la teoría de la difracción no permite describir adecuadamente el proceso de formación de imágenes en sistemas de gran apertura numérica. Estos sistemas deben analizarse por medio de la teoría vectorial de la difracción. Existen muchos trabajos sobre este tema (e.g., Marathay & McCalmot 2001, Guha & Gillen 2007, Gillen et al. 2009), la gran mayoría de ellos presentan modelos analíticos basados en el estudio de Richards & Wolf (1959). Nosotros proponemos un modelo numérico que nos permite calcular la integral de difracción de Kirchhoff teniendo en cuenta el carácter vectorial de la luz, a partir de primeros principios. Nuestro modelo combina el trazado de rayos con una rutina Monte Carlo para la integración, y nos permite calcular el patrón de difracción para objetos puntuales o combinaciones de ellos, y por consiguiente investigar las propiedades de la PSF y analizar la resolución del sistema.

3.1 Modelado del proceso de formación de imágenes

Un sistema formador de imágenes limitado por difracción, es decir un sistema que no presenta aberraciones, puede caracterizarse a partir de sus propiedades en las pupilas de entrada y de salida, suponiendo que el pasaje de la luz entre ambas está adecuadamente descrito por la óptica geométrica (Goodman 2005). Esto quiere decir que para un sistema con estas características, sin importar su estructura interna, la imagen del objeto se producirá en el lugar en donde se formaría su imagen de acuerdo con la óptica geométrica, y el efecto del sistema será “desparramar” la luz alrededor de dicha imagen.

En el capítulo 1 mencionamos que no hay una única forma de tratar la teoría vectorial para la difracción, y que las soluciones propuestas son analíticas. Nosotros proponemos un abordaje numérico al problema, lo que a nuestro criterio presenta la ventaja de requerir menos hipótesis y simplificaciones. El modelo que desarrollamos nos permite estudiar la formación de imágenes teniendo en cuenta el carácter vectorial de la luz, por medio de la simulación de imágenes. Para calcular la imagen que produce un sistema óptico teniendo en cuenta el carácter vectorial de la luz, es necesario calcular el campo eléctrico que produce el objeto en todo el plano imagen, para lo cual es necesario conocer cómo actúa el sistema óptico sobre los campos eléctricos. Supondremos para lo que sigue que el sistema formador de imágenes cumple con las siguientes propiedades: está libre de aberraciones, no presenta birrefringencia ni polarización, cumple con la condición de los senos de Abbe y posee un eje de simetría. Estas condiciones se cumplen en la mayoría de los casos de interés.

El modelado del proceso de formación de imágenes consta principalmente de tres bloques: el objeto, el sistema óptico y el sistema de adquisición. En este trabajo utilizaremos como base un objeto puntual en el origen de coordenadas que emite ondas esféricas monocromáticas con frecuencia ω y número de onda k , cuyo campo eléctrico en la posición \vec{x} y el instante t es

$$\vec{E}(\vec{x}, t) = \frac{\vec{E}_0(\hat{r})}{r} e^{j(kr - \omega t)}, \quad (3.1)$$

donde r y \hat{r} son la coordenada y el versor radiales usuales, respectivamente. Sin pérdida de generalidad, supondremos que el eje óptico del sistema se encuentra sobre el eje z del sistema de coordenadas. El modelado del objeto, que implica el cálculo de $\vec{E}_0(\hat{r})$, lo describimos en la sección 3.3, en la que trataremos también el caso de un objeto fuera del eje óptico.

El sistema óptico produce una imagen del objeto, centrada en el punto que predice la óptica geométrica, en el que todas las ondas llegan en fase. Para determinar el campo eléctrico en este punto utilizamos un método Monte Carlo para calcular la integral de difracción. Simulamos aleatoriamente un conjunto de rayos que inciden con distribución uniforme sobre la pupila de entrada del sistema, y para cada uno de ellos calculamos la dirección \hat{r}' del rayo emergente y el campo eléctrico $\vec{E}'_0(\hat{r}') = \vec{E}_0(\hat{r})/r'$ que éste produce en el punto imagen, como describimos en la sección 3.2. El campo eléctrico \vec{E}' en una posición arbitraria $\vec{x}' = (x', y')$ del plano imagen (ver figura 3.1) es

$$\vec{E}'(x', y') = \vec{E}'_0(\hat{r}') e^{jk\hat{r}' \cdot \vec{x}'}, \quad (3.2)$$

donde el sistema primado tiene origen en la imagen geométrica del objeto. El campo eléctrico final \vec{E}'_t en un punto cualquiera del plano imagen será la suma vectorial de los campos de cada rayo,

$$\vec{E}'_t(x', y') = \sum_{i=0}^N \vec{E}'(x', y'), \quad (3.3)$$

donde N es el número de rayos. A partir del campo eléctrico así calculado obtenemos la intensidad $I'_t(x', y')$ como

$$I'_t(x', y') = \vec{E}'_t(x', y') \cdot \vec{E}'_t{}^*(x', y'), \quad (3.4)$$

donde $E'_t{}^*(x', y')$ es el complejo conjugado de $E'_t(x', y')$. Finalmente el sistema de adquisición de imágenes muestreará la intensidad en una serie de posiciones (píxeles)

$$(x'_i, y'_k) = (i\Delta, k\Delta), \quad (3.5)$$

donde Δ es el tamaño de un píxel, $i, k \in \mathbb{N}_0$, con $0 \leq i < n_x$ y $0 \leq k < n_y$, siendo n_x y n_y las dimensiones horizontal y vertical de la imagen, respectivamente, medidas en píxeles. La escala de longitudes en la imagen está dada por la longitud de onda $\lambda = 2\pi/k$ y el aumento M del sistema. Para obtener un buen muestreo de la PSF elegimos el tamaño del píxel Δ de forma tal que ésta tenga un diámetro de aproximadamente 40 píxeles en la imagen, para un sistema con $\lambda = 500$ nm, $NA = 0.866$ y $M = 100$. Esto corresponde a píxeles del orden de $3 \mu\text{m}$, levemente inferiores pero del mismo orden de magnitud que los de los sistemas de adquisición reales. Es importante notar que esto significa que hay una relación entre la longitud de onda y el tamaño del píxel. Aprovechando esta relación, en lo sucesivo expresaremos todas las distancias en píxeles.

Dado que nuestro interés es la mejora de las imágenes en el microscopio con análisis de polarización, incluimos en el modelo la posibilidad de colocar un analizador a la salida del sistema óptico. Para simular un analizador, caracterizado por un eje de absorción (Ciocci et al. 2011e, en preparación) ubicado en el plano (x', y') , simplemente eliminamos la componente del campo en la dirección de dicho eje de la ecuación 3.3.

Para comparar nuestros resultados con el caso de la teoría escalar, desarrollamos un modelo análogo para la formación de imágenes de acuerdo a esta teoría. En este caso consideramos el campo eléctrico como un escalar, por lo que reemplazamos la ecuación 3.1 por

$$E(\vec{x}, t) = \frac{E_0(\hat{r})}{r} e^{j(kr - \omega t)}. \quad (3.6)$$

La energía se conserva al atravesar el sistema óptico por lo que, para un rayo dado, el campo eléctrico en la imagen geométrica es $E'_0(\hat{r}') = \frac{E_0(\hat{r})}{r_p r_{ps}}$, siendo r_p y r_{ps} las distancias entre el objeto y las pupilas de entrada y salida, respectivamente. El campo producido por el mismo rayo en el plano imagen resulta

$$E'(x', y') = E'_0(\hat{r}') e^{jk\hat{r}' \cdot \vec{x}'}. \quad (3.7)$$

Finalmente, el campo total en el plano imagen será

$$E'_t(x', y') = \sum_{i=0}^N E'_i(x', y'), \quad (3.8)$$

y la intensidad

$$I'_t(x', y') = E'_t(x', y') E'^*_t(x', y'). \quad (3.9)$$

De este modo podemos simular las imágenes que resultarían en caso de ser correcta la teoría escalar, y comparalas con las que predice la teoría vectorial de manera robusta, ya que ambas están calculadas usando la misma técnica.

Implementamos este modelo como una serie de rutinas en lenguaje C, que conforman un programa que se ejecuta en paralelo utilizando OpenMP ¹, para aprovechar las capacidades de los modernos procesadores multicore. La salida se guarda como imágenes en formato FITS (Flexible Image Transport System, Pence et al. 2010). La elección de este formato se debe a la existencia de poderosas herramientas de procesamiento de imágenes en el dominio público, tales como IRAF (Image Reduction and Analysis Facility, Tody 1986), y a la existencia de una biblioteca en lenguaje C, que contiene rutinas para la lectura y escritura de imágenes en formato FITS. Las pruebas preliminares mostraron que nuestro código, luego de ser optimizado, emplea aproximadamente 15 minutos para calcular las cuatro imágenes de 512×512 píxeles de un objeto puntual (TED, TVD sin polarizar y TVD con analizadores en x' e y'), utilizando 10^5 rayos, tiempo razonable para nuestros propósitos.

¹www.openmp.org

3.2 Transmisión del sistema óptico

Cada rayo que incide sobre el sistema está determinado por su dirección \hat{r} , y su campo eléctrico en el objeto \vec{E}_0 . Este rayo y el eje óptico del sistema definen un plano. El rayo emergente está contenido en dicho plano y queda determinado por su dirección \hat{r}' , y el campo eléctrico en la imagen geométrica del objeto \vec{E}' . Como el sistema cumple la condición de los senos de Abbe, las direcciones del rayo incidente y del emergente están relacionadas

$$\sin \alpha = M \sin \alpha', \quad (3.10)$$

donde α y α' son los ángulos que forman con el eje óptico los rayos incidente y emergente, respectivamente.

La diferencia de fase entre todos los rayos que llegan a la imagen geométrica es nula, por lo que para determinar el campo eléctrico en la imagen es necesario analizar solamente el comportamiento de su amplitud vectorial. Tomando como referencia una esfera con origen en el objeto y radio r_p (figura 3.1), descomponemos el vector campo eléctrico que produce el objeto, $\vec{E} = \vec{E}_0(\hat{r})/r_p$, sobre esta esfera en dos direcciones ortogonales: una contenida en el plano determinado por los versores \hat{r} y \hat{r}' , y otra perpendicular a dicho plano. Este plano queda determinado por su versor normal \hat{v}_\perp , dado por

$$\hat{v}_\perp = \frac{\hat{r} \times \hat{r}'}{|\hat{r} \times \hat{r}'|}. \quad (3.11)$$

La componente del campo perpendicular al plano, \vec{E}_\perp , la obtenemos proyectando el campo eléctrico en la dirección perpendicular,

$$\vec{E}_\perp = (\vec{E} \cdot \hat{v}_\perp) \hat{v}_\perp. \quad (3.12)$$

La componente paralela, \vec{E}_\parallel , la obtenemos restando al campo eléctrico total la componente perpendicular que calculamos antes

$$\vec{E}_\parallel = \vec{E} - \vec{E}_\perp. \quad (3.13)$$

El efecto del sistema óptico en cada una de estas componentes es distinto. La componente normal no cambia al atravesar el sistema, por lo que el campo a la salida es $\vec{E}'_\perp = \vec{E}_\perp$. Esto se puede comprobar analizando para una superficie las condiciones de contorno del campo.

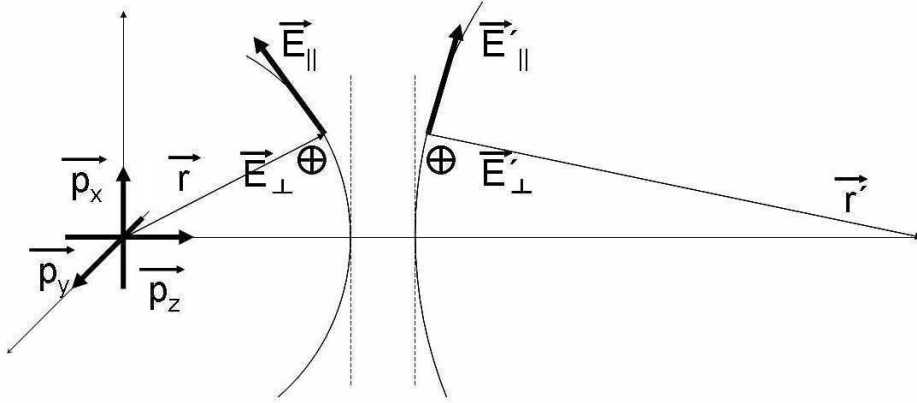


Figura 3.1: Corte axial de un sistema óptico con simetría de revolución. Las circunferencias son las proyecciones de sendas esferas centradas en el objeto y en la imagen, y con radios iguales a las distancias entre ellos y las pupilas de entrada del sistema, respectivamente. La direcciones de los rayos incidente y emergente son \vec{r} y \vec{r}' , respectivamente. Los dipolos \vec{p}_x , \vec{p}_y y \vec{p}_z corresponden al modelado de un objeto puntual autoluminoso.

Esto ocurre porque, dada la simetría de revolución del sistema, esta componente es siempre paralela a las superficies ópticas.

Si suponemos que se conserva la energía en el sistema, lo que es equivalente a considerar que no hay pérdidas por reflexión o absorción, la componente paralela \vec{E}_{\parallel} conserva su módulo, aunque su orientación cambia. Para determinar la componente \vec{E}'_{\parallel} a la salida del sistema, calculamos el versor paralelo, que debe ser normal tanto a la superficie como al rayo emergente,

$$\hat{v}_{\parallel} = \frac{\hat{v}_{\perp} \times \hat{r}'}{|\hat{v}_{\perp} \times \hat{r}'|}. \quad (3.14)$$

De esta forma obtenemos la componente paralela del campo como

$$\vec{E}'_{\parallel} = |E_{\parallel}| \hat{v}_{\parallel}. \quad (3.15)$$

Conocido el campo eléctrico a la salida del sistema óptico para un determinado rayo incidente, calculamos el campo eléctrico en la imagen geométrica como

$$\vec{E}'_0(\hat{r}') = (\vec{E}'_{\parallel} + \vec{E}'_{\perp})/r_{ps}. \quad (3.16)$$

3.3 PSF para objetos autoluminosos

Como mencionamos en el capítulo 2, la PSF es la respuesta del sistema a un estímulo elemental. En este caso la PSF será la imagen de un objeto puntual autoluminoso visto a través del microscopio. Para calcular el patrón de difracción que produce este objeto, desarrollamos un modelo sencillo para describir un objeto puntual autoluminoso. En este modelo supondremos que el objeto no está polarizado, por lo que su momento dipolar eléctrico fluctúa en el tiempo sin dar preferencia a ninguna dirección en el espacio. A efectos de calcular el promedio temporal de la intensidad en la imagen de este objeto, se lo puede considerar como la superposición de tres dipolos ortogonales no correlacionados entre sí. El campo eléctrico que produce cada uno de estos dipolos puntuales en la dirección del rayo \hat{r} , está determinado por (ver por ejemplo Jackson 1975)

$$\vec{E} = \frac{k^2(\hat{r} \times \vec{p}) \times \hat{r}}{r} e^{jkr}, \quad (3.17)$$

donde \vec{p} es el momento dipolar eléctrico.

Considerando los tres dipolos ortogonales \vec{p}_x , \vec{p}_y y \vec{p}_z , orientados como muestra la figura 3.1, cada uno de ellos producirá un campo eléctrico en la pupila de entrada del sistema \vec{E}^x , \vec{E}^y y \vec{E}^z , respectivamente. Para determinar si la iluminación de la pupila que produce este objeto es correcta, analizamos la distribución de intensidad que produce cada uno de los dipolos en la pupila de entrada del sistema. Las líneas de campo correspondientes a un dipolo orientado según el eje x , definido anteriormente, tienen mayor concentración en la región horizontal central de la pupila, por lo que esperamos que la distribución de intensidad en la pupila para este dipolo sea máxima en la región central. Lo mismo ocurre para el dipolo orientado según el eje y , debido a que ambos son simétricos, pero en este caso la distribución de líneas de campo, y por lo tanto también la distribución de intensidades, estará rotada en un ángulo de 90° respecto a la esperada para el dipolo orientado según el eje x . En el caso del dipolo orientado según el eje z , la densidad de líneas de campo presenta simetría de rotación al rededor del eje del sistema, la mínima concentración se produce en el centro de la pupila y aumenta hacia los bordes. Las imágenes de la distribución de luz en la pupila, presentadas en la figura 3.2, se corresponden con lo que esperamos por la distribución de líneas de campo eléctrico para cada uno de los dipolos.

Para simular la PSF de este tipo de objeto, procedemos como indicamos en la secciones 3.1 y 3.2. Como los dipolos no son correlacionados, la intensidad en el plano imagen será la suma

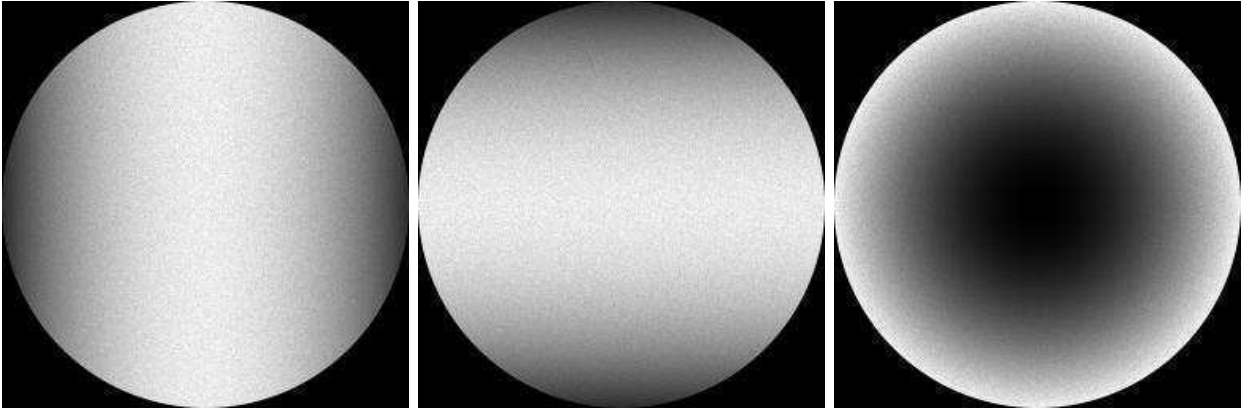


Figura 3.2: Intensidad del campo eléctrico en la pupila del sistema. A la izquierda la correspondiente al campo eléctrico producido por el dipolo orientado según el eje x , \vec{E}_x , en el centro la correspondiente al campo eléctrico producido por el dipolo orientado según el eje y , \vec{E}_y , y a derecha la correspondiente al campo eléctrico producido por el dipolo orientado según el eje z , \vec{E}_z . En los tres casos las distribuciones de intensidad se corresponden con las esperadas para cada uno de los dipolos.

de la intensidad producida por cada dipolo. Los parámetros de los que depende la simulación son el número de rayos N , el aumento M y la apertura numérica NA del sistema óptico, y el tamaño del píxel en la imagen simulada. Tanto el aumento como el tamaño del píxel representan un cambio de escalas en la imagen, por lo que en principio el estudio de la dependencia de las simulaciones con estos parámetros no es relevante.

Para obtener buenas imágenes simuladas, es necesario determinar el número rayos N que debemos utilizar para conseguir una dada precisión en las imágenes, en un tiempo de integración aceptable. Una forma de determinar el N óptimo para nuestros estudios es simulando X veces la imagen de un punto utilizando siempre el mismo número de rayos, obteniendo de esta forma X imágenes I_i que solo se diferencian entre sí en las fluctuaciones estadísticas. Determinando para cada píxel el promedio y la desviación estandar σ de las intensidades, obtenemos error relativo. En la figura 3.3 presentamos las imágenes promedio para $N = 10^2$, 10^3 , 10^4 y 10^5 , junto con las imágenes de los correspondientes errores relativos. En esta figura la intensidad de las imágenes promedio está dada en escala logarítmica para apreciar mejor los detalles. Es notable que a medida que aumenta N mejora la calidad de la imagen, como se puede ver comparando la imagen promedio que obtuvimos para $N = 10^2$ y la que obtuvimos para $N = 10^5$. La cantidad de anillos de difracción que se observan es mayor, así como también lo es su definición. También apreciamos que a medida que

aumenta N el error relativo en las imágenes disminuye en la región central y para los anillos claros, permaneciendo siempre alto en los anillos oscuros debido a que en ellos los valores de intensidad son muy bajos y las fluctuaciones grandes.

Otra forma de analizar estos resultados es a través de los perfiles de intensidad de las imágenes y sus errores relativos, que presentamos en la figura 3.4. En esta observamos que para $N = 10^5$ hay presentes un mayor número de anillos de difracción que en los demás casos estudiados. También es notorio que la intensidad de los anillos oscuros cae más fuertemente cuanto mayor es N . En el caso del error relativo, también encontramos que al aumentar N el error relativo disminuye, siendo para $N = 10^5$ menor al 10% en los 3 primeros anillos, salvo en las regiones correspondientes a anillos oscuros. En este caso los errores relativos crecen hasta valores cercanos al 100%, debido a que la intensidad en los anillos oscuros toma valores muy pequeños.

Si bien mejoraría el resultado de las simulaciones seguir aumentando el número de rayos, desde el punto de vista práctico esto no es posible, ya que si bien la precisión de las imágenes es mayor, también es mayor el tiempo de cálculo. El tiempo que insume la simulación de una imagen con $N = 10^5$ es de aproximadamente 15 minutos, y el tiempo computacional aumenta linealmente con el número de puntos de integración, por lo que simular una imagen con $N = 10^6$ llevaría el tiempo computacional a aproximadamente 2.5 horas por imagen, haciendo poco práctica la simulación. Por otra parte, mostramos anteriormente que con $N = 10^5$ conseguimos una precisión adecuada para nuestros objetivos.

Una vez seleccionado el número de rayos, estudiamos la dependencia de la PSF con la apertura numérica del sistema óptico, simulando la imagen de un objeto puntual autoluminoso sobre el eje óptico, considerando distintas aperturas numéricas. Para poder analizar los resultados, simulamos también, en las mismas condiciones, la imagen que se obtendría considerando válida la TED. En todos los casos simulamos las imágenes con $N = 10^5$ rayos y aumento $M = 100$. Las aperturas numéricas que utilizamos en esta simulación están en el rango que va desde 40° hasta 85° , en pasos de 5° . En la figura 3.5 presentamos ejemplos de las imágenes simuladas. En la parte superior de la figura mostramos los resultados que obtuvimos para la teoría escalar, luz natural (TVD sin considerar polarizadores), eje de absorción del polarizador a lo largo del eje x y eje de absorción del polarizador a lo largo del eje y , con apertura numérica $NA = 40^\circ$. En la parte inferior mostramos el mismo juego de imágenes pero con apertura numérica $NA = 80^\circ$. Cualitativamente observamos que el radio de la figura de difracción para TVD es en ambos casos mayor al predicho por la TED.

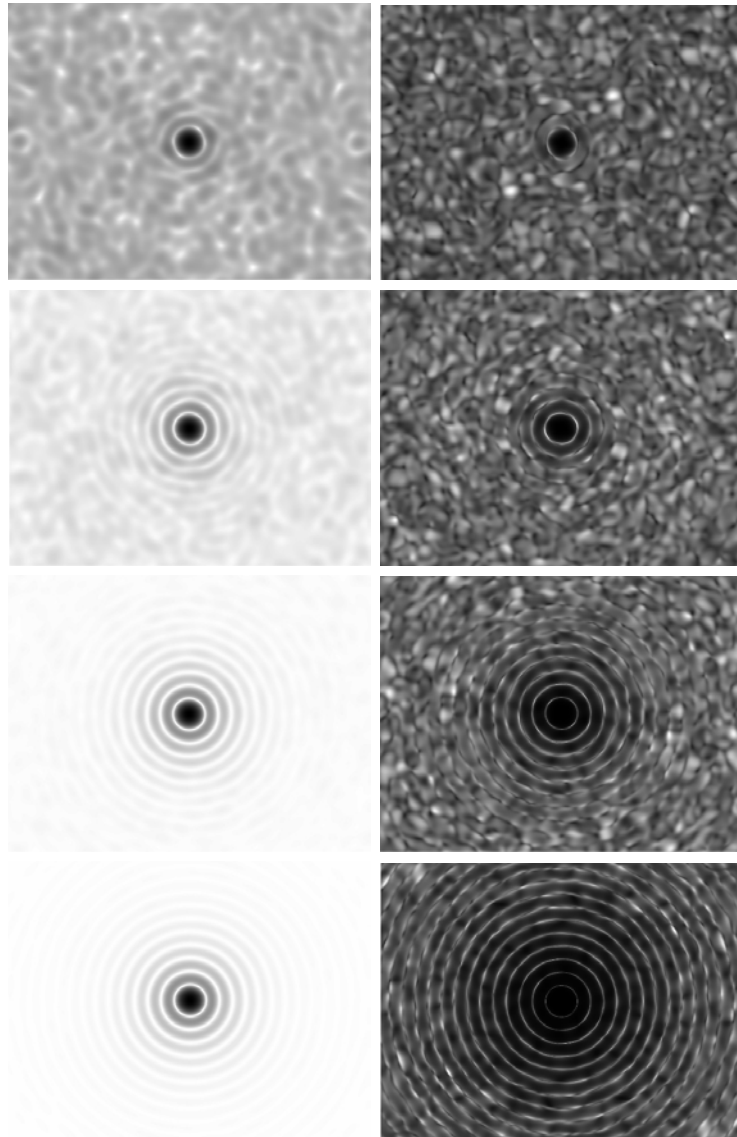


Figura 3.3: Calidad de la imagen simulada en función del número de rayos N . En la columna izquierda mostramos las imágenes promedio para 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 rayos, de arriba hacia abajo. La intensidad de las imágenes está en escala logarítmica, con la escala de grises invertida, para apreciar mejor los detalles. En la columna derecha presentamos los correspondientes errores. Notar que a medida que aumenta el número de rayos utilizados en la integración aumenta la calidad de la imagen, pudiendo observarse más cantidad de anillos de difracción. Por otra parte, también se observa que a medida que aumenta el número de rayos el error en las imágenes disminuye en la región central y para los anillos claros, permaneciendo siempre alto en los anillos oscuros debido a que en ellos los valores de intensidad son muy bajos y las fluctuaciones grandes.

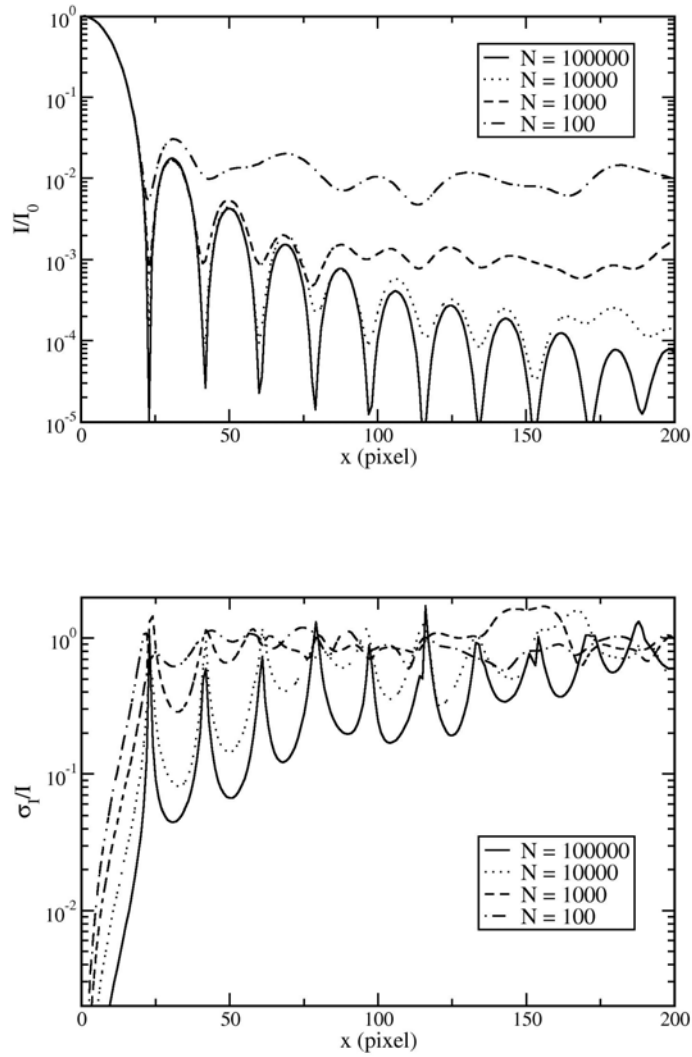


Figura 3.4: Comparación de la calidad de las imágenes. En el panel superior se puede notar en el perfil de intensidad normalizado de las imágenes que al aumentar N se observa un mayor número de anillos de difracción y que disminuye la intensidad de los anillos oscuros. En el panel inferior se puede ver que el error relativo disminuye al aumentar N , salvo en las regiones correspondientes a anillos oscuros.

Esto lo observamos en todas las aperturas numéricas que estudiamos. También es notable que el contraste para las imágenes simuladas de TVD es inferior al predicho por la TED. Las imágenes simuladas con polarizadores presentan un ensanchamiento en la dirección ortogonal al eje de absorción del polarizador, siendo el ensanchamiento mayor al aumentar la apertura numérica del sistema. Este efecto también se observa en imágenes experimentales, como muestra la figura 1.1. En las imágenes simuladas se observa también que el contraste en la dirección de ensanchamiento de la figura central del patrón de difracción es mayor que para la luz natural, lo que indica que el uso de polarizadores aumentaría el contraste en una dirección de la imagen. Esto sugiere que la combinación de imágenes tomadas con polarizadores cuyos ejes de absorción estén orientados en direcciones ortogonales, podría mejorar el contraste de la imagen.

Para cuantificar lo que observamos en las imágenes simuladas, tomamos los perfiles de intensidad para cada una en dos direcciones ortogonales, una paralela al eje de absorción del polarizador y otra perpendicular a ésta. En cada caso medimos el ancho a mitad de altura ϕ de la figura de difracción. En la figura 3.6 mostramos el cociente ϕ/ϕ_E en función de la apertura numérica, donde ϕ_E es el ancho a mitad de altura para TED. En esta figura podemos ver que ϕ para TVD sin polarizar es siempre mayor al ϕ correspondiente a TED para la misma apertura numérica, siendo aproximadamente entre un 6% y un 20% mayor, relación que aumenta con la apertura numérica. Cuando colocamos un analizador a la salida del sistema, el radio de la figura de difracción en la dirección del eje de absorción del polarizador es similar al radio encontrado para TVD, variando entre un 7% y 25%. En la dirección ortogonal al eje de absorción del polarizador el radio de la figura de difracción crece con la apertura numérica llegando a ser un 40% mayor al que encontramos para TED. Esto permite cuantificar el ensanchamiento que observamos previamente en las imágenes.

3.4 Resolución

Estudiamos la resolución del sistema para objetos autoluminosos analizando la imagen de dos puntos separados por una distancia d , y buscando la distancia mínima para la cual los objetos se pueden considerar resueltos. Para esto simulamos once imágenes de dos objetos puntuales con distintas separaciones, comprendidas entre 15 y 25 píxeles, con pasos de 1 pixel. En todos los casos utilizamos una apertura numérica $NA = 60^\circ$ y aumento $M = 100$. En estas condiciones la PSF tiene un radio de aproximadamente 20 píxeles para TED. Mediante una

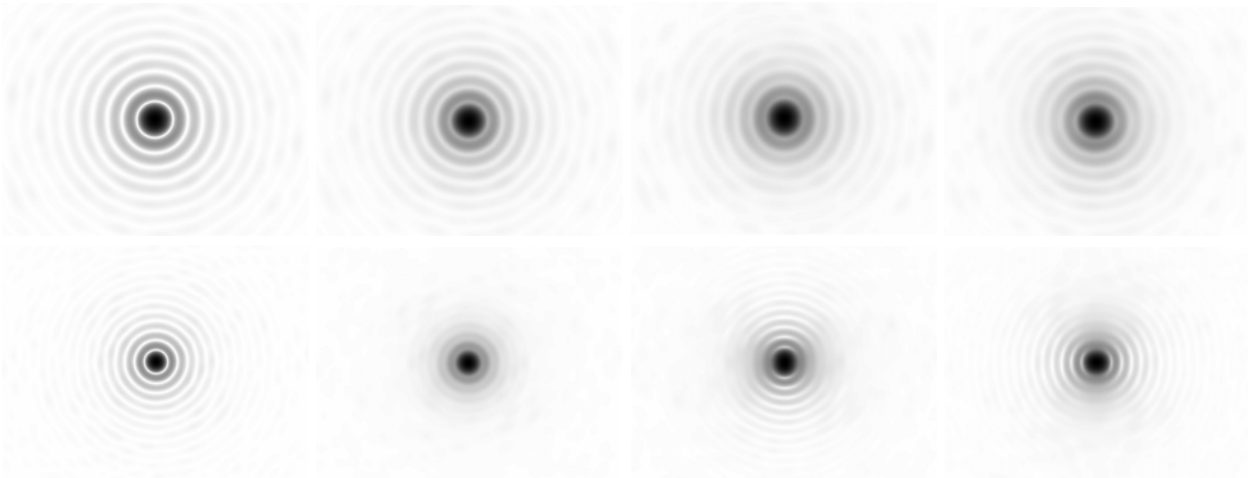


Figura 3.5: PSF simulada. En la parte superior mostramos imágenes simuladas correspondientes a teoría escalar, luz natural, absorción en el eje x y absorción en el eje y , con apertura numérica $NA = 40^\circ$. En la parte inferior mostramos las correspondientes imágenes para una apertura numérica $NA = 80^\circ$. Simulamos todas las imágenes con $N = 10^5$ puntos de integración y aumento $M = 100$. La intensidad de las imágenes está en escala logarítmica, y la escalade grises está invertida. El tamaño de la región central del patrón de difracción para luz natural es en ambos casos mayor al predicho por la TED. También es notable que el contraste para las imágenes de TVD es inferior al predicho por la TED. Las imágenes simuladas con polarizadores presentan un ensanchamiento en la dirección ortogonal al eje de absorción del polarizador, siendo el ensanchamiento mayor al aumentar la NA del sistema. En estas imágenes se observa también que el contraste en la dirección de ensanchamiento de la figura central del patrón de difracción es mayor que para la luz natural.

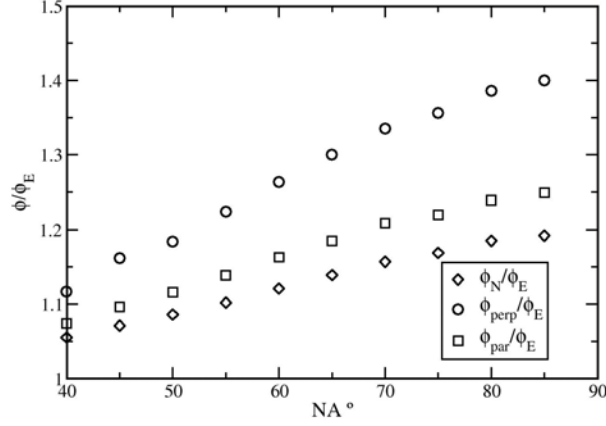


Figura 3.6: Cociente ϕ/ϕ_E , en función de la apertura numérica NA . En todos los casos analizados, este cociente es mayor a la unidad, y aumenta con la apertura numérica.

exploración visual de las imágenes, notamos que a partir de una separación de 18 píxeles la imagen para TED presenta una cintura, lo que indicaría que los dos objetos están justamente resueltos, mientras que para esta misma separación en el caso de TVD la imagen no presenta cintura, lo que indica que los objetos no están resueltos, como podemos apreciar en los paneles de la parte izquierda de la figura 3.7. A partir de una separación de 22 píxeles la imagen para TVD presenta una cintura, lo que indicaría que los dos objetos están justamente resueltos, mientras que para esta misma separación en el caso de TED la imagen presenta una cintura mayor, mostrando que los objetos están claramente resueltos, como podemos apreciar en los paneles de la parte derecha de la figura 3.7.

Podemos cuantificar estas observaciones tomando los perfiles de intensidad en la dirección de separación de los objetos para las distintas separaciones que analizamos anteriormente. En la figura 3.8 presentamos los perfiles de intensidad para TED y TVD. En ellos podemos observar que para algunas separaciones entre puntos el máximo central de la curva se encuentra bien definido, al aumentar un poco la separación se comienza a aplanar, y para separaciones mayores observamos la aparición de una depresión en la región central, cuya profundidad aumenta con la separación entre los objetos. Este comportamiento es similar tanto al considerar TED como TVD, la diferencia principal radica en la separación a partir de la cual observamos la existencia de la depresión central en el perfil. Si consideramos que

los puntos están resueltos para la mínima separación para la que se observa un mínimo en la región central, en el caso de TED esto ocurre para una separación de 18 píxeles, mientras que para TVD ocurre para 19 píxeles de separación.

Una forma de hacer más precisa la determinación del límite de resolución es considerando el cociente

$$r = \frac{I_{Max}}{I_{min}}, \quad (3.18)$$

donde I_{Max} es la intensidad promedio de los máximos e I_{min} la intensidad medida en la depresión central, de estar presente. Si los puntos no están resueltos, no se observará depresión central, y por lo tanto I_{min} no estará definida, así como tampoco lo estará r . Si está justo por encima del límite de resolución I_{min} será muy parecida a I_{Max} , y de esta forma r tenderá a uno. Al aumentar la separación entre los objetos el valor de I_{min} disminuirá respecto al de I_{Max} , haciendo que r aumente. Para los perfiles que calculamos anteriormente, buscamos los máximos y mínimos, y calculamos r . En la figura 3.9 mostramos los valores de r , en función de la separación entre los objetos. En ambos casos, TED y TVD, ajustamos a los datos una parábola con el método de cuadrados mínimos, lo que mostramos junto con sus bandas de error correspondientes a 3σ . En el caso de TED encontramos que r alcanza el valor uno para una separación de 17.3 píxeles, mientras que para TVD esto ocurre a los 18.3 píxeles. Esto indica que según este criterio la resolución que da la teoría escalar estaría sobreestimada en un 5.8%, para esta apertura numérica. Si consideramos el criterio de Rayleigh generalizado, en el que el límite de resolución se alcanza cuando en la distribución de intensidad conjunta el mínimo central alcanza el 81% del valor de la intensidad de los máximos laterales, para TED el límite de resolución se alcanza para 21.5 píxeles de separación, mientras que para TVD esto ocurre para 23.5 píxeles de separación, haciendo que en este caso la resolución que predice la teoría escalar esté sobreestimada en un 9.3%.

Repetimos este análisis considerando ahora un analizador a la salida del sistema óptico, estudiando dos configuraciones: con el eje de absorción del polarizador paralelo a la dirección de separación de los objetos, y en una dirección ortogonal a esta. Para esto simulamos nuevamente imágenes de dos objetos puntuales con distintas separaciones, comprendida entre 15 y 25 píxeles, con pasos de 1 píxel. Explorando visualmente las imágenes, notamos que la resolución de las imágenes con polarizador vertical u horizontal es diferente. En la figura 3.10 vemos las imágenes simuladas de dos puntos, colocando un analizador a la salida del sistema óptico. En esta figura podemos observar que para una separación de 18 píxeles, colocando

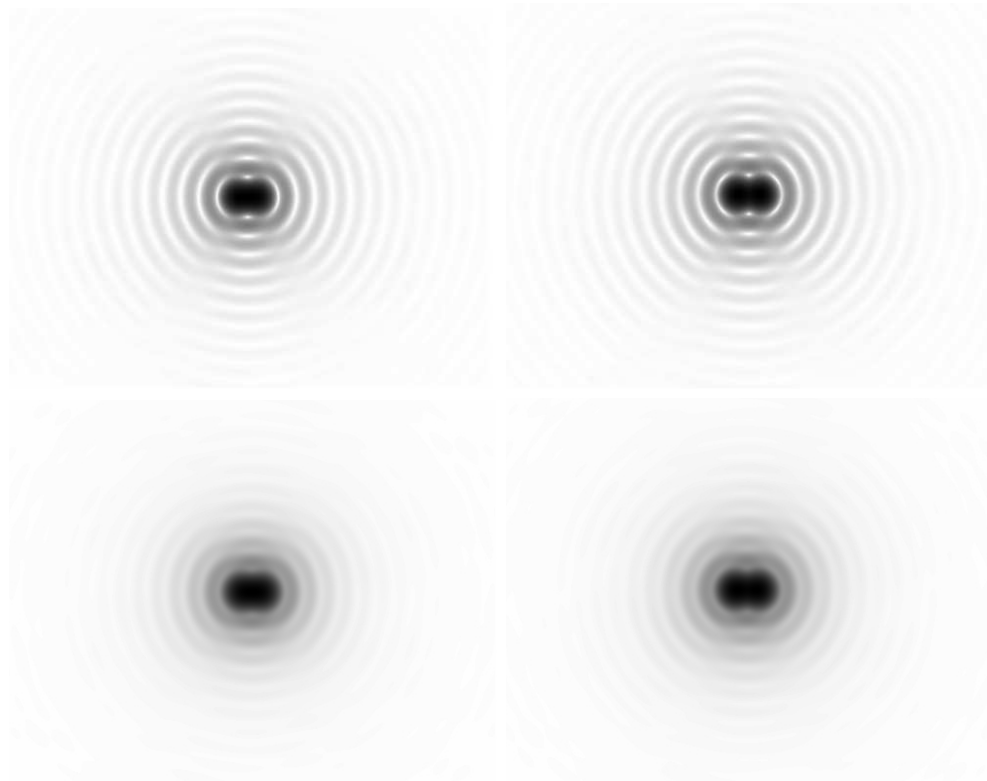


Figura 3.7: Imágenes de dos puntos cerca del límite de resolución. El panel superior muestra los resultados para TED, y el inferior para TVD. Los dos objetos puntuales en las imágenes de la izquierda están separados 18 píxeles en la imagen, y en las de la derecha la separación entre los puntos es de 22 píxeles. Claramente la resolución es mejor en el caso de TED.

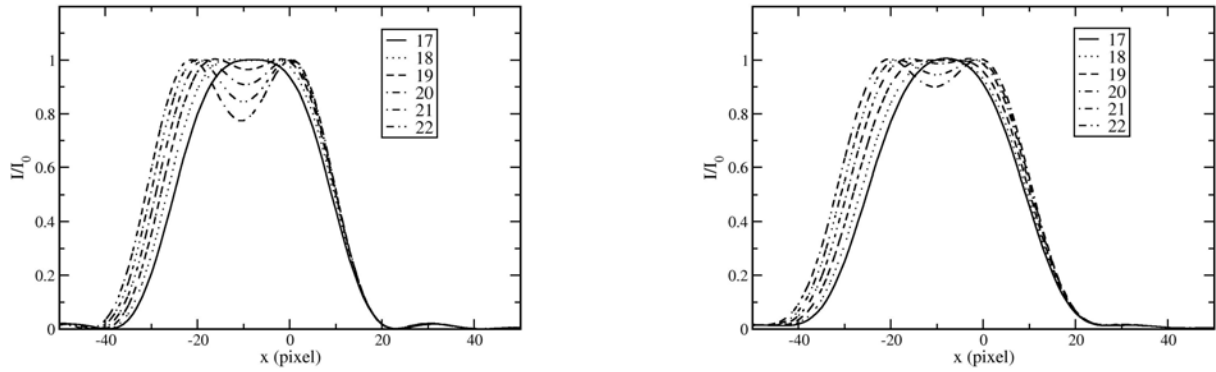


Figura 3.8: Perfiles de intensidad para imágenes de dos puntos con distintas separaciones entre ellos, considerando TED (panel izquierdo) y TVD (panel derecho). En el recuadro indicamos la separación entre los puntos en píxeles.

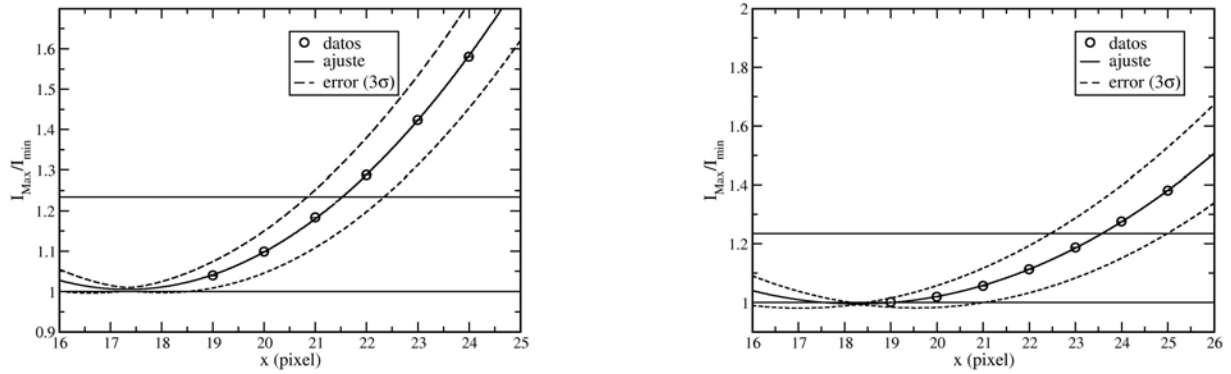


Figura 3.9: Cociente r entre la intensidad en los máximos y la intensidad en el mínimo en función de la separación entre los objetos (círculos). La línea llena representa la parábola que mejor ajusta los datos y las líneas punteadas las bandas de error correspondientes a 3σ . Las líneas horizontales corresponden a $r = 1$ y a $r = 1.235$ (criterio de Rayleigh). El panel izquierdo corresponde a TED y el derecho a TVD.

el analizador con su eje de absorción horizontal (en la misma dirección de la separación de los objetos), la imagen presenta una cintura. Esto indica que los puntos estarían justamente resueltos. Al colocar el analizador con su eje de absorción vertical (en la dirección ortogonal a la de separación de los objetos) los objetos no están resueltos. Esto está de acuerdo con lo que observamos en la sección 3.3 para la PSF: la imagen se ensancha en la dirección ortogonal al eje de absorción del polarizador, y de esta forma en esta dirección se degrada la resolución del sistema. Para una separación entre los puntos de 24 píxeles, colocando un analizador con su eje de absorción horizontal, los puntos están bien resueltos, mientras que colocando el analizador con su eje de absorción vertical los objetos están justamente resueltos.

Para analizar la resolución de acuerdo con el criterio de la presencia de una depresión en la región central de la curva de intensidad, tomamos los perfiles de intensidad de las imágenes que simulamos, que se encuentran en la figura 3.11. En esta vemos que los perfiles de intensidad de las imágenes simuladas con un analizador cuyo eje de absorción está orientado en la dirección de la separación de los objetos, la depresión central comienza a observarse a los 20 píxeles de separación, y aumenta con la separación de los puntos. Al orientar el eje de absorción en la dirección ortogonal, la depresión central comienza a observarse a los 23 píxeles de separación, y la profundidad de la depresión también aumenta con la separación de los puntos. A partir de lo que muestra esta figura, podemos afirmar que la resolución en la dirección ortogonal al eje de absorción del analizador se degrada respecto a la resolución en la dirección del eje. Finalmente, en la figura 3.12 mostramos r en función de la separación de los puntos para el caso del eje de absorción del polarizador horizontal. Ajustamos los datos a una parábola y graficamos las bandas de error correspondientes a 3σ . En este caso encontramos que la resolución con el criterio del mínimo es de 18.2 píxeles, apenas menor que en el caso de luz natural. Para el caso del criterio de Rayleigh generalizado es de 24 píxeles, mayor que para luz natural.

3.5 Sistema de iluminación

Como mencionamos en el capítulo 1, se pueden obtener mejoras en la resolución de las imágenes del microscopio mediante técnicas que involucran modificaciones del arreglo experimental con el que se toman las imágenes. Estas técnicas son ampliamente conocidas y utilizadas en el laboratorio. Una de ellas es el uso de condensadores anulares como sistemas de iluminación del objeto. En esta sección investigamos las propiedades de la PSF para un

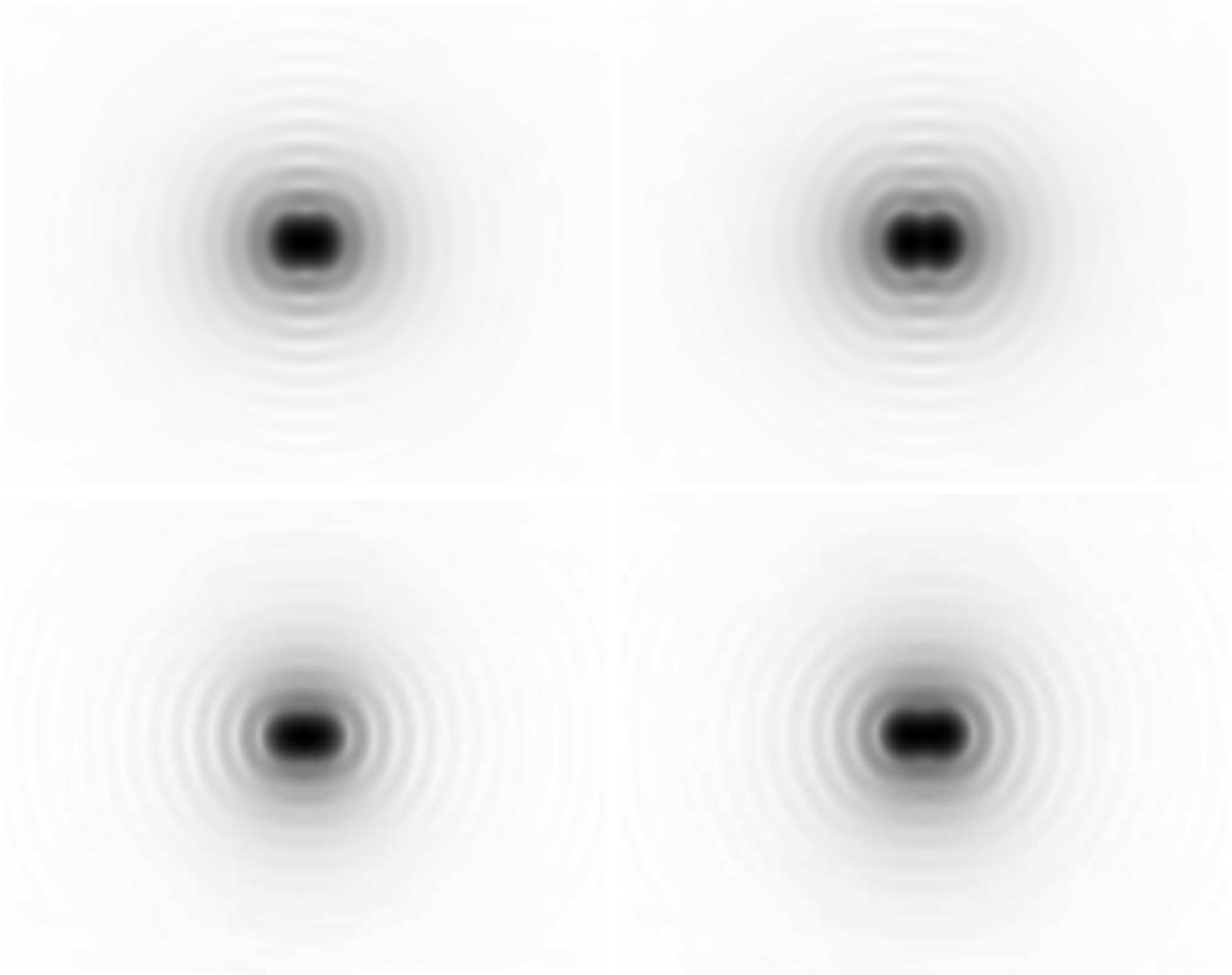


Figura 3.10: En el panel superior izquierdo presentamos la imagen de dos puntos separados 18 píxeles, colocando un analizador a la salida del sistema óptico con su eje de absorción horizontal. A esta distancia se observa una cintura en las imágenes, indicando que los puntos estarían justamente resueltos. En el panel inferior izquierdo, ídem anterior, pero con el eje de absorción del analizador vertical. En este caso los objetos no están resueltos. En el panel superior derecho presentamos la imagen de dos puntos, separados 24 píxeles, colocando un analizador con su eje de absorción horizontal. A esta distancia los puntos parecen estar bien resueltos. En el panel inferior derecho, ídem anterior, pero con el eje de absorción del analizador vertical. En este caso los objetos esán justamente resueltos.

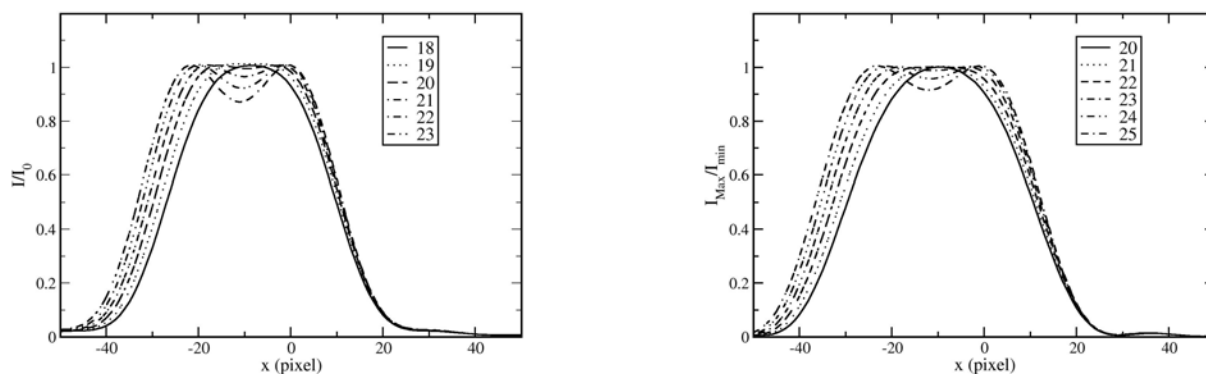


Figura 3.11: Perfiles de intensidad de dos puntos cerca del límite de resolución con analizador. El panel izquierdo muestra los resultados para el eje de absorción del analizador orientado en la dirección de separación de los objetos, mientras que el derecho hace lo propio para el eje de absorción del analizador orientado en dirección perpendicular. Claramente la resolución es mejor al colocar el eje de absorción del analizador orientado en la dirección de separación de los objetos.

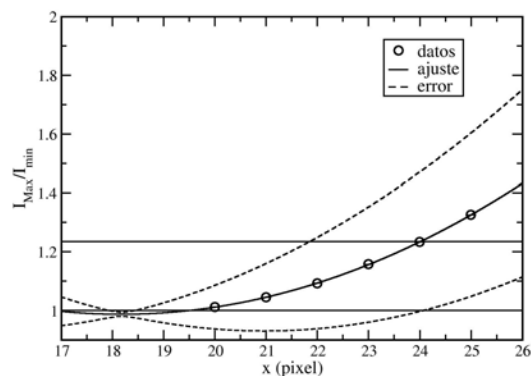


Figura 3.12: Cociente de la intensidad en los máximos con la intensidad en el mínimo presente entre ambos máximos para las separaciones consideradas en la figura anterior, para TVD con analizador con el eje en la dirección de separación de los objetos. Ajustamos los datos a una parábola (línea llena) y graficamos las bandas de error correspondientes a 3σ . Las líneas horizontales corresponden a $\frac{I_{Max}}{I_{min}} = 1$ y a $\frac{I_{Max}}{I_{min}} = 1.235$ (criterio de Rayleigh).

sistema que utiliza un condensador anular, para lo que introducimos algunas modificaciones en el código, descrito en las secciones anteriores, que nos permiten incluir el sistema de iluminación (Ciocci et. al 2011 a).

Modelamos un condensador anular como un arreglo unidimensional de fuentes puntuales incoherentes. Suponemos, sin pérdida de generalidad, que el campo eléctrico producido por el condensador tiene módulo uno y que se puede descomponer en dos direcciones ortogonales: una tangente al anillo del condensador y otra normal al rayo que va desde el condensador hasta el objeto. Para calcular la PSF de este nuevo sistema, calculamos la imagen que produce considerando como objeto una pantalla plana opaca con un orificio puntual. En este caso seleccionamos aleatoriamente un punto del condensador, y calculamos la contribución al campo eléctrico producido por dicho punto en el objeto, aplicando las mismas reglas para el cambio de las componentes normal y paralela que describimos en la sección 3.2. Una vez calculada esta contribución, procedemos a calcular el campo eléctrico en el plano imagen utilizando nuestro modelo numérico de TVD, como hicimos en el caso de objetos autoluminosos, y a partir de este la intensidad. Repetimos el procedimiento para un número significativo de puntos del condensador sumando las intensidades resultantes.

En la figura 3.15 presentamos las PSFs correspondientes a objetos autoluminosos (izquierda) e iluminados (derecha). El tamaño del disco de Airy disminuye en el caso de condensador anular, que también presenta un mejor contraste. Esto mismo se puede observar en el perfil de intensidades para ambos casos, que se encuentra en la figura 3.16. En esta se nota que para objetos iluminados con un condensador anular el máximo central es más angosto y el primer mínimo de intensidad es más profundo en el caso de objetos iluminados.

También analizamos la resolución considerando este sistema de iluminación. Para esto calculamos la imagen de dos perforaciones puntuales en una pantalla plana opaca. En las figuras 3.15 y 3.16 presentamos dos objetos puntuales justamente resueltos en ambos casos. Contrariamente a lo que se podría esperar por el análisis de la PSF, encontramos que la resolución no mejora con el condensador anular (empeora en $\sim 23\%$). Creemos que esta disminución en la resolución se debe a la interferencia constructiva entre la luz proveniente de ambos orificios dada la correlación existente entre ellos.

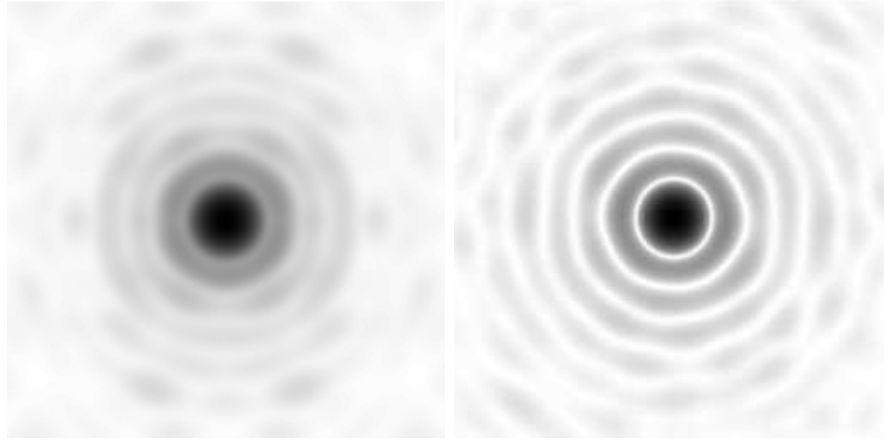


Figura 3.13: PSF para objetos autoluminosos e iluminados con un condensador anular. La imagen de la izquierda corresponde a la PSF simulada para un objeto autoluminoso calculada considerando TVD. La imagen de la derecha corresponde a la PSF simulada con un condensador anular. Los parámetros de la simulación son los mismos en ambos casos ($M = 100$ y $NA = 0.866$). La imagen está representada en escala logarítmica y con la escala de grises invertida.

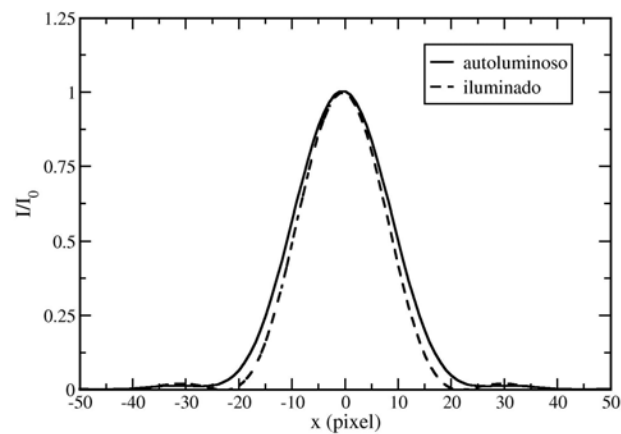


Figura 3.14: Perfiles de intensidad para objetos autoluminosos e iluminados con condensador anular.

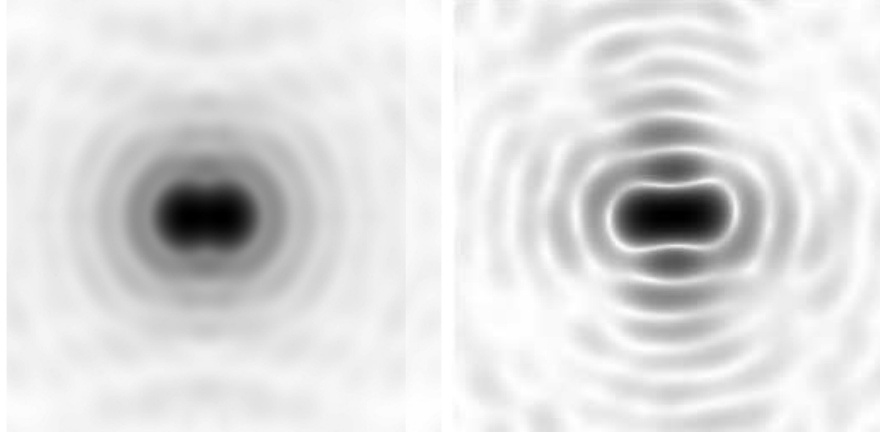


Figura 3.15: Imágenes simuladas de dos objetos puntuales autoluminosos justamente resueltos (izquierda, con 21 píxeles de separación entre los objetos), y de dos perforaciones puntuales en una pantalla plana opaca iluminada con un condensador anular (derecha, con 26 píxeles de separación entre los objetos). Los parámetros de la simulación son los mismos en ambos casos ($M = 100$ y $NA = 0.866$). La imagen está representada en escal logarítmica y con la escala de grises invertida.

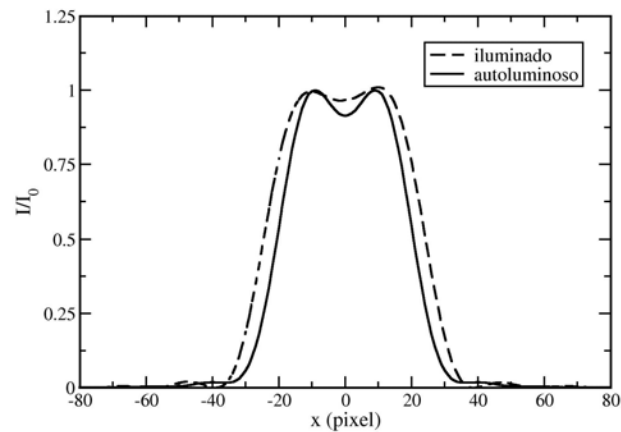


Figura 3.16: Perfiles de intensidad para las imágenes de los objetos justamente resueltos.

Capítulo 4

La Función Transferencia

La teoría de formación de imágenes muestra que la imagen que produce un sistema óptico lineal e isoplanático, como el que estamos estudiando, es la convolución del objeto con la PSF. En el espacio de las frecuencias esta relación adquiere una forma más simple dada por el producto de la transformada de Fourier del objeto con la TF, que es la transformada de Fourier de la PSF, y caracteriza completamente al sistema en el espacio de las frecuencias. En este capítulo analizamos la TF para objetos autoluminosos.

4.1 transformada de Fourier discreta de una imagen

Para estudiar la TF, escribimos un código numérico en lenguaje C, que calcula la transformada de Fourier discreta bidimensional de una imagen. Dado que el número de imágenes a analizar es grande, necesitamos que el cálculo de la transformada de Fourier de cada una de ellas sea rápido. Por esto utilizamos en nuestro código las rutinas de transformada rápida de Fourier FFTW (Fastest Fourier Transform in the West, Frigo & Johnson 2005). FFTW es una colección de rutinas rápidas, escritas en C, para el cálculo de la transformada de Fourier discreta, que admiten una longitud arbitraria en los datos de entrada, lo que es necesario porque las imágenes se obtienen en distintos tamaños. Por otra parte, las rutinas del FFTW emplean algoritmos cuyos tiempos de ejecución son del orden $O(n \log n)$, donde n es el número de píxeles en la imagen, para cualquier n (incluyendo n primos). Esta es una característica muy buena de estas rutinas, ya que usualmente los algoritmos de la transformada rápida de Fourier emplean tiempos del orden $O(n^2)$, salvo en el caso de $n = 2^k$ en el que son del orden $O(n \log n)$. Las rutinas de FFTW incluyen también rutinas de cálculo en paralelo para su uso en sistemas con memoria compartida. Básicamente FFTW adapta el

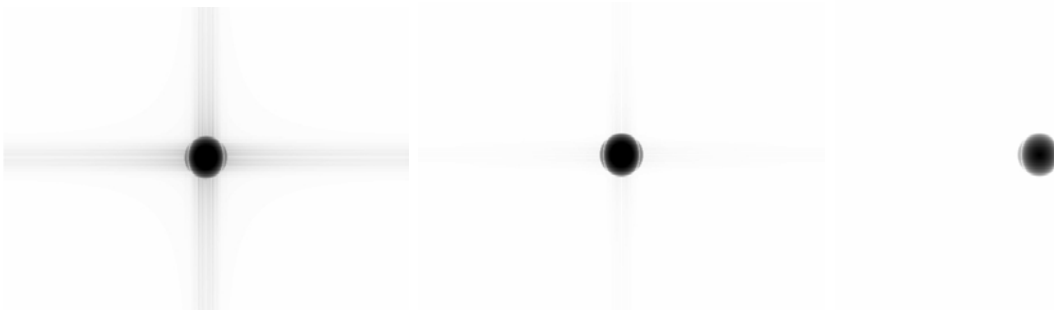


Figura 4.1: MTF del sistema óptico. Promedio de 10 MTF para imágenes simuladas con $N = 10^3$, 10^4 y 10^5 rayos respectivamente, usando TVD con un analizador con su eje de absorción vertical. La intensidad de las imágenes está en escala logarítmica y la escala de grises está invertida para apreciar mejor los detalles. Podemos observar que para un bajo número de rayos aparece en la MTF un patrón con forma de cruz, centrado en la frecuencia nula, que disminuye su intensidad hasta hacerse casi despreciable para $N = 10^5$ rayos.

algoritmo de cálculo de la Transformada de Fourier Discreta al hardware específico sobre el que se está trabajando para maximizar su desempeño, en vez de utilizar un algoritmo fijo. En primer lugar FFTW busca la manera óptima de realizar la transformada de Fourier Discreta, produciendo un “plan”, que es una estructura de datos que contiene la información necesaria para llevar a cabo la operación óptima, y luego este plan puede ser utilizado todas las veces que sea necesario. Utilizando las rutinas de FFTW, escribimos un código que calcula la TF de cualquier imagen, y escribe su módulo (MTF) y fase (PTF) en sendas imágenes FITS, lo que permite su visualización y análisis.

En la sección 3.3 estudiamos la precisión de las imágenes en función del número de rayos N utilizado en la simulación. Nuestro análisis mostró que $N = 10^5$ permitía alcanzar una precisión razonable (del orden del 1% en la región de interés) en un tiempo de cálculo aceptable. Analizamos también el efecto del número de rayos en la MTF. Para esto tomamos las imágenes de la PSF, que simulamos anteriormente y calculamos sus transformadas de Fourier.

En la figura 4.1 mostramos el promedio de 10 MTF para imágenes simuladas con $N = 10^3$, 10^4 y 10^5 rayos respectivamente. Podemos observar que para un bajo número de rayos aparece en la MTF un patrón con forma de cruz, centrado en la frecuencia nula, cuya intensidad disminuye al aumentar N hasta hacerse casi despreciable para 10^5 rayos. En la figura 4.2 presentamos un corte de la MTF para TVD con analizador vertical, y su error para imágenes simuladas con $N = 10^3$, 10^4 y 10^5 rayos. Podemos observar que los valores de

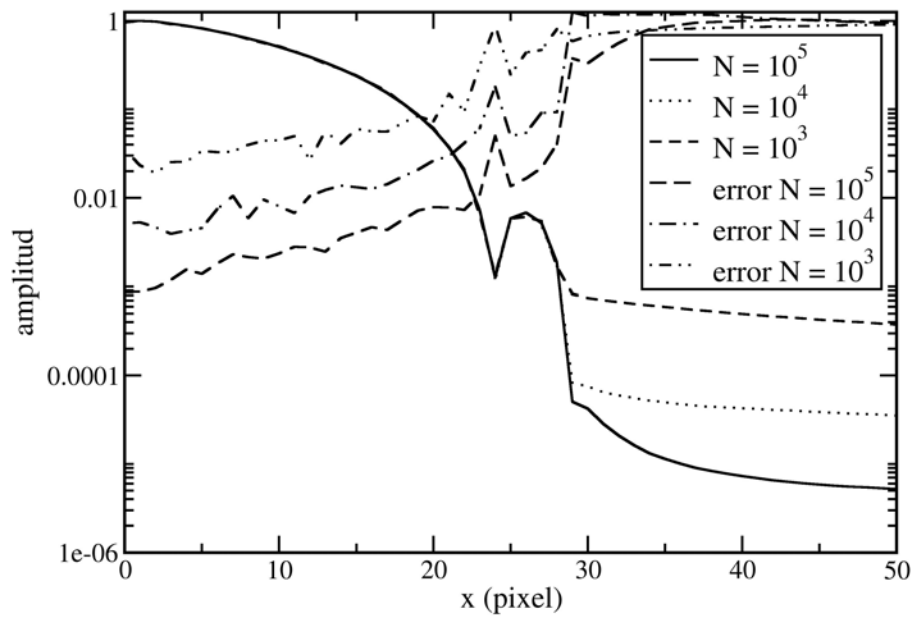


Figura 4.2: Error en la MTF. Corte de la MTF para TVD con un analizador con su eje vertical, y su error para imágenes simuladas con $N = 10^3$, 10^4 y 10^5 rayos. Podemos observar que los valores de la MTF no presentan diferencias significativas en los tres casos en el intervalo comprendido entre la frecuencia nula y la correspondiente al píxel 28, a partir de esta frecuencia cuanto mayor es el número de rayos, la MTF se acerca más a cero. El error en la MTF crece desde la frecuencia nula hasta la aparición del mínimo, punto en el que presenta un abrupto crecimiento, debido a que la MTF toma valores muy pequeños. Al aumentar el valor de la MTF, el error disminuye hasta que la MTF alcanza su primer máximo secundario, y luego continúa aumentando el error. Este comportamiento se repite en todos los casos analizados, diferenciándose en que al aumentar el número de rayos el error, a igual frecuencia, es menor.

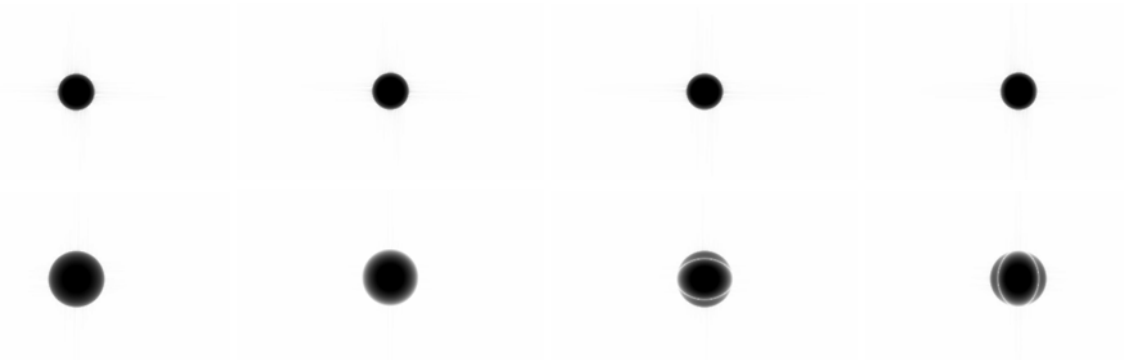


Figura 4.3: MTF en función de la apertura numérica. MTF simulada para un sistema con $NA = 40^\circ$ (panel superior) y otro con $NA = 80^\circ$ (panel inferior). Las imágenes, de izquierda a derecha, corresponden a TED, TVD sin polarizar, TVD con un analizador cuyo eje de absorción se encuentra en dirección horizontal y TVD con un analizador cuyo eje de absorción se encuentra en dirección vertical, respectivamente. La intensidad de las imágenes está en escala logarítmica, y la escala de grises está invertida. Se puede ver que la MTF a bajas aperturas numéricas presenta simetría de rotación, y su tamaño es esencialmente el mismo en todos los casos. A grandes aperturas numéricas, el tamaño de la MTF aumenta respecto al caso anterior, y la MTF con analizador pierde la simetría de rotación, presentando lóbulos en la dirección ortogonal al eje de absorción del analizador.

la MTF en los tres casos no presentan diferencias significativas en el intervalo comprendido entre la frecuencia nula y la correspondiente al píxel 28, que corresponde a la frecuencia de corte. A partir de esta frecuencia cuanto mayor es el número de rayos, la MTF se acerca más a cero. Esto corresponde al patrón con forma de cruz observado, cuya amplitud relativa al máximo de la MTF disminuye con N . La dependencia observada de este patrón con el número de rayos sugiere que este es un efecto numérico, y que el valor de $M = 10^5$ utilizado permite despreciar sus efectos sobre nuestros resultados. El error en la MTF crece desde la frecuencia nula hasta la aparición del mínimo, punto en el que presenta un abrupto crecimiento, debido a que la MTF toma valores muy pequeños. Al aumentar el valor de la MTF, el error disminuye, también abruptamente, hasta que la MTF alcanza su primer máximo secundario. Luego continúa aumentando el error. Este comportamiento se repite en todos los casos analizados, diferenciándose en que al aumentar el número de rayos el error, a igual frecuencia, es menor.

4.2 Dependencia con la apertura numérica

Estudiamos la dependencia de la MTF con la apertura numérica, utilizando para ello las imágenes de las PSF que simulamos en la sección 3.3, cuyas aperturas numéricas están comprendidas entre 40° y 85° , con pasos de 5° . En todos los casos analizamos los resultados para TED y TVD, considerando para esta última los casos de luz sin polarizar y con analizador. En la figura 4.3 mostramos ejemplos de dichas MTF. En la parte superior vemos la MTF para un sistema con baja apertura numérica ($NA = 40^\circ$) mientras que en la inferior se encuentra la MTF para un sistema con gran apertura numérica ($NA = 80^\circ$). Todas las imágenes de las MTF están reordenadas para que la frecuencia nula se encuentre en el centro de la imagen, la intensidad está en escala logarítmica, y la escala de grises está invertida para poder observar mejor los detalles de las imágenes. Todas las imágenes que presentaremos en este capítulo están construídas de la misma manera. Cualitativamente podemos ver que a baja apertura numérica la MTF presenta simetría de rotación respecto a la frecuencia nula, y que su tamaño es esencialmente el mismo para TED y TVD. Para grandes aperturas numéricas, la MTF conserva la simetría de rotación en los casos de TED y TVD sin polarizar. El tamaño de la MTF para bajas aperturas numéricas es menor al que presenta para altas aperturas numéricas. Esto es consistente con los resultados que obtuvimos en la sección 3.3, en la que estudiamos la dependencia de la PSF con la apertura numérica. En dicha sección encontramos que el radio de la figura de difracción disminuye al aumentar la apertura numérica, tanto para TED como para TVD. Al hacer la transformada de Fourier, el menor tamaño de la PSF se traduce en una mayor frecuencia de corte y por lo tanto en un mayor tamaño de la TF. Al introducir un analizador, observamos que para grandes aperturas numéricas se rompe la simetría de rotación, dando lugar a una simetría axial respecto del eje de absorción del analizador. Aparecen también lóbulos en la dirección perpendicular a dicho eje, lo que es nuevamente consistente con lo que observamos en el estudio de la PSF.

Para cuantificar estos efectos, calculamos los perfiles de la MTF a lo largo de cortes horizontales, y los presentamos en la figura 4.4, en la que comparamos perfiles de la MTF para distintas aperturas numéricas, considerando TED, TVD sin polarizar, y TVD con analizadores con sus ejes de absorción orientados en dirección paralela y ortogonal a la dirección en la que tomamos el perfil. En todos los casos observamos que hay un aumento de la frecuencia de corte a medida que aumenta la apertura numérica del sistema. Esto es

consistente con lo que observamos en la sección 3.3, en la que encontramos que el tamaño de la PSF disminuye al aumentar la apertura numérica. En el espacio de las frecuencias esto implica un aumento en el tamaño de la MTF. Finalmente, al analizar el perfil de la MTF en el caso de TVD con un analizador con su eje de absorción orientado en la dirección ortogonal a la del perfil, notamos la aparición de máximos laterales secundarios, que se corresponden con los lóbulos presentes en las imágenes de la figura 4.3. Comenzamos a observar estos máximos a partir de una apertura numérica $NA = 55^\circ$, y observamos que la altura del máximo secundario aumenta con la apertura numérica. El primer mínimo se produce en todos los casos aproximadamente a la misma frecuencia.

Comparamos las características de la MTF en los distintos casos analizados mediante perfiles horizontales, que podemos ver en la figura 4.5. En ésta presentamos el perfil horizontal de la MTF para TED, TVD sin polarizar y TVD con analizador en un sistema con gran apertura numérica ($NA = 85^\circ$). Como esperabamos, la MTF para TED posee mayor amplitud para cada frecuencia que la MTF para TVD. El perfil horizontal de la MTF para TVD sin polarización y el perfil para TVD con un analizador cuyo eje de absorción se encuentra en la misma dirección en la que tomamos el perfil, son muy similares, presentando el perfil de TVD sin polarizar valores ligeramente superiores (el perfil de TVD con analizador tiene mayor pendiente). El perfil horizontal de la MTF correspondiente a TVD con un analizador con su eje de absorción orientado en forma ortogonal a la dirección en la que tomamos el perfil, tiene una pendiente más pronunciada que en los otros casos y presenta máximos secundarios. El valor que alcanza la MTF en dichos máximos es superior al encontrado para TVD sin polarizar y para TVD con un analizador con el eje de absorción orientado en la misma dirección en la que tomamos el perfil. Esto constituye una característica interesante de la MTF, que podría permitirnos extraer más información sobre el objeto utilizando los analizadores y posiblemente combinando la información de ambas polarizaciones. Es por ello que investigaremos con más detalle los máximos secundarios en la próxima sección.

4.3 La MTF cerca de la frecuencia de corte

En la sección 4.2 comparamos las características de la MTF para TED y para TVD. Una de las características notables que encontramos es que la MTF correspondiente a TVD con un analizador presenta máximos secundarios en la dirección perpendicular al eje de absorción del analizador, cuya intensidad es, dentro de cierto rango, mayor a la dada por TVD sin

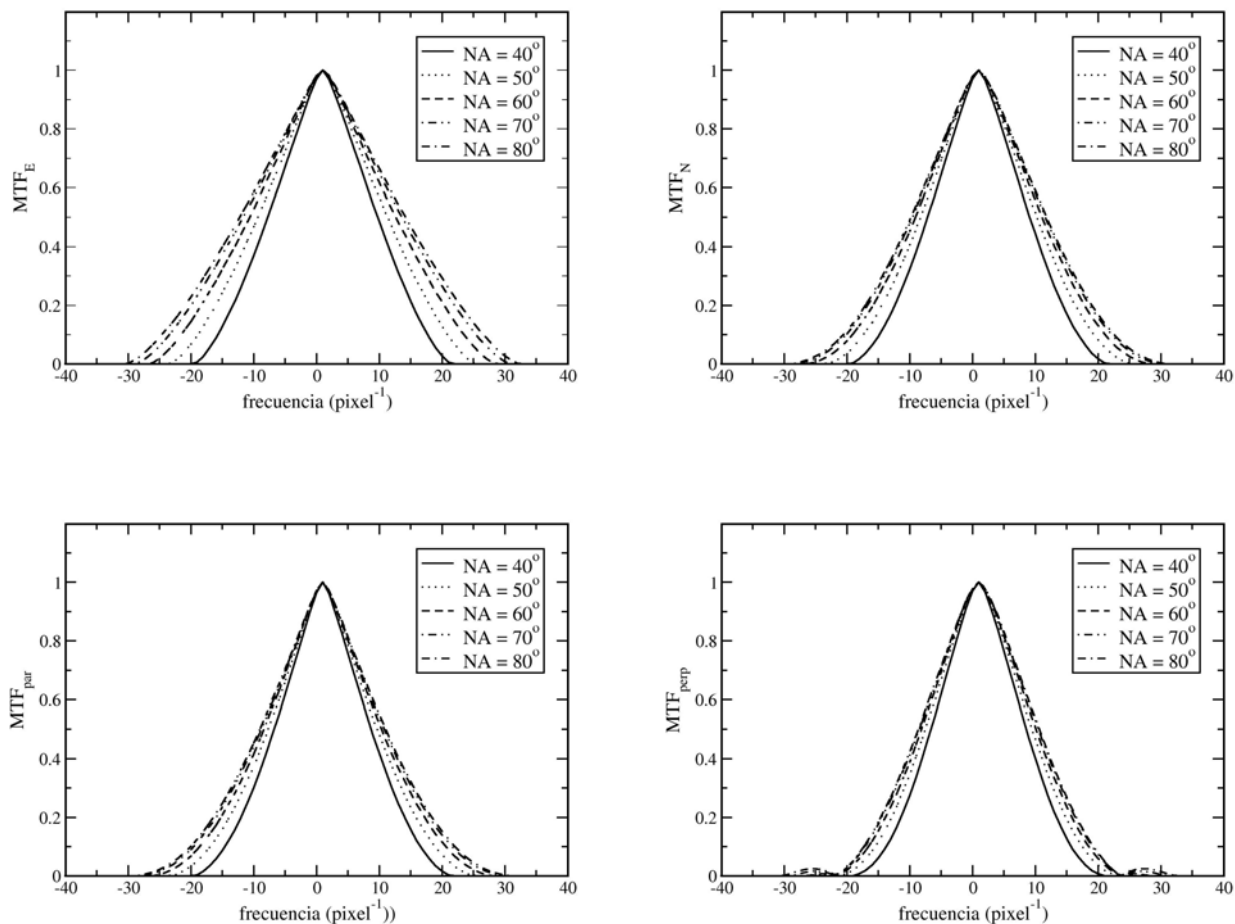


Figura 4.4: Perfiles horizontales de la MTF, normalizados a la unidad en la frecuencia nula, correspondientes a TED (panel superior izquierdo), TVD sin polarizar (panel superior derecho), TVD con analizador cuyo eje de absorción es paralelo a la dirección del perfil (panel inferior izquierdo) y TVD con analizador cuyo eje de absorción es perpendicular a la dirección del perfil (panel inferior derecho). En el último caso notamos además la aparición de máximos laterales secundarios a altas frecuencias.

analizador. En la figura 4.6 mostramos un detalle de la comparación de la MTF para TED, TVD sin polarizar y con polarizadores, en el caso $NA = 85^\circ$, ampliando el rango de observación, de forma tal de poder analizar el máximo secundario. En esta figura se puede apreciar claramente que para frecuencias cercanas a la frecuencia de corte la MTF correspondiente a TVD con un analizador, vista en la dirección perpendicular al eje de absorción del analizador, tiene mayor amplitud que la MTF para TVD con luz no polarizada o TVD con un analizador, pero vista en la dirección del eje de absorción del analizador. Esto indica que el contraste en esta región es mayor en las cercanías del máximo secundario. Como las imágenes de las PSF correspondientes a TVD con polarizadores pierden la simetría de rotación (ver figura 3.5), la TF no será real, y por lo tanto no sólo es necesario estudiar su módulo (función transferencia de modulación), sino también su fase (PTF). Para analizar la fase de la TF, hicimos un mapa de la fase de la TF de TVD con polarizadores respecto a TVD sin polarizar, que mostramos en la figura 4.7 para TVD con polarizadores con eje de absorción horizontal y vertical. Para calcular dichos mapas calculamos el argumento de la TF en ambos casos de TVD con polarización y lo restamos al argumento de la TF correspondiente a TVD sin polarizar. En la figura las regiones en blanco tienen diferencia de fase nula, en tanto que las regiones en negro tienen diferencia de fase π . En esta figura podemos apreciar que las regiones con diferencia de fase π se corresponden con los lóbulos de la MTF, lo que muestra que en esta región la TF toma valores negativos, lo que causa una inversión en el contraste de la imagen. De esta forma, si queremos aprovechar las características de la TF con polarizadores en las regiones cercanas a la frecuencia de corte, tendremos que tener en cuenta la inversión de contraste que se produce en los lóbulos.

4.4 Efectos de borde

Como se puede suponer que un objetivo de microscopio constituye un sistema lineal isoplanático, la imagen de un punto autoluminoso no cambia para objetos fuera del eje. En el espacio de frecuencias no es claro que la MTF no presente variaciones para dichos objetos, por lo que es necesario estudiar la dependencia de la MTF con la posición del objeto en la imagen.

Simulando la imagen de un objeto puntual autoluminoso desplazado del eje del sistema y calculando su transformada de Fourier, estudiamos la dependencia de la MTF con la separación del eje. Simulamos varias imágenes con distintos apartamientos del eje del sistema,

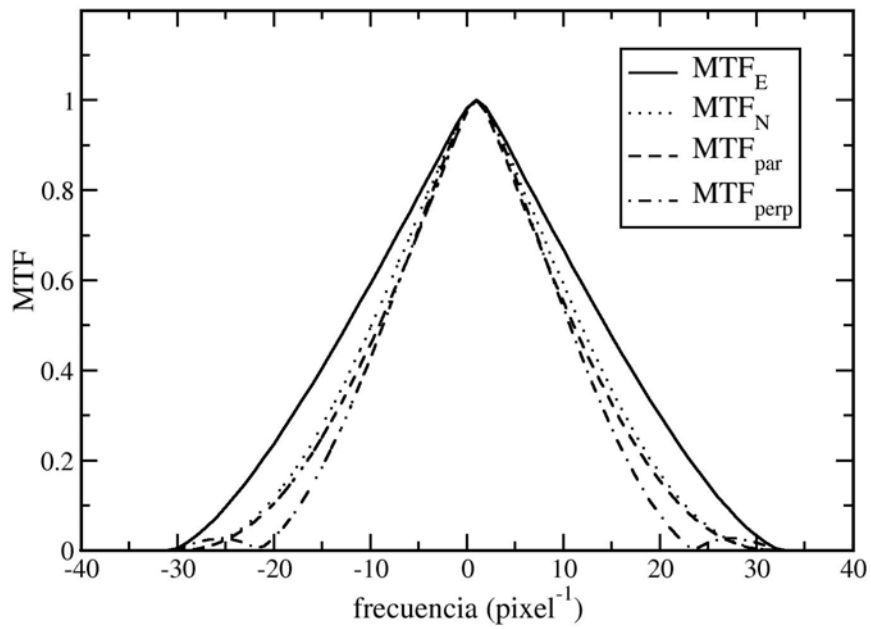


Figura 4.5: Comparación de perfiles de la MTF para TED (MTF_E), TVD sin polarizar (MTF_N), con analizador con su eje de absorción paralelo al la dirección del perfil (MTF_{par}) y con analizador con su eje de absorción perpendicular al la dirección del perfil (MTF_{perp}), en el caso $NA = 85^\circ$.

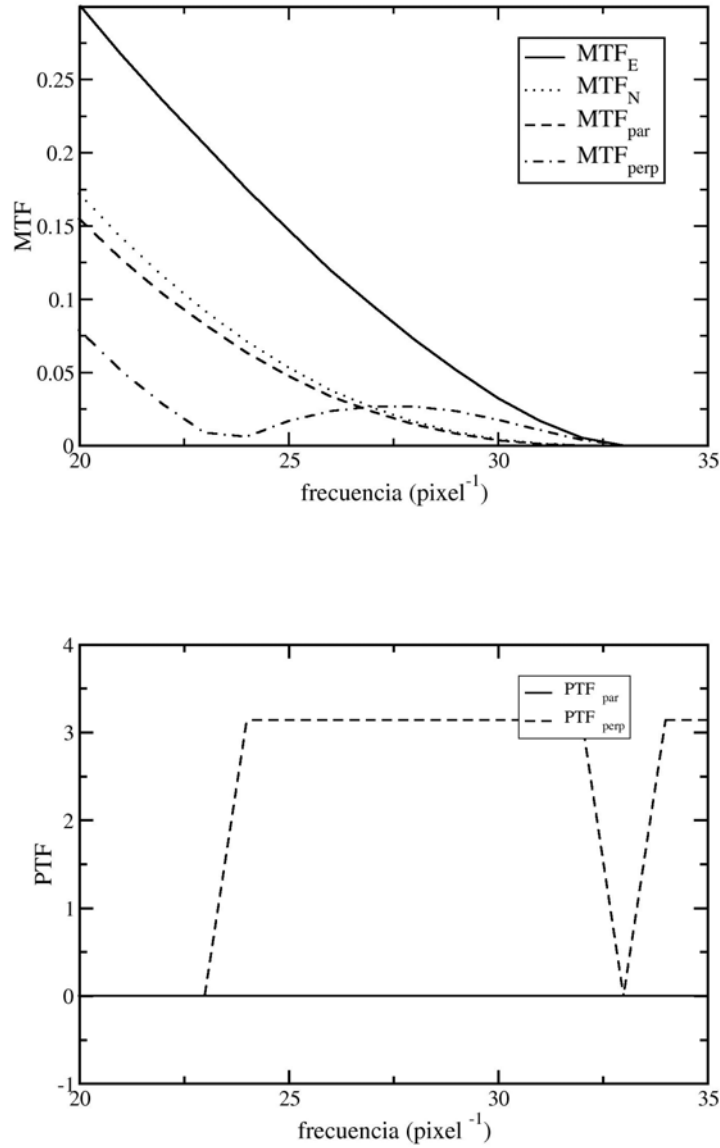


Figura 4.6: En el panel superior, la comparación de perfiles de la MTF para TED (MTF_E), TVD sin polarizar (MTF_N), con analizador con su eje de absorción paralelo a la dirección del perfil (MTF_{par}) y con analizador con su eje de absorción perpendicular a la dirección del perfil (MTF_{perp}), en el caso $NA = 85^\circ$. En este caso ampliamos la región cercana a la frecuencia de corte. En el panel inferior, la función transferencia de fase PTF para TVD con analizador en ambas orientaciones (PTF_{par} y PTF_{perp}).

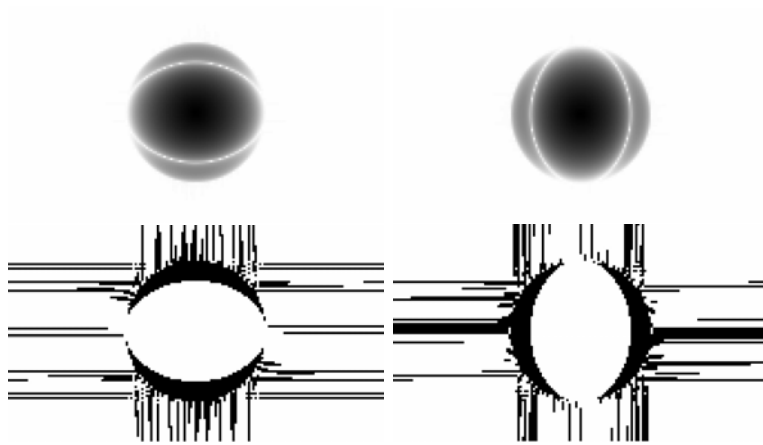


Figura 4.7: MTF (paneles superiores) y PTF (paneles inferiores) correspondientes a TVD con polarizadores con eje de absorción horizontal (paneles izquierdos) y vertical (paneles derechos), en el caso $NA = 85^\circ$. En los paneles inferiores, los correspondientes mapas de fase están tomados respecto a TVD sin polarizar. Las regiones en blanco tienen diferencia de fase nula, en tanto que las regiones en negro tienen diferencia de fase π . Notar que las regiones con fase π se corresponden con los lóbulos de la función transferencia de modulación, lo que muestra que en esta región se invierte el signo de la TF, y por lo tanto se produce una inversión en el contraste en la imagen.

tanto en la dirección vertical como en la horizontal. En la figura 4.8 mostramos algunos ejemplos de dichas MTF. En esta figura observamos la aparición de un patrón adicional en la MTF para objetos con fuertes desplazamientos respecto al centro. Dicho patrón se presenta con forma de banda, alargado en la dirección de desplazamiento del objeto, y su ancho es aproximadamente igual al de la MTF del objeto centrado. Su intensidad relativa al máximo central de la MTF aumenta con el desplazamiento del objeto respecto al centro. Al desplazar el objeto tanto en la dirección vertical como en la horizontal, se observa el patrón de bandas en ambas direcciones formando una cruz, como muestra la figura 4.9.

En la figura 4.10 mostramos la comparación entre la MTF de un objeto centrado y un objeto desplazado hasta el borde de la imagen, para el caso de un objeto autoluminoso, considerando TVD con un analizador cuyo eje de absorción se encuentra orientado horizontalmente. De la comparación visual entre ambas MTF podemos ver que al desplazar el objeto hasta el borde de la imagen los lóbulos de la MTF dejan de observarse, debido a que no lo permite la intensidad del patrón en forma de banda. Como podemos apreciar, si estamos interesados en la información presente en los lóbulos que presentan las imágenes con analizadores, estos patrones espúreos los enmascaran, por lo que es necesario desarrollar algún método que atenúe este efecto, lo que analizaremos en el capítulo siguiente.

Para finalizar, podemos explicar el origen de este patrón de la siguiente manera. Según la teoría de formación de imágenes en sistemas lineales isoplanáticos (ver sección 2.2) se puede obtener la imagen $i(x, y)$ de un objeto $o(\xi, \eta)$ mediante su convolución con la PSF $p(x - \xi, y - \eta)$ del sistema,

$$i(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} o(\xi, \eta) p(x - \xi, y - \eta) d\eta d\xi. \quad (4.1)$$

Al recortar la imagen con el borde del campo, la intensidad se puede escribir como

$$i(x, y) = \text{rect}\left(\frac{x}{L_x}, \frac{y}{L_y}\right) \iint_{-\infty}^{\infty} o(\xi, \eta) p(x - \xi, y - \eta) d\eta d\xi, \quad (4.2)$$

donde L_x y L_y corresponden a las dimensiones del recorte en las direcciones x e y , respectivamente. En el espacio de las frecuencias esta expresión adquiere la forma

$$I(f_x, f_y) = \iint_{-\infty}^{\infty} O(f_x, f_y) P(f_x, f_y) \text{sinc}(L_x f_x - \xi, L_y f_y - \eta) d\eta d\xi, \quad (4.3)$$

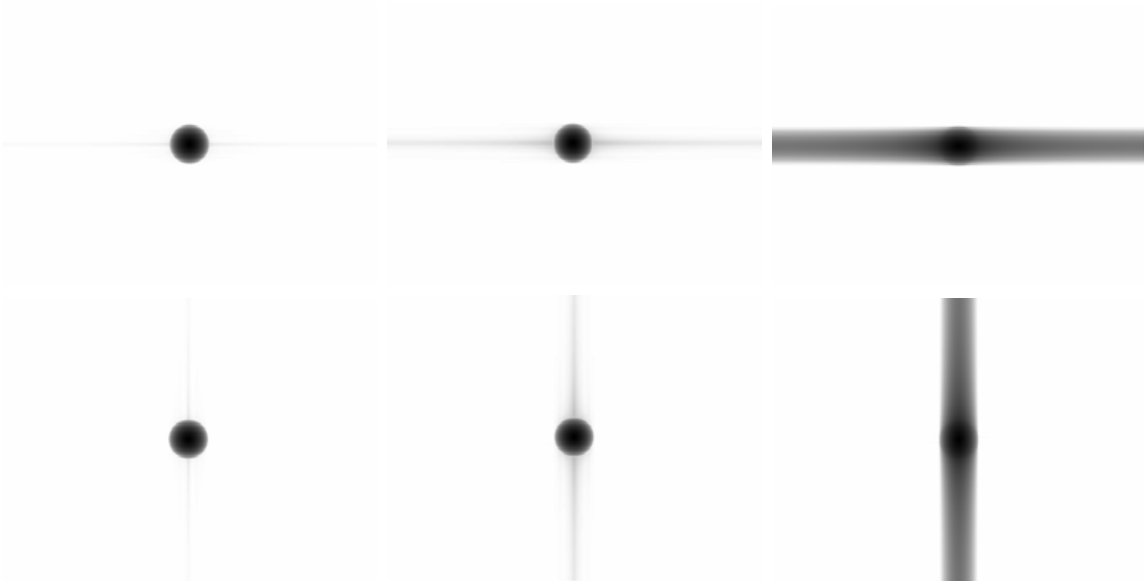


Figura 4.8: Función Transferencia de Modulación para distintas separaciones del objeto respecto del eje, para una imagen de 512×512 píxeles. En el panel superior: a la izquierda el objeto separado 192 píxeles en la dirección horizontal, en el centro el objeto separado 224 píxeles en la dirección horizontal, a la izquierda el objeto separado 256 píxeles en la dirección horizontal. En el panel inferior, idem pero para un objeto desplazado en la dirección vertical. Para los desplazamientos verticales y horizontales analizados podemos observar la aparición de un patrón con forma de banda, que no se observa en objetos centrados o con separaciones menores a 192 píxeles. También se puede apreciar en la figura que a mayores desplazamientos, mayor es la intensidad relativa del patrón.

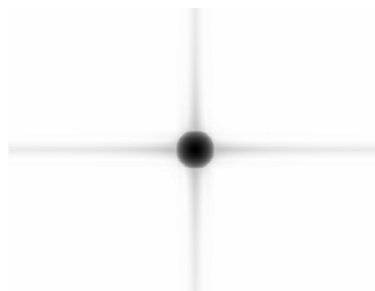


Figura 4.9: Función Transferencia de Modulación para un objeto separado respecto del eje 224 píxeles en la dirección horizontal y el mismo desplazamiento en la dirección vertical, para una imagen 512×512 píxeles. Se puede observar el patrón con forma de banda en ambas direcciones, formando un patrón con forma de cruz.



Figura 4.10: MTF para un objeto autoluminoso para TVD con un analizador cuyo eje de absorción se encuentra orientado horizontalmente. En el panel izquierdo, la MTF correspondiente a un objeto centrado. En esta figura se pueden observar los lóbulos de la MTF. En el panel derecho, la MTF correspondiente a un objeto desplazado hasta el borde de la imagen. En este caso la intensidad del patrón en forma de banda no permite observar los lóbulos.

siendo $I(f_x, f_y)$ la transformada de Fourier de la imagen, $O(f_x, f_y)$ la transformada de Fourier del objeto, $P(f_x, f_y)$ la transformada de transformada de Fourier de la PSF y $\text{sinc}(L_x f_x, L_y f_y)$ la transformada de Fourier de $\text{rect}(\frac{x}{L_x}, \frac{y}{L_y})$. De esta forma la transformada de Fourier de una imagen finita resulta ser la transformada de Fourier de la imagen infinita convolucionada con la transformada de Fourier de la función que describe los bordes. Esto muestra el origen del patrón en forma de banda, que está relacionado con el recorte del objeto en la imagen, al acercar el objeto al borde de la imagen.

Capítulo 5

Obtención de imágenes óptimas

En este capítulo aplicaremos el modelo numérico que describimos en el capítulo 3 a la optimización de imágenes obtenidas con el microscopio. Desarrollamos una técnica puramente numérica, a la que denominamos pseudodeconvolución, y estudiamos su aplicabilidad y desempeño para sistemas con y sin polarizadores. Para el desarrollo y validación de esta técnica trabajaremos, en este capítulo, con imágenes simuladas de uno o múltiples objetos puntuales.

5.1 Pseudodeconvolución

A partir de la teoría de formación de imágenes para sistemas lineales isoplanáticos sabemos que la imagen $i(x, y)$ de un objeto $o(x, y)$ se puede obtener mediante la convolución del objeto con la PSF del sistema $p(x, y)$,

$$i(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} o(\xi, \eta) p(x - \xi, y - \eta) d\eta d\xi. \quad (5.1)$$

En el espacio de las frecuencias esta operación equivale al producto de las transformadas de Fourier

$$I(f_x, f_y) = O(f_x, f_y) P(f_x, f_y), \quad (5.2)$$

donde $I(f_x, f_y)$ es la transformada de Fourier de la imagen, $O(f_x, f_y)$ es la transformada de Fourier del objeto y $P(f_x, f_y)$ la transformada de Fourier de la PSF, o función transferencia. De esta manera, invirtiendo la ecuación anterior, se podría obtener exactamente la transformada de Fourier del objeto

$$O(f_x, f_y) = \frac{I(f_x, f_y)}{P(f_x, f_y)}, \quad (5.3)$$

y a partir de ella el objeto, mediante la antitransformada de Fourier. A esta técnica para la reconstrucción del objeto se la conoce como deconvolución. Sin embargo en la práctica la deconvolución presenta problemas ya que no conocemos a priori la verdadera función transferencia del sistema. Si bien hay técnicas que permiten medir experimentalmente la PSF de un sistema, y con ella su función transferencia, estas requieren contar con un objeto puntual, lo que solo puede conseguirse en la práctica de manera aproximada. Además estas técnicas son muy sensibles a la presencia de ruido. Por otra parte aunque fuera conocida la TF, al tener un ancho de banda finito se pierden frecuencias presentes en el objeto, lo que hace imposible, incluso de manera teórica su reconstrucción. Una posible solución a este problema es simular la PSF del sistema y calcular a partir de ella la TF. Sin embargo las diferencias entre la PSF simulada y la verdadera pueden introducir también errores en el proceso de deconvolución. Estas diferencias pueden surgir de discrepancias entre el modelo que utilizamos para describir el sistema óptico y el sistema óptico real que produce las imágenes, o bien también debido a imprecisiones en la determinación de los parámetros necesarios para modelar el sistema. Aún pudiendo conocer la PSF del sistema de manera precisa, para frecuencias mayores a la de corte el denominador de la ecuación 5.3 se anula o toma valores muy pequeños causando problemas numéricos en el cálculo.

Una forma de sortear estos problemas es obtener el objeto convolucionado con una nueva PSF, que optimice la calidad de la imagen. A esta técnica la denominaremos *pseudodeconvolución*. A la función transferencia correspondiente a la nueva PSF, que mejoraría la resolución del sistema, la llamaremos *función transferencia meta* y la designaremos mediante $M(f_x, f_y)$. De esta forma, obtenemos la transformada de Fourier del objeto convolucionado con dicha función mediante

$$O(f_x, f_y) M(f_x, f_y) = \frac{I(f_x, f_y)}{P(f_x, f_y)} M(f_x, f_y) = I(f_x, f_y) \Psi(f_x, f_y), \quad (5.4)$$

donde $\Psi(f_x, f_y)$ está dado por

$$\Psi(f_x, f_y) = \frac{M(f_x, f_y)}{P(f_x, f_y)}. \quad (5.5)$$

Esta técnica permite resolver algunos de los problemas que plantea la deconvolución. Si bien la verdadera PSF del sistema sigue siendo desconocida así como también su correspondiente

función transferencia, la función meta $M(f_x, f_y)$ puede elegirse de forma que sea similar a la función transferencia del sistema, con lo cual $\Psi(f_x, f_y)$ resulta del orden de la unidad. De esta forma las correcciones que se introducen en la transformada de Fourier de la imagen son pequeñas, y por lo tanto el resultado final de la aplicación de esta técnica debería ser poco sensible a las desviaciones de la TF simulada respecto de la verdadera.

En las siguientes secciones analizamos la implementación de esta técnica usando el modelo numérico desarrollado en el capítulo 3 para simular $P(f_x, f_y)$ y $M(f_x, f_y)$, y de este modo determinar $\Psi(f_x, f_y)$. Nótese que al estar $P(f_x, f_y)$ y $M(f_x, f_y)$ simuladas del mismo modo, esperamos que las posibles imprecisiones introducidas por el modelado del sistema óptico se cancelen en su mayoría, dejando residuos mucho menores y por consiguiente resultando en una determinación más robusta de $\Psi(f_x, f_y)$. Investigamos la manera óptima de resolver las indeterminaciones que se presentan para frecuencias mayores a la de corte, analizamos la variación de los resultados con los parámetros del sistema óptico, y exploramos el desempeño de la pseudodeconvolución en presencia de ruido y efectos de borde. En todos los casos tomamos como PSF del sistema óptico la simulada según TVD y como PSF meta la correspondiente PSF simulada según TED. De acuerdo con lo expresado en capítulos previos, esta meta debería mejorar tanto la resolución como el contraste de las imágenes. Para evaluar el desempeño del método utilizaremos en todos los casos imágenes de múltiples objetos puntuales que emiten luz natural (sin polarizar), simuladas según TVD con el mismo código, a las cuales agregaremos eventualmente una componente de ruido. Al final del capítulo investigaremos el desempeño de este método para sistemas ópticos con análisis de polarización.

5.1.1 Corrección de indeterminaciones

Como mencionamos en la sección anterior, para frecuencias mayores a la de corte se produce una indeterminación en $\Psi(f_x, f_y)$, dado que para esas frecuencias $P(f_x, f_y)$ se anula. En la práctica, la existencia de ruido tanto en las imágenes reales como en las simuladas, hace que $P(f_x, f_y)$ se anule solamente en unos pocos puntos, pudiendo en otros tomar valores aleatorios muy pequeños. Los errores numéricos derivados de dividir por estos valores producen una señal espúrea anormalmente alta en algunas frecuencias, la cual domina $\Psi(f_x, f_y)$, y por consiguiente el resultado de la pseudodeconvolución. Esto hace que la imagen pseudodeconvolucionada esté dominada por el ruido. En función de esto resolveremos el problema de las indeterminaciones en dos etapas. En esta sección analizaremos la eliminación de los ceros

de $P(f_x, f_y)$, mientras que trataremos el ruido generado por valores aleatorios pequeños en conjunto con otras fuentes de ruido. Para eliminar la indeterminación producida por los ceros probamos dos estrategias. La primera es puramente matemática, y consiste en sumar un número pequeño $\varepsilon \in \mathbb{R}$ al denominador de la ecuación 5.2, para que éste no se anule. En este caso la expresión de $\Psi(f_x, f_y)$ toma la forma

$$\Psi(f_x, f_y) = \frac{M(f_x, f_y)}{P(f_x, f_y) + \varepsilon}. \quad (5.6)$$

Probamos esta estrategia simulando la imagen de un objeto puntual que emite luz natural según TED. Calculamos la pseudodeconvolución usando como meta la PSF según TED, aplicando la ecuación 5.6, para distintos valores de ε , y comparamos la imagen resultante con la imagen del mismo objeto según TED, que es el resultado que esperamos obtener. En el intervalo comprendido entre $10^{-6} < \varepsilon / \max P(f_x, f_y) < 10^{-3}$, la comparación entre la imagen resultante y la imagen simulada para TED no presenta diferencias significativas.

La segunda estrategia consiste en considerar que para las frecuencias en las que se anula la TF, $\Psi(f_x, f_y)$ se anulará también, quedando definida como

$$\Psi = \begin{cases} \frac{M(f_x, f_y)}{P(f_x, f_y)} & \text{si } P(f_x, f_y) \neq 0, \\ 0 & \text{si } P(f_x, f_y) = 0, \end{cases} \quad (5.7)$$

lo que es equivalente a considerar que esas frecuencias no aportan información. Hicimos pruebas calculando la pseudodeconvolución de la misma imagen anterior usando como meta la TED, aplicando la ecuación 5.7, y comparamos la imagen resultante con la imagen original de TED. Encontramos que la imagen resultante no presenta diferencias significativas con la original. Si bien con ambos enfoques para eliminar las indeterminaciones obtenemos resultados igualmente buenos, optamos por el segundo. Este enfoque presenta la ventaja de no introducir parámetros libres que requieran de un análisis previo de la imagen para determinar su valor adecuado.

5.1.2 Dependencia con el tamaño de la PSF

De acuerdo con la ecuación 5.7, para calcular $\Psi(f_x, f_y)$, es necesario conocer la transformada de Fourier de la PSF $P(f_x, f_y)$ y establecer una función transferencia meta $M(f_x, f_y)$. Esta última será la transformada de Fourier de una función que llamaremos PSF meta.

La PSF real del sistema es en general desconocida, por lo que, como expresamos anteriormente, el método que proponemos está basado en la hipótesis que la misma puede ser

simulada con una precisión aceptable mediante nuestro modelo numérico de TVD. Sin embargo, para aplicar dicho modelo a una imagen particular, es necesario conocer los valores de los parámetros de la simulación: apertura numérica NA , aumento M , longitud de onda λ y tamaño del píxel D . Siendo NA el parámetro más importante del sistema, lo supondremos conocido con una precisión razonable. El efecto de los demás parámetros es cambiar el tamaño de la PSF en relación al tamaño del píxel. El desconocimiento de cualquiera de estos parámetros otorga entonces un grado de libertad a la simulación, cuyo efecto en el resultado de la pseudodeconvolución es necesario explorar, por un lado para determinar cuán robusto es el método frente a variaciones en sus parámetros, y por el otro para proponer criterios para determinar los valores óptimos de los mismos, cuando ellos son desconocidos a priori.

Para investigar la dependencia del resultado de la pseudodeconvolución con el tamaño de la PSF usada para calcular ψ , simulamos la imagen de un objeto puntual autoluminoso que emite luz natural, según TVD. Pseudodeconvolucionamos esta imagen usando para el cálculo de ψ PSFs de prueba con diferentes tamaños, simuladas según TVD, y las correspondientes PSFs simuladas según TED como metas. La PSF del objeto tiene aproximadamente 20 píxeles de diámetro, mientras que las PSFs de prueba tienen entre 2 y 30 píxeles. En todos los casos utilizamos $NA = 60^\circ$. Analizamos la bondad del resultado en cada caso comparándolo con el esperado, que es la imagen del mismo objeto puntual calculada según TED.

En la figura 5.1 mostramos las imágenes resultantes de la pseudodeconvolución para distintas $\Psi(f_x, f_y)$. En ella podemos ver el resultado de usar tres tamaños diferentes de PSF de prueba (a la izquierda una PSF de mayor tamaño que el real, al centro la PSF real, y a la derecha una PSF de menor tamaño). De arriba a abajo mostramos la PSF meta (correspondiente a TED), la PSF de prueba, la imagen a pseudodeconvolucionar (que es la misma en los tres casos), la imagen pseudodeconvolucionada con las distintas PSF de prueba, y el resultado esperado (PSF de TED con tamaño igual a la PSF de la imagen). Para poder apreciar mejor las diferencias entre los casos que presentamos, las imágenes están en escala logarítmica en su intensidad, tienen la escala de grises invertida y tienen la misma escala de tamaño. Por inspección visual de todas las imágenes que pseudodeconvolucionamos, es evidente que al usar funciones de prueba de tamaño mayor al de la PSF verdadera el resultado de la pseudodeconvolución es malo, ya que la imagen resultante está dominada por el ruido. Al utilizar funciones de prueba de menor tamaño que la PSF verdadera, el

resultado de la pseudodeconvolución es bueno, en el sentido que se puede volver a obtener la imagen del objeto. En el caso de las funciones de prueba que utilizamos, la que tiene el tamaño más cercano al de la PSF verdadera presenta un aumento en el contraste. Una posible explicación al hecho de que no podamos obtener una buena reconstrucción del objeto usando una PSF de mayor tamaño que el real, se basa en el análisis de las TF. En el caso en que el tamaño de la PSF de prueba es mayor al de la real, en el espacio de las frecuencias esto se traduce en una frecuencia de corte menor para la TF de prueba que para la TF real. De esta manera todas las frecuencias que están contenidas en la imagen original, pero que son mayores a la frecuencia de corte de la TF de prueba son amplificadas en forma aleatoria y transformadas en ruido, imposibilitando una buena reconstrucción de la imagen. En el caso opuesto, cuando el tamaño de la PSF de prueba es menor al de la real, en el espacio de las frecuencias esto se traduce en una frecuencia de corte mayor para la TF de prueba que para la TF real. De esta forma todas las frecuencias presentes en la TF real están presentes en la TF de prueba, lográndose una buena reconstrucción del objeto. Sin embargo, al ser la frecuencia de corte de esta última mayor a la real, también amplificará las frecuencias comprendidas entre la frecuencia de corte de la TF real y la frecuencia de corte de la TF de prueba, que en general contienen ruido. Esto explica por qué en todos los casos en los que observamos la reconstrucción de la imagen del objeto, hay presente un patrón de ruido, superpuesto con la imagen esperada.

El siguiente paso es tratar de cuantificar las mejoras en la imagen, para lo cual es necesario definir una figura de mérito para decidir sobre la mejora en la imagen introducida por la pseudodeconvolución. Analizamos dos posibles figuras de mérito, basadas en distintos criterios para definir la mejora en la imagen. Estas nos permitirán determinar cuantitativamente cómo afectan a la pseudodeconvolución los posibles errores en la determinación del tamaño de la PSF.

La primera figura de mérito que proponemos se basa en definir la mejora en la imagen a partir de la comparación del tamaño de la imagen de un punto en la imagen original y en la pseudodeconvolucionada, pensando en que una disminución de este tamaño se traduce en una mejora en la resolución. Esta estrategia es de muy fácil aplicación desde el punto de vista de la simulación. Pseudodeconvolucionando la imagen de un punto, y comparando el resultado con la imagen original podemos medir la mejora en la misma. Desde el punto de vista experimental es un poco más complicado porque implica encontrar en la imagen pseudodeconvolucionada un objeto que pueda considerarse puntual, tomar su perfil de intensidad,

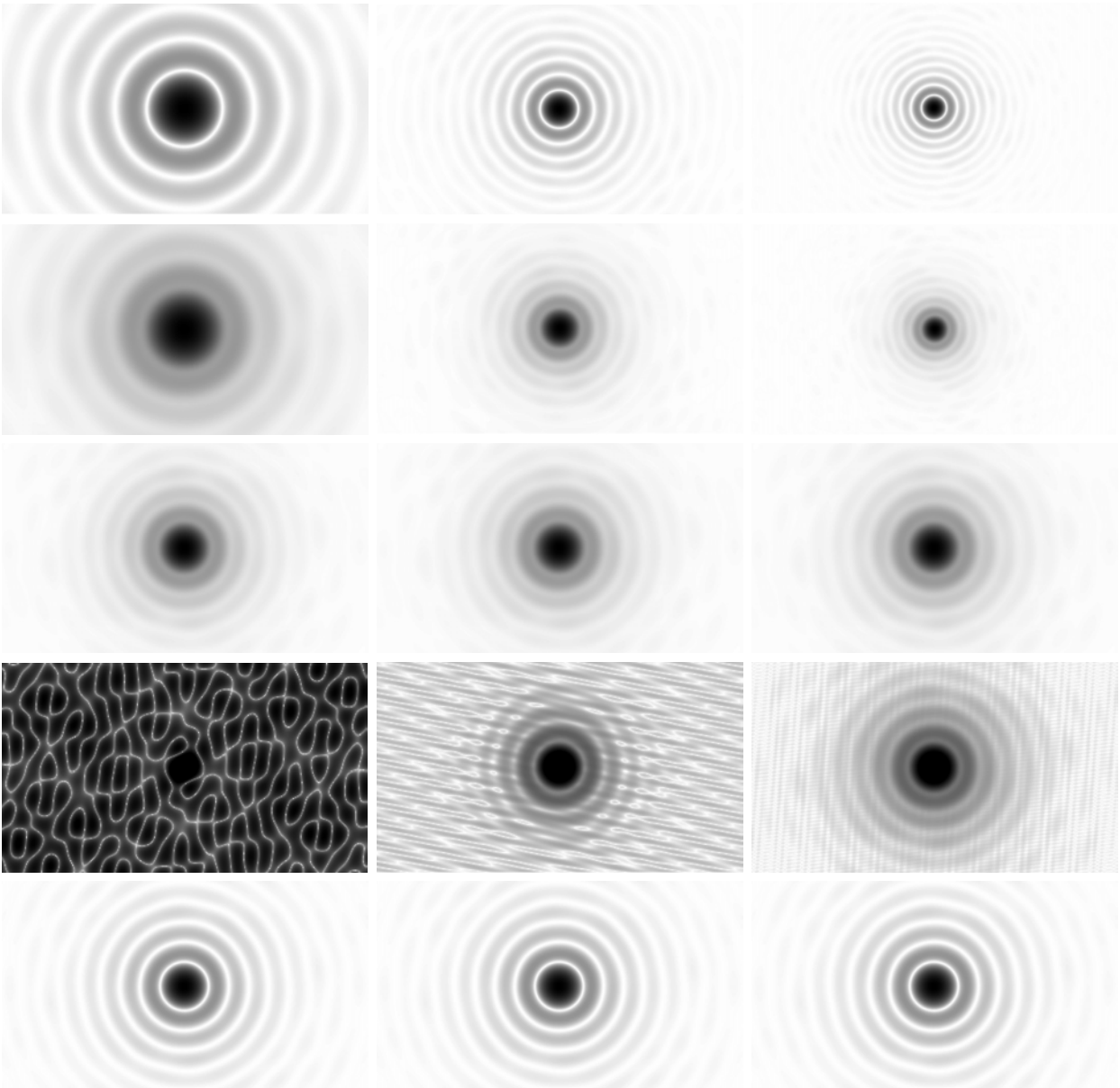


Figura 5.1: Pseudodeconvolución para distintos tamaños de PSF de prueba. En las columnas, de izquierda a derecha, distintos tamaños de PSF de prueba (izquierda 35 píxeles de diámetro, centro 17.5 píxeles de diámetro y derecha 12 píxeles de diámetro). De arriba hacia abajo en las filas, en la primera la PSF escalar de prueba (meta de prueba); en la segunda, la PSF de prueba; en la tercera, la imagen a pseudodeconvolucionar (es la misma en los tres casos); en la cuarta, la imagen pseudodeconvolucionada con las distintas PSF de prueba; finalmente en la quinta, el resultado esperado (es el mismo en los tres casos). Todas las imágenes tienen en escala logarítmica en su intensidad, tienen la escala de grises invertida y la misma escala de tamaño.

medir su tamaño (por ejemplo el ancho a la mitad de la altura máxima), y compararlo con el correspondiente a ese mismo objeto en la imagen original.

La segunda figura de mérito que proponemos se basa en definir la mejora en la imagen como un aumento del contraste de la imagen de un punto pseudodeconvolucionada, respecto del contraste en la imagen original. Desde el punto de vista de la simulación implica pseudodeconvolucionar la imagen de un punto, tomar su perfil de intensidad y a partir de él medir el contraste de la imagen de acuerdo con la ecuación

$$C = \frac{I_{Max} - I_{min}}{I_{Max} + I_{min}}, \quad (5.8)$$

donde I_{Max} es la intensidad registrada en el máximo e I_{min} la correspondiente al mínimo. Y una vez medido compararlo con el contraste en la imagen original. Desde el punto de vista experimental presenta las mismas complicaciones que la primera figura de mérito que proponemos, ya que para medir el contraste es necesario tomar el perfil de intensidad de un objeto puntual, determinar la intensidad en el máximo principal y en el primer mínimo y con ellas el contraste. De hecho, podemos calcular ambas figuras de mérito simultáneamente.

Aplicamos ambas figuras de mérito a las imágenes de un objeto puntual autoluminoso no polarizado, pseudodeconvolucionadas con las distintas PSF de prueba descritas anteriormente. Calculamos la primera figura de mérito tomando un perfil radial centrado en el píxel central de la imagen, haciendo luego un ajuste gaussiano del perfil, a partir del cual obtuvimos el ancho a mitad de altura ϕ . Repetimos la operación en la imagen original, obteniendo ahora su ancho a mitad de altura ϕ_n , y comparamos ambos anchos mediante su cociente

$$f_1 = \frac{\phi}{\phi_n}. \quad (5.9)$$

La segunda figura de mérito la calculamos tomando el perfil de intensidad de la imagen pseudodeconvolucionada, midiendo la intensidad del máximo principal y del primer mínimo, y calculando el contraste C por medio de la ecuación 5.8. En la figura 5.2 presentamos ambas figuras de mérito en función del tamaño de la PSF de prueba. En esta figura podemos ver que el cociente f_1 toma valores cercanos a la unidad cuando el tamaño de la PSF de prueba es mucho menor al de la PSF real, y decrece abruptamente en las cercanías del verdadero tamaño de la PSF. Por inspección visual de las imágenes pseudodeconvolucionadas, notamos que aquellas que tienen una PSF de prueba con mayor tamaño que la real no dan como

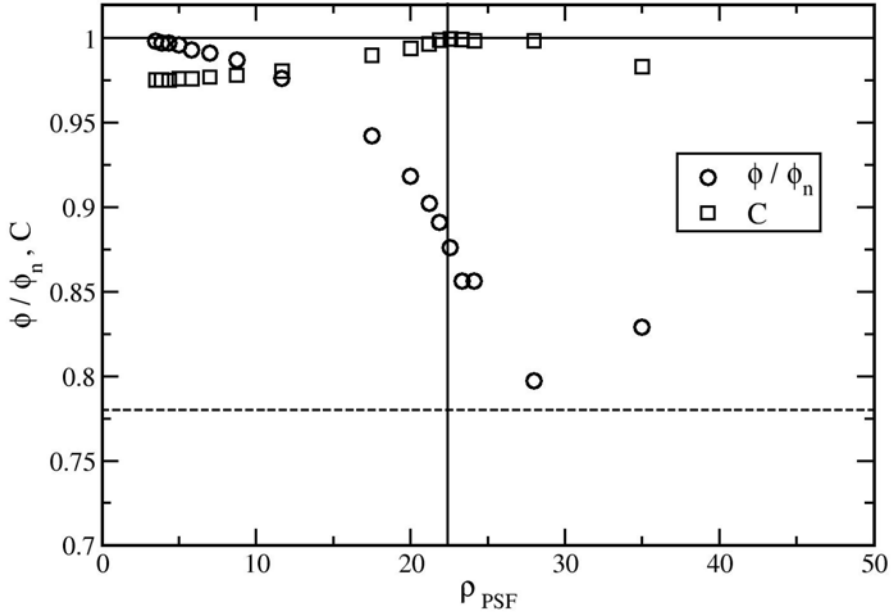


Figura 5.2: Figuras de mérito utilizadas para analizar la dependencia del resultado de la pseudodeconvolución con el tamaño de la PSF ρ_{PSF} . En esta figura presentamos el cociente de los anchos a mitad de altura $\frac{\phi}{\phi_n}$ y el contraste C en función del tamaño de la PSF de prueba ρ_{PSF} . La línea vertical corresponde al tamaño verdadero de la PSF, mientras que la línea horizontal punteada indica el valor de $\frac{\phi}{\phi_n}$ para el resultado esperado de la pseudodeconvolución.

resultado una buena imagen, por lo que la medida de f_1 carece de sentido en esos casos. Con respecto al contraste, en todos los casos que estudiamos fue siempre mayor a 0.97, presentando valores máximos, del orden de 1, en las cercanías del verdadero tamaño de la PSF. Estas figuras de mérito nos permiten establecer criterios para determinar si el tamaño de la PSF de prueba utilizada es cercano al de la PSF verdadera. En primer lugar, apelamos a un criterio visual: si el tamaño de la PSF de prueba es mayor al de la verdadera PSF, la imagen procesada presenta distorsiones (ver figura 5.1). Una vez descartadas las PSF de prueba que no satisfacen el criterio visual, la mejor PSF de prueba será la que tenga mejor contraste y el menor cociente f_1 .

5.2 Efectos de borde

En el análisis anterior hemos utilizado imágenes de objetos puntuales centrados. Sin embargo, las imágenes reales contienen objetos distribuidos en todo el campo, y en particular objetos cercanos a los bordes de la imagen. Por lo que expusimos en la sección 4.4, es de esperar que estos objetos generen problemas en la pseudodeconvolución, ya que la TF de sus imágenes no resulta del producto de la PSF y el objeto, que constituye la base de la pseudodeconvolución. Para explorar el resultado de la pseudodeconvolución aplicada a imágenes con objetos cercanos al borde (efectos de borde), en primer lugar es necesario simular imágenes que contengan objetos en estas posiciones, y por consiguiente dichos efectos, lo cual debe hacerse con cuidado.

En principio, el método ideal para simular imágenes con n objetos puntuales consiste en utilizar el código numérico descrito en el capítulo 3 repitiendo el cálculo para cada uno de los puntos y sumando las intensidades finales. Sin embargo esto es prohibitivo desde el punto de vista del tiempo computacional. Calcular la imagen de cada punto lleva aproximadamente 15 minutos, por lo que para un valor realista del orden de 1000 puntos, el tiempo de cálculo para cada imagen sería del orden de 10 días.

Por otra parte, la imagen $I(x, y)$ de n objetos puntuales no correlacionados, con posiciones (x_i, y_i) , será la suma de sus imágenes individuales dadas por la PSF, centrada en las posiciones de los objetos,

$$I(x, y) = \sum_{i=0}^n I_i(x, y) = \sum_{i=0}^n P(x - x_i, y - y_i). \quad (5.10)$$

Por ello, una segunda técnica consiste en construir las imágenes de cada uno de los n puntos a partir de una única imagen simulada de un objeto puntual centrado. Esto puede hacerse construyendo la imagen $P'(x, y)$ del objeto centrado con un tamaño de $2n_c \times 2n_f$ píxeles, donde n_c y n_f corresponden al tamaño vertical y horizontal, respectivamente, de la imagen de n puntos que deseamos construir. Luego, la imagen de los n puntos ubicados en (x_i, y_i) puede obtenerse recortando una sección de dicha imagen con tamaño $n_c \times n_f$, dispuesta de tal modo que la posición (x_i, y_i) quede en el centro de la imagen original. La suma de las n imágenes construidas es la imagen del objeto. Este método requiere un tiempo computacional de apenas 4 veces el requerido para la imagen de un objeto puntual, y es el que utilizaremos en lo sucesivo. Por otra parte como la PSF simulada no es exacta, sino que tiene fluctuaciones estadísticas, superponer n veces la misma PSF puede dar lugar a



Figura 5.3: Imagen de un objeto ubicado en el borde izquierdo de la imagen, obtenida a partir del producto de la transformada de Fourier de dicho objeto con la TF del sistema, y antitransformando.

correlaciones en la imagen. En nuestro caso la precisión con la que está simulada la PSF nos permite despreciar las posibles correlaciones.

Una tercer alternativa para obtener la imagen del objeto es multiplicar su transformada de Fourier con la TF obtenida de la simulación de la PSF y antitransformar. Esta forma de obtener la imagen presenta un problema: debido a las propiedades de la transformada de Fourier, la imagen resultante es periódica, mientras que la imagen real no necesariamente lo es. Esto se muestra en la figura 5.3, en la que vemos la imagen de un objeto puntual ubicado en el borde del campo visual, construída con esta técnica. Si bien el objeto puntual fue colocado en el borde izquierdo, por lo que solo debería observarse la mitad de la imagen, las propiedades de la transformada de Fourier hacen que la parte faltante de la imagen de este objeto aparezca en el borde opuesto. De esta forma la imagen resultante es periódica, y elimina los efectos de borde, por lo que este mecanismo para la obtención de imágenes no resulta adecuado para la simulación.

En la sección 4.4 vimos que la cercanía de un objeto al borde de la imagen causa la aparición de un patrón con forma de banda en la MTF debido al recorte de la PSF por los bordes de la imagen. La imagen de muchos puntos puede pensarse como la suma de las

intensidades de los puntos cercanos a los bordes ($I_B(x, y)$) y las del resto ($I_C(x, y)$), y de esta forma la intensidad total en la imagen $I_{total}(x, y)$ estará dada por

$$I_{total}(x, y) = I_C(x, y) + I_B(x, y). \quad (5.11)$$

Dada la linealidad de la transformada de Fourier, la transformada de Fourier de la imagen $\mathfrak{F}[I(x, y)]$ podrá escribirse como

$$\mathfrak{F}_{f_x, f_y}[I_{total}(x, y)] = \mathfrak{F}[I_C(x, y)] + \mathfrak{F}[I_B(x, y)]. \quad (5.12)$$

Como muestra la ecuación anterior, es posible separar arbitrariamente en el espacio de las frecuencias las componentes de la transformada de Fourier correspondientes a puntos ubicados lejos de los bordes, y que por lo tanto no presentan efectos de borde apreciables, y la de los puntos cercanos a los bordes de la imagen, que sí presentan efectos de borde apreciables. De acuerdo al análisis de la sección 4.4, estas últimas deberían introducir un patrón en forma de cruz en la TF, superpuesto con la TF del sistema. En la figura 5.4 podemos ver imágenes simuladas de n puntos con una densidad uniforme. Todas las imágenes están en escala lineal pero con la escala de grises invertida. Las transformadas de las imágenes están en escala logarítmica. En el panel superior, a la izquierda la imagen simulada con 1000 puntos distribuidos uniformemente en todo el campo; en el centro su transformada de Fourier; a la derecha la pseudodeconvolución de la misma utilizando la PSF correcta y como meta la PSF según TED. En el panel central, el mismo análisis que en el superior, pero para 880 puntos distribuidos uniformemente en una región de la imagen que deja libre una banda con tamaño $2\rho_{PSF}$ alrededor de los bordes. En el panel inferior, el mismo análisis, pero para 712 puntos uniformemente distribuidos en una región de la imagen que deja libre una banda con tamaño $4\rho_{PSF}$ alrededor de los bordes. En esta figura se observa efectivamente el efecto descrito. Aparece superpuesto a la MTF del sistema un patrón con forma de cruz, cuya intensidad disminuye al desaparecer los puntos cercanos a los bordes. Además, se observa que el resultado de la pseudodeconvolución se degrada a medida que aparecen puntos más cercanos a los bordes de la imagen. Esto se debe a la amplificación de los efectos de borde por el método de pseudodeconvolución, que aparecen como ruido en la imagen pseudodeconvolucionada.

Para cuantificar los efectos de la cercanía de los objetos a los bordes de la imagen, tomamos un corte horizontal de la MTF en los tres casos: para la imagen en la cual la mínima distancia de los objetos a los bordes de la imagen es cero ($d_0 = 0$), para aquella en

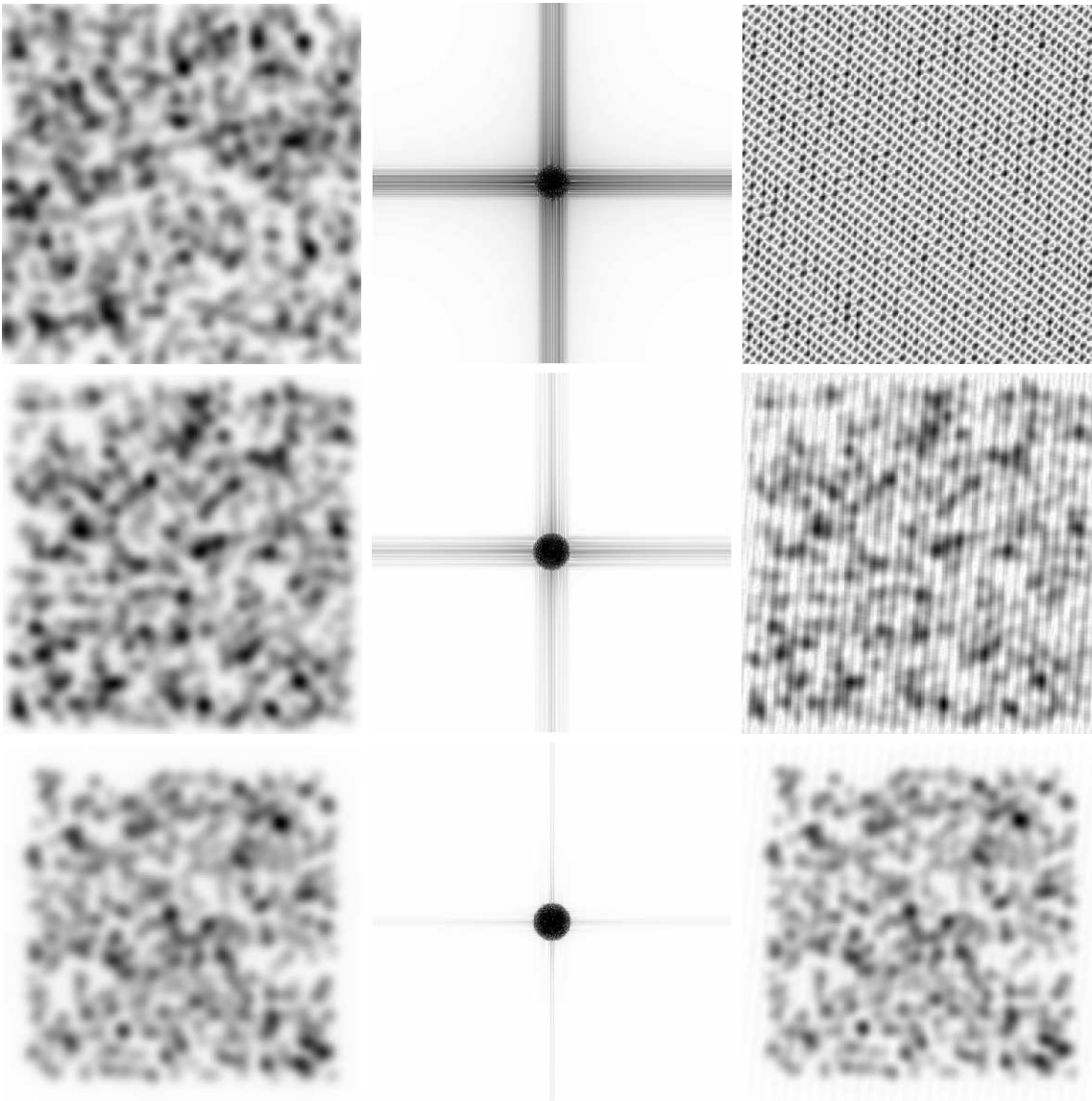


Figura 5.4: A la izquierda, imagen simulada con 1000 puntos distribuidos uniformemente en todo el campo; en el centro la transformada de Fourier de la imagen; a la derecha la pseudodeconvolución utilizando la PSF correcta y como meta la PSF según TED. En el panel central, lo mismo que en el superior, pero para 880 puntos distribuidos uniformemente en una región de la imagen que deja libre alrededor de los bordes una banda con tamaño $2\rho_{PSF}$. En el panel inferior, lo mismo que en los anteriores, pero para 712 puntos uniformemente distribuidos en una región de la imagen que deja libre una banda con tamaño $4\rho_{PSF}$. En todos los casos la densidad de puntos en la imagen es la misma. Todas las imágenes están en escala lineal pero con escala de grises invertida. Las transformadas de las imágenes están en escala logarítmica.

la que la mínima distancia de los objetos a los bordes de la imagen es una vez el diámetro de la PSF ($d_1 = 2\rho_{PSF}$), y finalmente para una en la que la mínima distancia de los objetos a los bordes de la imagen es dos veces el diámetro de la PSF ($d_2 = 4\rho_{PSF}$). Presentamos estos perfiles en la figura 5.5, en la que graficamos un corte de la MTF en función de la frecuencia en los tres casos. Los valores del corte de la MTF están en escala logarítmica para poder apreciar mejor los efectos de borde. En esta figura podemos observar la presencia de una señal para valores por encima de la frecuencia de corte. Esta señal corresponde a la transformada de Fourier de objetos cercanos al borde de la imagen, cuyas PSF se ven recortadas. Además se aprecia que la intensidad de esta señal disminuye al alejarse los objetos de los bordes de la imagen.

Por todo lo expuesto anteriormente, los efectos de borde imposibilitan la correcta pseudodeconvolución de las imágenes. Como a medida que la imagen del objeto se aleja de los bordes los efectos de borde disminuyen, y la transformada de Fourier es lineal, parece plausible lograr buenos resultados con la pseudodeconvolución disminuyendo la intensidad de los puntos cercanos a los bordes de la imagen. De esta forma esperamos atenuar los efectos de borde que imposibilitan lograr una buena pseudodeconvolución. La estrategia que proponemos consiste en multiplicar la imagen por una función gaussiana, centrada en el centro de la imagen. A esta técnica la denominaremos *procesado con máscara gaussiana*. El procesado con una máscara gaussiana consiste en multiplicar la intensidad en cada punto de la imagen por una función gaussiana bidimensional

$$g(x, y) = e^{-\frac{(x^2+y^2)}{2\sigma^2}}, \quad (5.13)$$

donde σ es un parámetro libre que, como es usual, mide el ancho de dicha función. De esta forma, la intensidad de la imagen en los bordes se ve disminuida, así como también su aporte a la transformada de Fourier de la imagen, mientras que la de los puntos del centro prácticamente no se ve afectada. Para analizar este método aplicamos la máscara gaussiana a las imágenes anteriores y pseudodeconvolucionamos la imagen resultante. En la figura 5.6 vemos los resultados de aplicar el procesado con máscara gaussiana a la misma imagen primaria, pero utilizando tres valores de σ diferentes: $\sigma = n_c/2$, $\sigma = n_c/4$ y $\sigma = n_c/6$, donde n_c es el número de píxeles en la dirección horizontal en la imagen. En esta figura vemos que, efectivamente a medida que disminuimos el valor de σ , la intensidad de los puntos de la imagen cercanos a los bordes decrece. En la columna central podemos ver que cuando la intensidad de los puntos en los bordes disminuye, los efectos de borde en la transformada de

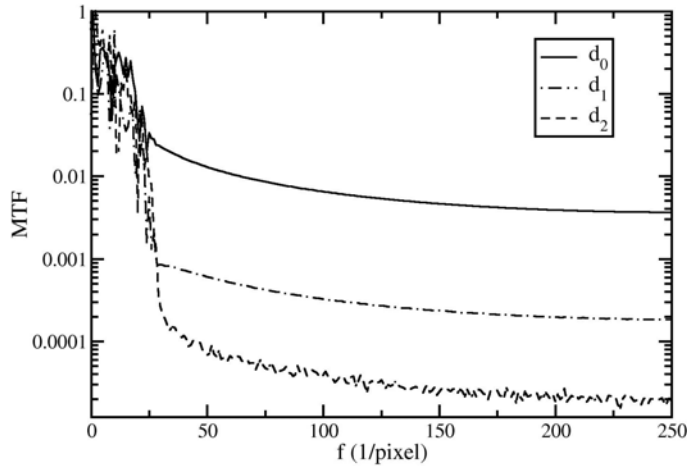


Figura 5.5: Cortes de la MTF para imágenes con puntos ubicados hasta distintas distancias del borde del campo. En la figura d_0 corresponde a una imagen en la que los objetos llegan hasta su borde, $d_1 = 2\rho_{PSF}$ corresponde a una imagen en la que los objetos llegan hasta una distancia del borde igual al diámetro de la PSF, y $d_2 = 4\rho_{PSF}$ corresponde a una imagen en la que los objetos llegan hasta una distancia de su borde igual a dos veces el diámetro de la PSF. Notar que la intensidad de las alas, que se extienden más allá de la frecuencia de corte, baja casi tres órdenes de magnitud al alejar los puntos del borde en dos veces el diámetro de la PSF.

Fourier se atenúan, lo que se refleja en la disminución de la intensidad del patrón con forma de cruz que observamos en la transformada de Fourier de la imagen. Esto a su vez hace que la pseudodeconvolución de la imagen sea posible, como podemos apreciar en la columna de la derecha, en la que observamos que a medida que bajan los efectos de borde se observa una mejor reconstrucción de la imagen.

Para cuantificar la eliminación del patrón con forma de cruz con el procesamiento con máscara gaussiana, tomamos un corte horizontal de la MTF en los casos analizados ($\sigma = n_c/2$, $\sigma = n_c/4$ y $\sigma = n_c/6$) y los comparamos con el perfil de la MTF de la imagen sin procesar (figura 5.7). En esta figura podemos ver que la intensidad del patrón correspondiente a los efectos de borde es menor al aplicar un procesamiento con máscara gaussiana en todos los casos que analizamos. En particular, al considerar el procesamiento con máscara de $\sigma = n_c/6$, si bien la señal disminuye aproximadamente en un orden de magnitud, la intensidad de los efectos

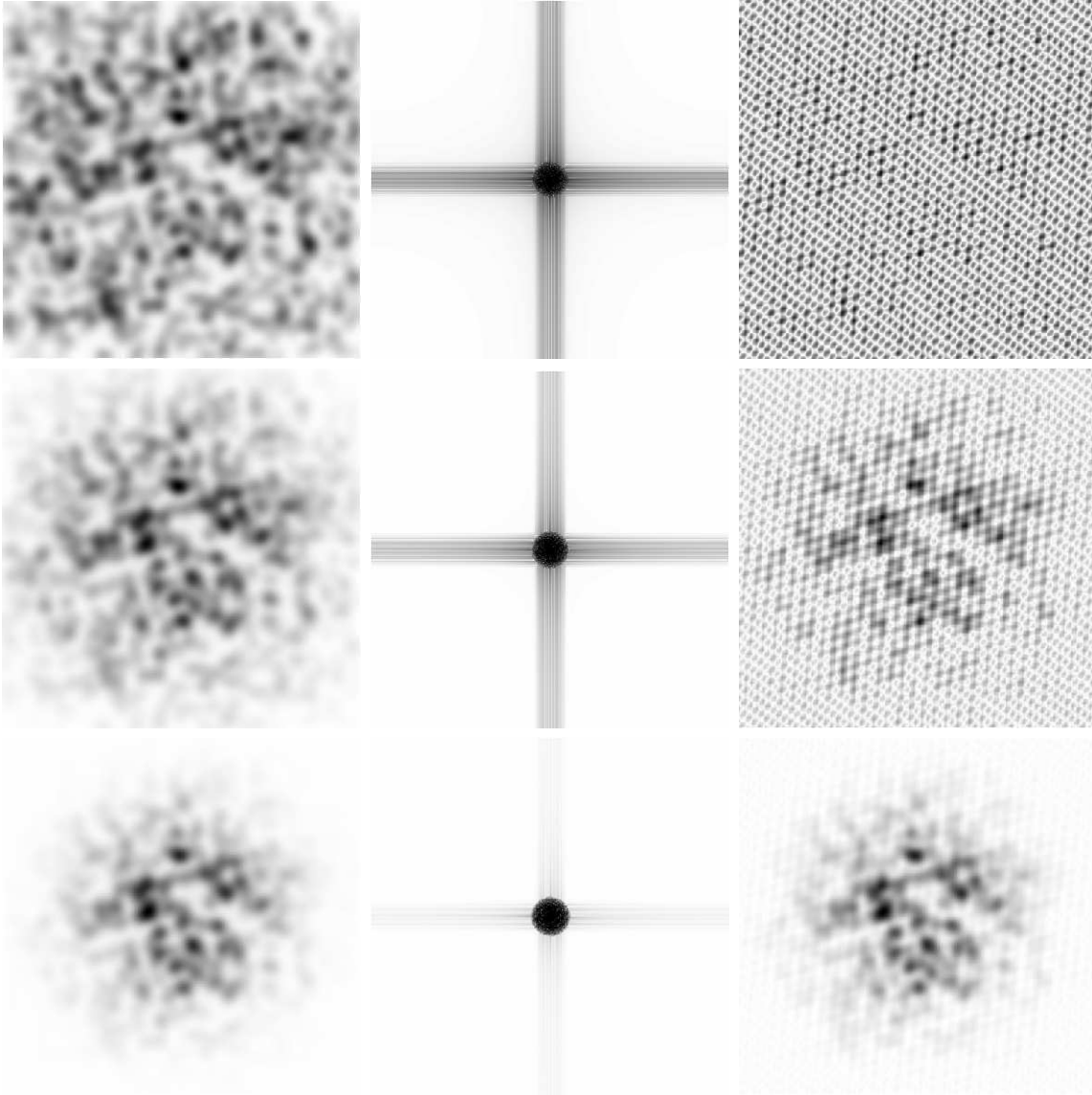


Figura 5.6: En el panel superior, a la izquierda imagen de 512×512 píxeles simulada con 1000 puntos distribuidos uniformemente en todo el campo, utilizando una máscara gaussiana con $\sigma = 256$ píxeles, en el centro su transformada de Fourier, y a la derecha la pseudodeconvolución utilizando como meta la función escalar y con la PSF correcta. En el panel central, lo mismo que en el superior, pero con máscara gaussiana con $\sigma = 128$ píxeles. En el panel inferior, lo mismo que en los anteriores, pero para una máscara gaussiana con $\sigma = 85$ píxeles. En todos los casos la imagen que utilizamos para hacer el procesado fue la misma. Todas las imágenes están en escala lineal pero con escala de grises invertida. Las transformadas de las imágenes están en escala logarítmica.

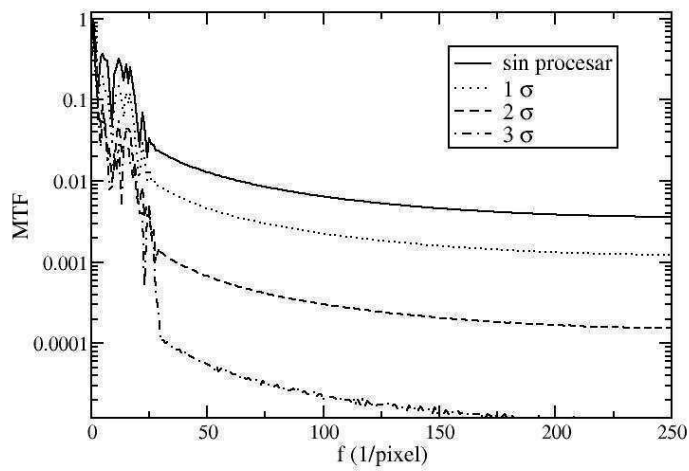


Figura 5.7: Cortes de la MTF para distintos procesados con máscara gaussiana. Nótese que la intensidad de las alas debidas a los efectos de borde baja aproximadamente tres órdenes de magnitud al considerar el procesado con máscara gaussiana de $\sigma = n_c/6$, mientras que la señal baja solamente un orden de magnitud.

de borde baja más de dos órdenes de magnitud respecto de la imagen sin procesar. Estos resultados muestran que utilizando el procesado con máscara de $\sigma = n_c/6$ es posible obtener resultados aceptables en la pseudodeconvolución.

5.3 Ruido

Hasta ahora trabajamos con imágenes ideales en las que consideramos despreciable el ruido. Sin embargo, el ruido siempre está presente en las imágenes experimentales, por lo que es necesario analizar los efectos que causa en los distintos tipos de procesado que estudiamos. Para estudiar los efectos del ruido, agregamos ruido a nuestras imágenes simuladas, las procesamos y comparamos los resultados con el caso sin ruido. Simulamos el ruido en las imágenes mediante un modelo sencillo, en el que suponemos que el mismo es aditivo y que está caracterizado por una distribución gaussiana con media $\mu = 0$ y dispersión σ_r . Definimos la relación señal-ruido media de la imagen sr a través del cociente

$$sr = \frac{I_{\text{media}}}{\sigma_r}, \quad (5.14)$$

donde I_{media} es la intensidad media de la imagen. Usando sr como un parámetro libre, sumamos a cada píxel de la imagen original un número aleatorio con distribución gaussiana con media $\mu = 0$ y dispersión σ_r , obteniendo este último parámetro de la medición de I_{media} en la imagen y el valor de sr .

Analizamos los efectos sobre la imagen y su transformada de Fourier en seis casos con diferentes relaciones señal-ruido: $sr = 1, 3, 10, 30, 100$ y 300 . En la figura 5.8 mostramos las imágenes de un objeto constituido por 1000 puntos distribuidos en forma uniforme, con distintas relaciones señal-ruido, y sus transformadas de Fourier. En esta figura podemos observar que para baja relación señal-ruido ($sr = 3$) la imagen se encuentra visiblemente degradada, presentándose muy granulada. Al aumentar la relación señal-ruido el granulado disminuye, y mejora la calidad de la imagen. En el espacio de las frecuencias se destaca la presencia de ruido apreciable en todas las frecuencias. Con baja relación señal-ruido ($sr < 10$) las componentes del ruido en la transformada de Fourier de la imagen enmascaran completamente los efectos de borde, ya que en este caso no se observa el patrón en forma de cruz. Al aumentar la relación señal-ruido, las componentes del ruido en el espacio de las frecuencias bajan su intensidad relativa al máximo central, dejando nuevamente en evidencia los efectos de borde (en la imagen correspondiente a $sr = 30$ se puede apreciar nuevamente

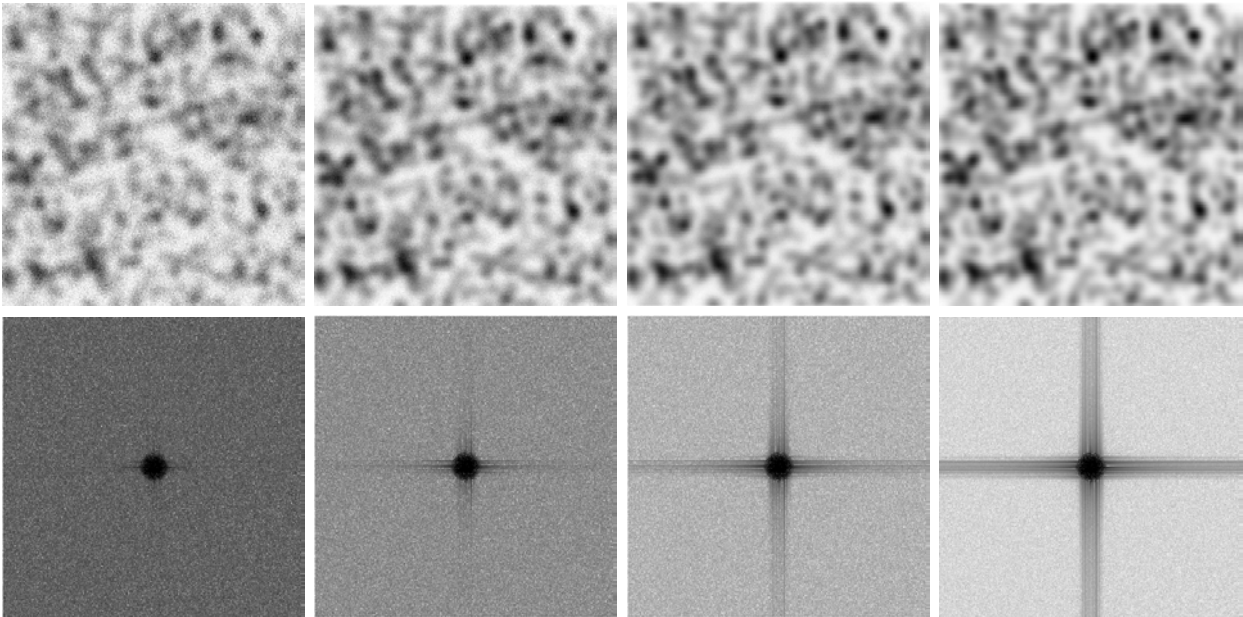


Figura 5.8: Imágenes TVD de un objeto constituido por 1000 puntos distribuidos en forma uniforme (panel superior), con distintas relaciones señal-ruido, y sus transformadas de Fourier (panel inferior). De izquierda a derecha $sr = 3, 10, 30$ y 100 .

el patrón con forma de cruz característico de los efectos de borde).

Una vez analizado cualitativamente el efecto del ruido sobre la imagen y su transformada de Fourier, investigamos sus efectos sobre el resultado de la pseudodeconvolución de las imágenes simuladas. Eliminamos los efectos de borde aplicando una máscara gaussiana de $\sigma = n_c/6$, y pseudodeconvolucionamos la imagen resultante. En el caso de las imágenes con $sr < 10$, la pseudodeconvolución no da resultado, observándose solamente ruido. Las imágenes procesadas, en los casos en los que obtuvimos resultados “aceptables”, se encuentran en la figura 5.9, en la que podemos observar que la pseudodeconvolución para imágenes con relación señal-ruido $sr = 10$ y 30 el resultado es pobre, ya que las imágenes finales presentan mucho ruido. En el caso de las imágenes con relación $sr = 100$ y 300 , podemos ver que en ambos casos la imagen procesada es aceptable, siendo obviamente menor el ruido en la imagen final en el caso $sr = 300$ que para $sr = 100$.

Analizamos el cambio en la relación señal-ruido producido por la pseudodeconvolución simulando un conjunto de 16 imágenes para cada relación sr considerada, pseudodeconvolucionando estas imágenes y determinando la relación señal-ruido de las imágenes procesadas midiendo I_{media} y σ_r . En la figura 5.10, graficamos la relación señal-ruido de las imágenes

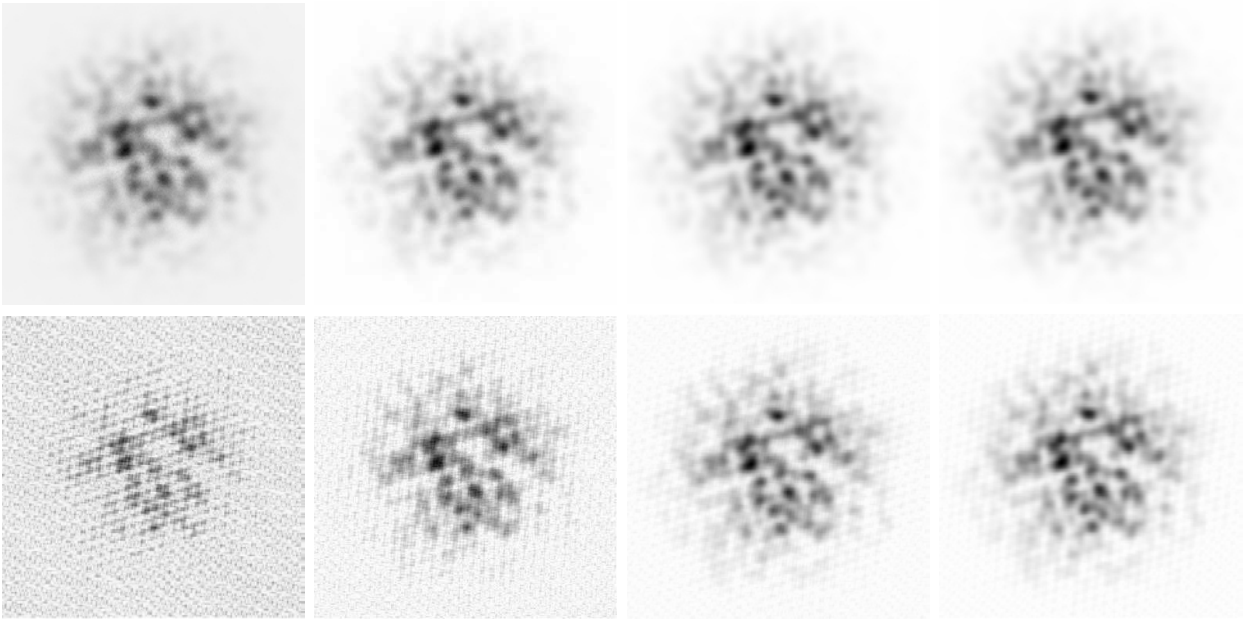


Figura 5.9: En el panel superior, imagen original procesada con máscara gaussiana con $\sigma = n_c/6$. En el inferior, la correspondiente imagen pseudodeconvolucionada. De izquierda a derecha, la relación señal-ruido de las imágenes es $sr = 10, 30, 100$ y 300 .

pseudodeconvolucionadas (sr_{final}) en función de la relación señal-ruido de las imágenes originales (sr_{original}). Encontramos que en todos los casos sr_{final} es menor a la sr_{original} , y empeora en la imagen procesada aproximadamente en un factor 6.

Podemos disminuir el ruido presente en las imágenes procesadas por medio de un filtrado en el espacio de las frecuencias. Si observamos la transformada de Fourier de las imágenes, notamos que la región en la que está guardada la información sobre la imagen es un disco con radio igual a la frecuencia de corte. Toda señal que se encuentre por fuera de esta región la podemos considerar como ruido. En base a esto, construimos un filtro que anula la señal por fuera de un disco con radio igual a la frecuencia de corte. Como podemos ver en la figura 5.11, la imagen pseudodeconvolucionada y filtrada es notablemente de mejor calidad que la imagen pseudodeconvolucionada sin filtrar. En este caso también estudiamos los cambios en la relación señal-ruido considerando la pseudodeconvolución y el filtro, midiendo la relación señal-ruido como indicamos en el párrafo anterior. En la figura 5.10 graficamos la relación señal-ruido de las imágenes pseudodeconvolucionadas y filtradas (sr_{final}) en función de la relación señal-ruido de las imágenes originales (sr_{original}). Podemos apreciar que la relación señal-ruido mejora notablemente, como era de esperarse por inspección visual de las

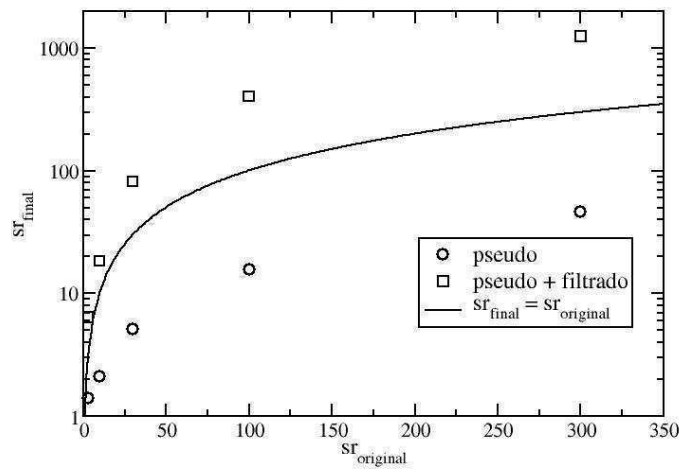


Figura 5.10: Relación señal-ruido de las imágenes procesadas sr_{final} en función de la relación señal-ruido de las imágenes originales sr_{original} . Notar que para las imágenes pseudodeconvolucionadas la relación sr es siempre menor a la sr_{original} , en tanto que para las imágenes pseudodeconvolucionadas y filtradas la relación sr es siempre mayor a la sr_{original} .

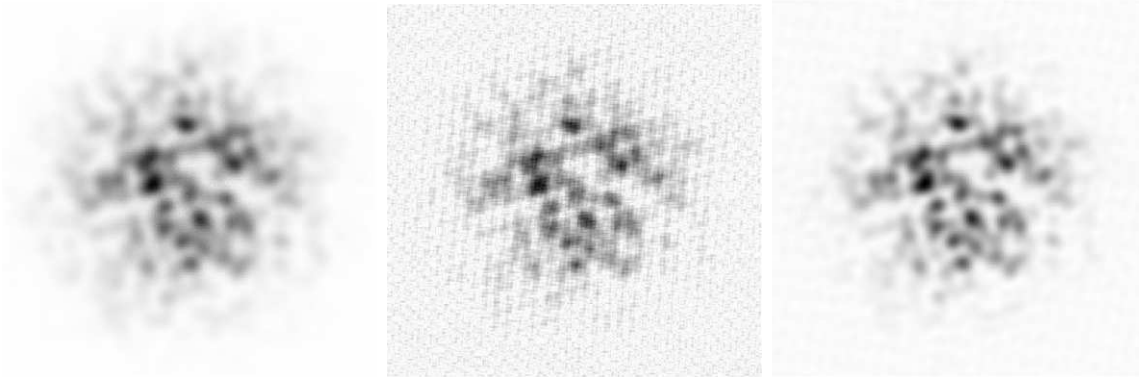


Figura 5.11: Filtrado del ruido en la pseudodeconvolución, para $sr_{original} = 30$. En el panel de la izquierda, la imagen original multiplicada por una función gaussiana con $\sigma = n_c/6$. En el panel central, la misma imagen pseudodeconvolucionada. En el panel de la derecha la imagen psudodeconvolucionada y filtrada.

imágenes filtradas, siendo mejor inclusive que la relación señal-ruido de la imagen original.

En la figura 5.11 podemos observar que el procesado con máscara gaussiana sumado a la pseudodeconvolucion y al filtrado produce mejoras en la imagen original. Estas mejoras consisten en una mayor concentración de luz en los puntos que conforman la imagen, una menor cantidad de luz difusa en el fondo, y una leve disminución en el tamaño de las imágenes de objetos que pueden considerarse puntuales. Para cuantificar estas observaciones, comparamos el tamaño de la imagen de un objeto puntual en una imagen sin procesar y en una imagen procesada. Para poder asegurar que el objeto que estudiamos sea puntual, simulamos la imagen de un objeto compuesto por 800 puntos distribuidos de forma tal que en el centro de la imagen hay un único punto y el punto más cercano está separado de él por al menos 2 veces el radio de la PSF. Los demás puntos tienen una distribución uniforme en el resto de la imagen. De esta forma podemos medir el tamaño de la figura de difracción para un objeto que sabemos que es puntual, conservando los efectos de borde y el ruido. La figura 5.12 muestra cuantitativamente que el perfil del objeto puntual central alcanza una intensidad máxima mayor, tiene un tamaño menor y un contraste superior en la imagen procesada, respecto de la original. Medimos el ancho a mitad de altura ρ_{PSF} ajustando al perfil radial de intensidad del punto una gaussiana, y determinando su desviación estándar σ , que está relacionado con el ancho a mitad de altura por

$$\rho = \sigma\sqrt{\ln 4}. \quad (5.15)$$

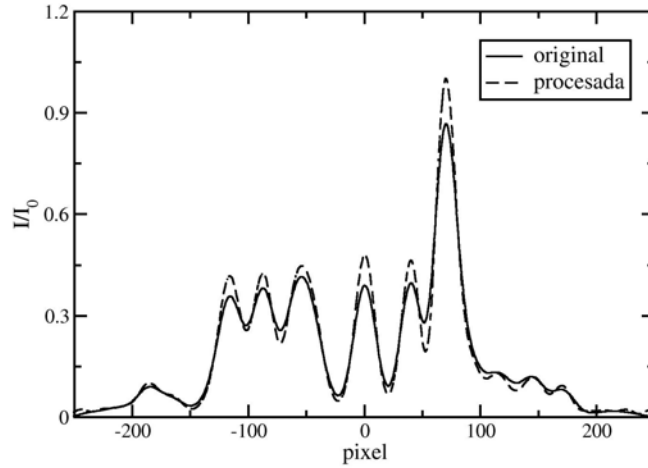


Figura 5.12: Perfiles de intensidad correspondientes a la imagen original multiplicada por una función gaussiana con $\sigma = n_c/6$, y a la misma imagen pseudodeconvolucionada y filtrada.

En la figura 5.13 presentamos el cociente el tamaño ρ de un objeto puntual en la imagen y el tamaño ρ_n de la PSF correspondiente a luz natural, en función de la relación señal-ruido de las imágenes originales sin procesar sr_{original} . Estudiamos este cociente tanto para las imágenes originales sin procesar como para las imágenes pseudodeconvolucionadas y filtradas. La recta horizontal $\rho/\rho_n = 0.78$ corresponde al mencionado cociente cuando ρ es el tamaño de la PSF según TED. El tamaño de un objeto puntual es menor en las imágenes procesadas que en las originales, habiendo logrado aproximadamente en un 50% el objetivo de alcanzar el tamaño de la PSF correspondiente a TED. De esta manera el tamaño de la imagen de un objeto puntual se ve reducido en aproximadamente un 13% al ser procesado utilizando esta técnica

5.4 Polarizadores

Hasta ahora analizamos la pseudodeconvolución aplicada a imágenes de múltiples puntos que emiten luz natural. En esta sección, aplicamos esta técnica a imágenes simuladas considerando TVD con un analizador, y comparamos los resultados obtenidos con los de imágenes no polarizadas.

En primer lugar estudiamos la pseudodeconvolución de imágenes de múltiples puntos,

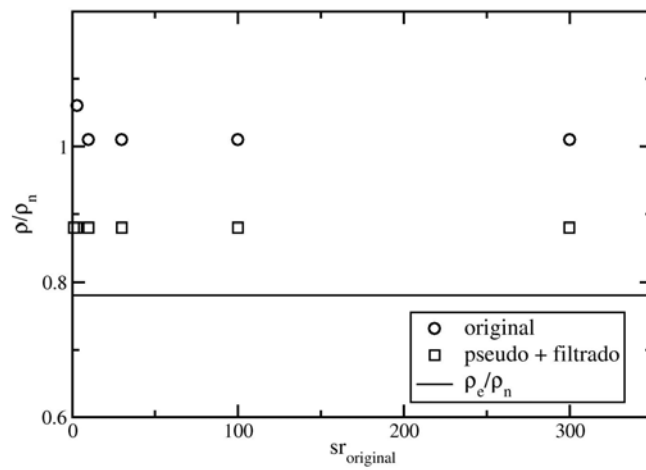


Figura 5.13: Cociente entre el tamaño ρ de un objeto puntual en la imagen y el tamaño de la PSF correspondiente a luz natural ρ_n , en función de la relación señal-ruido de las imágenes originales sin procesar sr_{original} . Los círculos corresponden a las imágenes originales sin procesar, mientras que los cuadrados a las imágenes pseudodeconvolucionadas y filtradas. La recta horizontal $\rho/\rho_n = 0.78$ corresponde al valor del cociente cuando ρ es el tamaño de la PSF según TED.

considerando que cada imagen tiene ruido modelado como describimos en la sección 5.3. Para el procesamiento de las imágenes tomamos como PSF meta la correspondiente a la teoría escalar de la difracción. En la sección 5.2 mostramos que para que la pseudodeconvolución sea practicable es necesario multiplicar píxel a píxel la intensidad de la imagen por una función gaussiana de $\sigma = n_c/6$, para eliminar los efectos de borde. Para el estudio de las imágenes con analizador seguiremos este mismo procedimiento. También mostramos que para eliminar el ruido en las imágenes procesadas sin polarizar es necesario aplicar un filtro en el espacio transformado (ver sección 5.3), por lo que también aplicaremos este procedimiento a las imágenes con analizador. En este caso, como mostramos en el capítulo 4, la frecuencia de corte no es la misma en ambos ejes, por lo que el corte de la MTF no puede ser modelado por una circunferencia en el espacio de las frecuencias. Analizando la MTF encontramos sin embargo que una elipse modela bien el corte, por lo que modificamos consecuentemente el filtro.

En la figura 5.14 presentamos una imagen simulada con analizador similar a las utilizadas en la sección 5.3, antes y después de ser procesada. Observamos que, como en el caso sin analizador, la imagen mejora ganando intensidad y contraste, y disminuyendo el tamaño de los puntos. Además, la imagen del punto central recupera la simetría circular. La figura 5.15 cuantifica estas mejoras presentando los perfiles de intensidad horizontal y vertical del objeto puntual central de la imagen, antes y después de ser procesada. Observamos que el perfil muestra mayor intensidad en el pico, menor tamaño y mayor contraste en la imagen procesada.

En la figura 5.16 presentamos el gráfico del cociente entre el tamaño del objeto puntual central y el tamaño de la PSF correspondiente a luz natural ρ_n , para ambos ejes y en función de la relación señal-ruido de las imágenes originales sin procesar sr_{original} . Nuevamente observamos que las imágenes procesadas se simetrizan y que el tamaño de la imagen de un objeto puntual disminuye en un 20% en la dirección perpendicular al eje del polarizador, mientras que en la otra dirección la mejora es del orden del 16%.

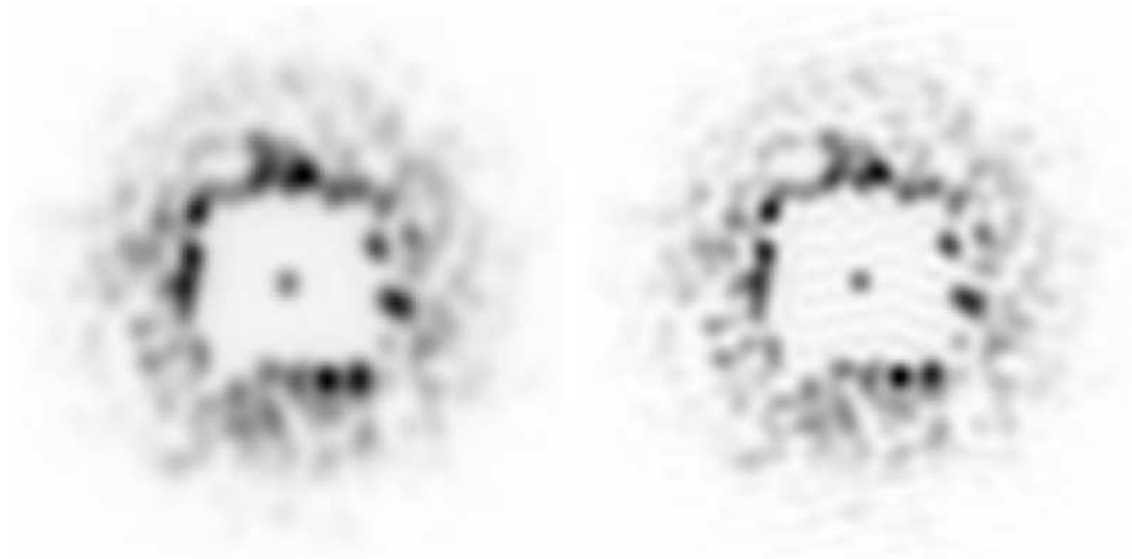


Figura 5.14: Imágenes con polarizador con su eje de absorción horizontal. A la izquierda la imagen original, y a la derecha la procesada. En la imagen procesada se puede observar que el contraste mejora respecto al de la imagen original, así como también que disminuye el tamaño del objeto central y recupera la simetría circular.

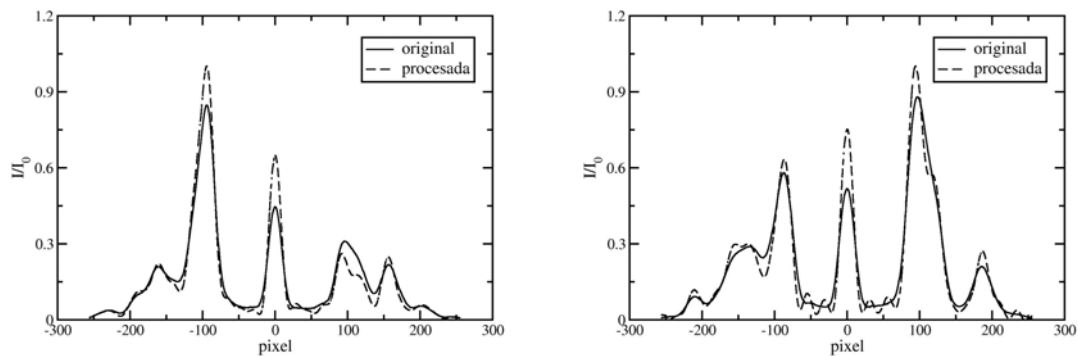


Figura 5.15: Perfiles de intensidad correspondientes a la imagen original multiplicada por una función gaussiana con $\sigma = n_c/6$, y a la misma imagen pseudodeconvolucionada y filtrada, para un sistema con analizador. A la izquierda el perfil en la dirección del eje de absorción del analizador, a la derecha en la dirección perpendicular.

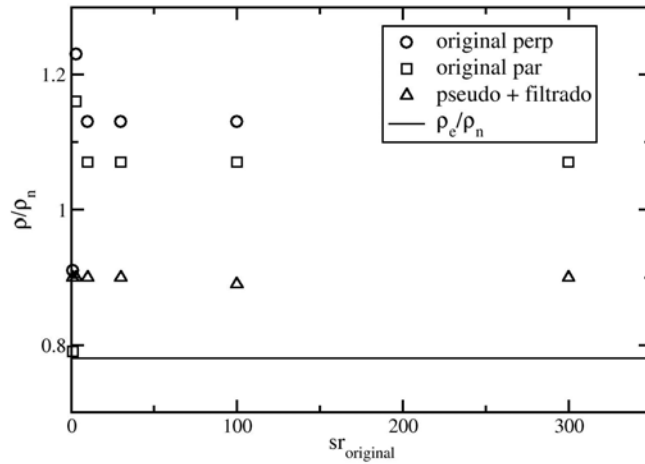
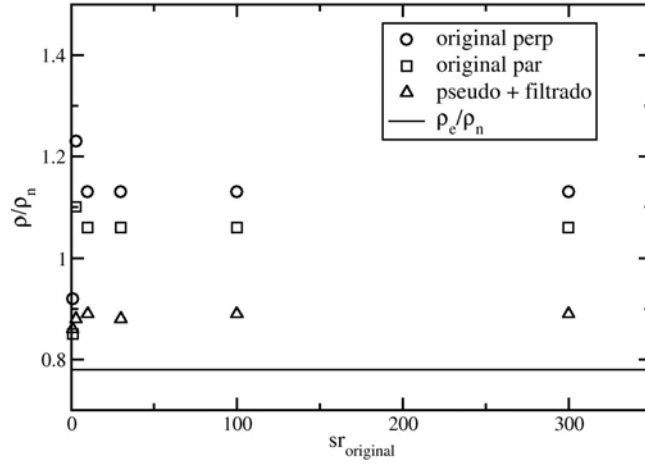


Figura 5.16: Cociente del radio de un objeto puntual en la imagen ρ con el radio de la PSF correspondiente a luz natural ρ_n en función de la relación señal-ruido de las imágenes originales sin procesar $sr_{original}$. Presentamos este cociente tanto para imágenes con el eje del analizador orientado en forma horizontal (panel superior), como vertical (panel inferior). La recta horizontal $\rho/\rho_n = 0.78$ corresponde al radio de la PSF para TED.

Capítulo 6

Pseudodeconvolución de imágenes experimentales

En los capítulos anteriores desarrollamos las herramientas necesarias para la implementación de la pseudodeconvolución, y aplicamos el método a imágenes simuladas numéricamente para investigar su desempeño. En este capítulo mostramos la aplicación de esta técnica al análisis de imágenes experimentales.

6.1 Obtención de las imágenes

En este capítulo trabajaremos con imágenes episcópicas de solidificaciones dendríticas. Éstas fueron tomadas en las instalaciones del Instituto de Física de Materiales de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (IFIMAT-UNICEN), con un microscopio metalográfico Reichert, con $NA = 0.866$ y aumento $m = 312$, y utilizando una cámara CCD (Charge Coupled Device) color marca JAI CV-S3300.¹ Tomamos tres conjuntos de 64 imágenes cada uno, usando como objeto la misma muestra de solidificaciones dendríticas. El primer conjunto corresponde a imágenes tomadas con luz natural, sin colocar un analizador a la salida del sistema óptico; un segundo grupo de imágenes corresponde a la utilización de un analizador con su eje de absorción orientado en la dirección vertical, respecto a la imagen; mientras que el grupo final corresponde a imágenes tomadas con un analizador con su eje de absorción orientado en la dirección horizontal.

El detector CCD, como todo sistema de adquisición de imágenes, introduce efectos espúreos en la imagen que registra, que se deben en parte a su principio de funcionamiento,

¹Agradecemos por las imágenes a los doctores Osvaldo Fornaro y Alejandro González.

y en parte a sus detalles constructivos. La ventaja del CCD sobre otros detectores es que estos efectos instrumentales pueden ser eliminados mediante el procesamiento numérico de las imágenes obtenidas, resultando imágenes cuyas características dependen solamente del objeto y del sistema óptico que las produce. Estas imágenes finales son entonces asimilables a las simuladas con nuestro código numérico, el cual tiene en cuenta los efectos producidos por el microscopio pero no los producidos por el CCD. En esta sección describiremos el origen de los efectos instrumentales, para motivar los métodos que empleamos en su corrección, los cuales están descritos en la sección siguiente.

Un chip CCD es un dispositivo semiconductor que consiste en un arreglo bidimensional de $n_c \times n_f$ elementos fotosensibles (píxeles). Cada píxel está formado por un par de electrodos que generan un pozo de potencial eléctrico en una región definida del chip. Cuando un fotón incide en esa zona, tiene una cierta probabilidad (eficiencia cuántica) de excitar un electrón de la banda de valencia a la banda de conducción del semiconductor. Para la construcción de chips CCD se utiliza óxido de silicio, que tiene un band gap del orden de 1 eV, lo que corresponde a un fotón en el rango infrarrojo cercano, por lo que el dispositivo es sensible tanto a esta radiación como a la luz visible. Los electrones excitados a la banda de valencia quedan atrapados en el pozo de potencial del píxel. Si el chip se expone a la luz durante un cierto tiempo, al finalizar la exposición en cada píxel hay almacenada una carga eléctrica proporcional al número de fotones que incidieron en él. Esta carga es leída por un conversor analógico digital, que la transforma en un valor de intensidad discreto en una escala arbitraria, a razón de una unidad cada cierta cantidad de electrones. Esta escala va desde 0 hasta $2^n - 1$ ADUs (analogic-to-digital units), donde n es la profundidad en bits del conversor, y la cantidad de electrones correspondientes a un ADU se denomina ganancia del sistema. El resultado de este proceso es una imagen de $n_c \times n_f$ valores de intensidad, proporcionales en principio a la intensidad de luz incidente sobre cada uno de los píxeles.

Como dijimos, los sistemas de adquisición CCD introducen efectos instrumentales espúreos en las imágenes, que es necesario eliminar antes de aplicar cualquier técnica de procesamiento. La excitación por fotones no es el único mecanismo por el cual se puebla un píxel, sino que hay electrones que se excitan a la banda de conducción por efectos térmicos. La carga producida en un píxel debida a este efecto se conoce como corriente oscura. Este efecto es aditivo y se puede eliminar tomando una imagen con el mismo tiempo de exposición que tendrá el objeto, pero con el obturador de la cámara cerrado, y posteriormente sustrayendo esta imagen a la del objeto. Por otra parte, dado que el potencial de los pozos varía de píxel

a píxel y el conversor analógico digital introduce un cierto nivel de ruido, para evitar que el valor de intensidad resultante sea negativo el conversor adiciona un valor constante a la lectura (pedestal). De este modo una señal nula en el chip corresponde a un valor positivo de la intensidad en ADUs. Este valor varía de píxel a píxel por los efectos mencionados, y constituye el ruido de lectura. Este efecto es también aditivo y puede eliminarse tomando una imagen con tiempo de exposición nulo (que no contiene señal ni corriente de oscuridad, solo ruido de lectura), y posteriormente sustrayendo esta imagen a la del objeto. Por último, como dijimos anteriormente, la eficiencia cuántica de cada píxel es diferente, así como también lo es la transmisión del sistema óptico en cada punto de la imagen. Esta última en general depende de la distancia del objeto al eje óptico, así como también de la existencia de elementos espúreos (e.g., motas de polvo) sobre las superficies ópticas o el chip CCD. Esto hace que la imagen de un campo iluminado en forma uniforme no muestre una intensidad uniforme. Este es un efecto multiplicativo que se corrige tomando una imagen de un campo con iluminación uniforme (imagen de campo plano), y dividiendo la imagen del objeto por la de campo plano. Es importante notar que en este procedimiento no es posible separar los efectos de sensibilidad del chip de los producidos por la diferencia de transmisión del sistema óptico con la posición del objeto; ambos se corrigen simultáneamente. Las imágenes resultantes son completamente compatibles con nuestro modelo numérico de TVD descrito en el capítulo 3, ya que éste no considera dichas variaciones.

Un problema adicional es que el chip CCD no permite distinguir la longitud de onda de la radiación incidente. Para realizar imágenes en color las cámaras CCD utilizadas en microscopía utilizan un sistema de filtros sobre los píxeles. Cada grupo de 2×2 píxeles contiene un píxel con filtro rojo (R), 2 píxeles con filtro verde (G) y un píxel con filtro azul (B), cuya información se combina numéricamente de acuerdo al formato RGB para generar el color y la intensidad de cada píxel en la imagen final. De este modo se emula la sensibilidad del ojo humano, pero se pierde resolución espacial porque un píxel en la imagen final corresponde a cuatro en el chip.

6.2 Corrección de efectos instrumentales

Las imágenes originales fueron adquiridas con una CCD color, pero en nuestro caso la variable de interés es la intensidad en cada píxel. Por esto, en primer lugar convertimos las imágenes del formato RGB a escala de grises, utilizando el algoritmo correspondiente provisto por el

GNU Image Manipulation Program (GIMP). Este formato recupera la intensidad total en cada píxel. A su vez, convertimos el formato original de las imágenes (Windows bitmap) a FITS (Flexible Image Transport System) usando GIMP. Esto se debe a que, por un lado, contamos con una biblioteca de lectura-escritura de imágenes FITS escrita en C, lo que nos permite acceder a las imágenes en forma directa desde los códigos que desarrollamos, y por el otro, a que contamos con herramientas estándar de análisis y procesamiento de imágenes CCD (e.g., Image Reduction and Analysis Facility, IRAF) que trabajan con imágenes en formato FITS.

Dado que la cámara CCD con la que adquirimos las imágenes no permite tomar una imagen con tiempo de exposición nulo, no nos es posible estimar el valor del pedestal, con lo que no podemos eliminarlo de las imágenes de la manera usual. Sin embargo, el pedestal será eliminado en promedio más adelante, cuando eliminemos el fondo de luz espúrea de las imágenes. Por otra parte, en nuestro caso particular los tiempos de exposición de las imágenes a procesar son muy pequeños, por lo que podemos considerar despreciable el efecto de la corriente oscura. Por consiguiente no aplicamos a las imágenes una corrección por este efecto. Eliminamos los efectos multiplicativos tomando varias imágenes de campo plano, promediamos estas imágenes e hicimos el cociente entre las imágenes a procesar y la imagen promedio del campo plano. En la figura 6.1 mostramos la secuencia de eliminación del campo plano en una de las imágenes. En la imagen de campo plano pueden observarse las variaciones generales de sensibilidad, así como los patrones producidos por motas de polvo (ambos marcados con círculos negros en la imagen).

Pequeños movimientos en el sistema de adquisición (por ejemplo por el cambio de filtros) producen pequeños desplazamientos del objeto entre una imagen y la siguiente, que hay que corregir para poder operar luego con ellas (por ejemplo para promediarlas). Para esto elegimos varios objetos puntuales distribuidos al azar en las imágenes y medimos la posición de sus centros mediante la correspondiente tarea de IRAF. Dentro de cada serie de imágenes (natural, vertical y horizontal) tomamos una imagen cualquiera como referencia y calculamos el desplazamiento de cada uno de los puntos en cada una de las imágenes restantes del grupo. El promedio de los desplazamientos de todos los puntos en una imagen dada nos da el desplazamiento (d_x, d_y) de la imagen respecto de la de referencia, con una precisión del orden de la décima de píxel. Corregimos las imágenes desplazándolas en $(-d_x, -d_y)$. El hecho de que los desplazamientos no sean enteros nos obligó a repixelar las imágenes mediante una interpolación lineal de las intensidades, operación que conserva la intensidad

total. El desplazamiento entre distintas series se corrige del mismo modo, tomando una de ellas como referencia y desplazando las imágenes de las demás series para todas coincidan.

Debido a los desplazamientos en las imágenes, en esta etapa no toda la imagen es utilizable, ya que los bordes están cortados. Este problema se resuelve haciendo un recorte en la imagen, de forma tal de dejar las zonas problemáticas fuera de la región de estudio. Elegimos hacer un recorte que lleve las dimensiones de la imagen a un número cuya descomposición en números primos sea sencilla, porque de esta manera acertamos los tiempos de cálculo de la FFT, ya que el algoritmo funciona más rápido en estas condiciones. Las dimensiones originales de las imágenes son de 640×480 , mientras que las finales son de 512×384 .

Finalmente, dado que las imágenes presentan distinta intensidad media, dividimos la intensidad en cada pixel en todas las imágenes (en todas las series) por su media y multiplicamos por la media de una imagen que consideramos de referencia. De esta forma tenemos un conjunto de imágenes con la misma intensidad media en todos los casos. Para mejorar la relación señal-ruido, promediamos las 64 imágenes de cada grupo. Además eliminamos el fondo de luz espúrea de las imágenes promediadas restando a todos los píxeles el valor de intensidad mínimo de la imagen. Nótese que esto elimina, en promedio, el pedestal introducido en la lectura del chip CCD.

6.3 Pseudodeconvolución

En la sección 5.1.2 investigamos la dependencia del resultado de la pseudodeconvolución con el tamaño de la PSF de prueba utilizada para calcular ψ . Encontramos que al usar funciones de prueba de tamaño mayor al de la PSF verdadera, la imagen resultante está dominada por el ruido haciendo imposible la pseudodeconvolución. Al utilizar funciones de prueba de menor tamaño que la PSF verdadera, obtuvimos buenas reconstrucciones de la imagen del objeto (ver figura 5.1), siendo éstas óptimas cuando los tamaños de ambas PSFs coinciden. Para aplicar la técnica de pseudodeconvolución a las imágenes experimentales, es necesario entonces estimar el tamaño de la PSF en ellas. Estimamos el orden de magnitud del tamaño de la PSF de dos maneras distintas: por un lado, buscamos en las imágenes objetos aislados que podamos considerar puntuales y medimos sus tamaños; por otro lado, la transformada de Fourier de la imagen tiene la misma frecuencia de corte que la TF del sistema, por lo que simulamos distintas PSFs buscando aquella cuya Transformada de Fourier cumpla esta condición. A partir de estas estimaciones simulamos, con los parámetros del microscopio

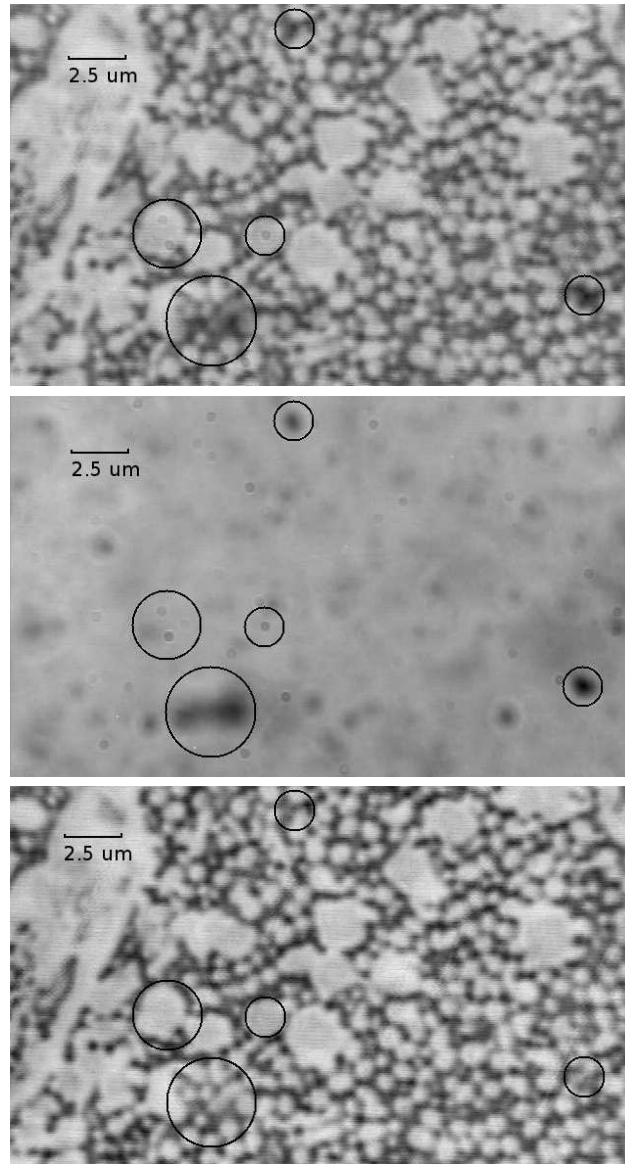


Figura 6.1: Corrección del campo plano. Panel superior, imagen original del objeto sin correcciones; panel central, imagen promedio del campo plano; panel inferior, imagen corregida por campo plano. Marcados con círculos negros se pueden observar las variaciones de sensibilidad más prominentes, claramente visibles en las dos primeras imágenes, pero ausentes de la final gracias al procesamiento aplicado.

dados en la sección anterior, PSFs con distintos tamaños cercanos a los estimados. En primer lugar, procesamos las imágenes experimentales aplicándoles una máscara gaussiana bidimensional con $\sigma_x = n_c/6$ y $\sigma_y = n_f/6$. Luego las pseudodeconvolucionamos utilizando las distintas PSFs simuladas, tomando como meta la TED. Eliminamos el ruido de frecuencias mayores a la de corte, con el filtro descrito en la sección 5.3. Finalmente elegimos la PSF óptima inspeccionando cualitativamente las imágenes pseudodeconvolucionadas, y analizando los perfiles de intensidad para los objetos más pequeños detectables en la imagen. Éstos son aquellos para los cuales las mejoras obtenidas por la aplicación de este método deberían ser más evidentes.

En la figura 6.2 mostramos los resultados de la pseudodeconvolución en tres casos: un tamaño de la PSF mayor al de la experimental, el mejor ajuste al tamaño de la PSF, y finalmente una PSF con tamaño menor. En esta figura podemos notar que a simple vista es posible descartar las PSFs de mayor tamaño que la verdadera por las estructuras espúreas que se observan en la imagen procesada, pero no es posible hacer lo mismo con las PSFs que tienen menor tamaño que la verdadera. Para poder hacer esto último recurrimos a un análisis de los perfiles de intensidad. Buscamos un objeto que puede considerarse puntual, lo más lejano posible a otros objetos, y tomamos el perfil de intensidad centrado en ese punto para varios tamaños de la PSF, en todos los casos mayores o iguales al verdadero. A partir de estos perfiles estimamos la mejora en la resolución haciendo un ajuste multigaussiano al perfil, extrayendo el pico correspondiente al objeto y procediendo como indicamos en la sección 5.1.2. En la figura 6.3 podemos ver los perfiles de intensidad (panel superior), el cociente entre el tamaño del objeto en la imagen pseudodeconvolucionada ϕ y el tamaño del objeto en la imagen experimental ϕ_{exp} , en función del tamaño de la PSF de prueba ρ_{PSF} (panel central), y el contraste en función del tamaño de la PSF de prueba (panel inferior). Podemos observar que tanto el contraste como la resolución aumentan a medida que la PSF de prueba se acerca al valor de la experimental ($\rho_{PSF} = 9.3$), y que ambos son mejores en la imagen pseudodeconvolucionada que en la imagen experimental. La aplicación de la pseudodeconvolución introduce mejoras en la resolución y el contraste de aproximadamente el 16% y el 30%, respectivamente. El primero es similar al que obtuvimos mediante el análisis numérico. Para el contraste, es importante notar que el mismo mide el contraste local de la imagen, y no el de la PSF, por lo que no es comparable con la estimación numérica. Sin embargo, representa una mejora considerable.

Repetimos este análisis para el caso de un analizador colocado a la salida del sistema

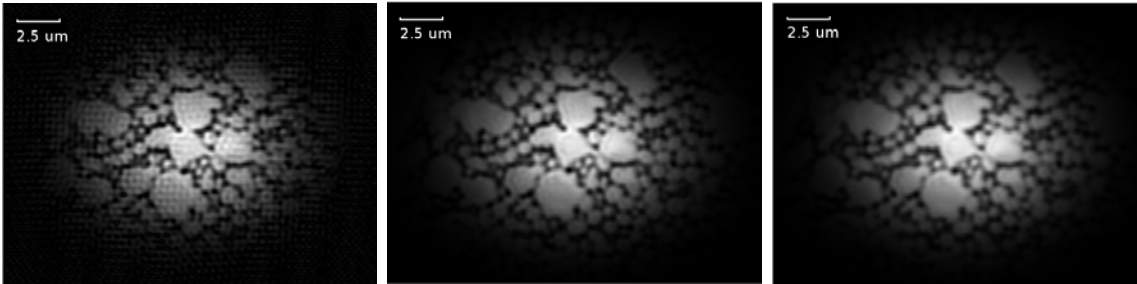


Figura 6.2: Pseudodeconvolución con distintas PSF de prueba. A la izquierda una PSF de mayor tamaño que la experimental, en el centro el mejor ajuste al tamaño de la PSF, y a la derecha una PSF con tamaño menor al de la experimental.

óptico. Por inspección de las imágenes pseudodeconvolucionadas descartamos el uso de la PSF de prueba con $\rho_{PSF} = 9.3$, ya que no obtuvimos un buen resultado de la pseudodeconvolución en este caso. Los perfiles de intensidad de las demás PSFs de prueba se encuentran en la figura 6.4. Al utilizar un analizador, por lo visto en los anteriores capítulos es necesario tomar perfiles en dos direcciones, en este caso tomamos las direcciones vertical y horizontal en la imagen, que respectivamente coinciden con la dirección paralela y ortogonal al eje de absorción del polarizador. En esta figura podemos observar que tanto la resolución como el contraste aumentan en la dirección paralela al eje de absorción del polarizador (panel superior), siendo el aumento en la resolución del orden del 5% y el del contraste del orden del 40%. En la dirección ortogonal al eje de absorción del polarizador (panel inferior), también observamos un aumento de la resolución y del contraste, aunque debido a la cercanía de otros puntos a aquel en el que está centrado el perfil, no es posible cuantificar este aumento. El aumento en el contraste es notorio en el objeto en que está centrado el perfil, para el cual la diferencia entre la intensidad en el máximo y la intensidad en el primer mínimo cercano es mayor en el caso de la PSF con $\rho_{PSF} = 8.8$ que para la imagen experimental. Por otra parte, el aumento en la resolución se pone en evidencia para el objeto cuyo centro se encuentra en el píxel 11.5, que no está resuelto en la imagen experimental, mientras que en la imagen pseudodeconvolucionada sí se observa.

Finalmente, analizamos el resultado de la pseudodeconvolución utilizando como meta una PSF meta distinta, que de acuerdo a los trabajos de Horikawa (1994) y Sheppard & Choudhury (2004) mejoraría la resolución. Simulamos esta PSF utilizando el código descrito en el capítulo 3, modificado para incorporar una obstrucción central del 50% del área en la pupila de entrada del sistema, de forma tal de obtener una pupila anular. Utilizando la

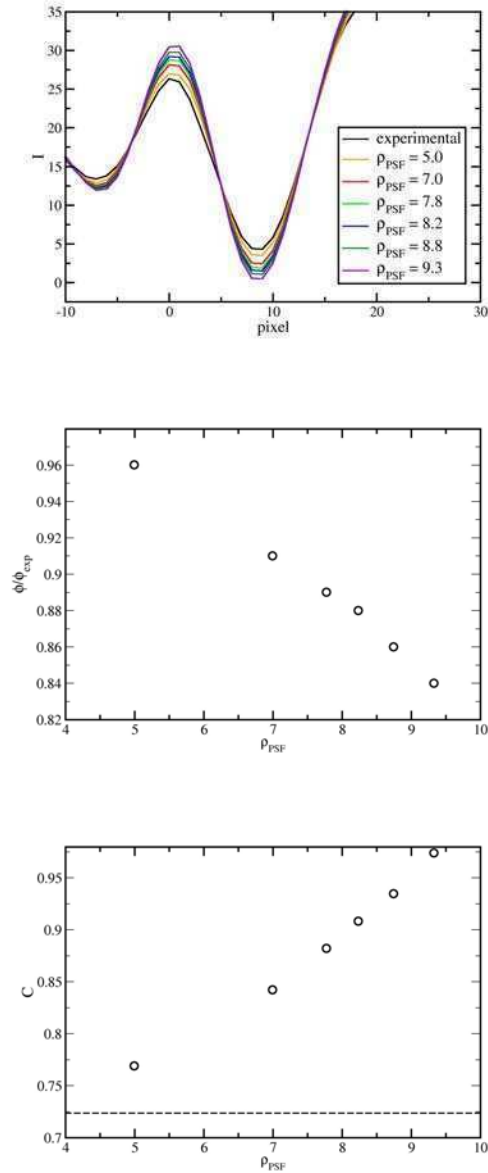


Figura 6.3: Cuantificación de las mejoras introducidas por la pseudodeconvolución. En el panel superior los perfiles de intensidad centrados en un objeto que consideramos puntual; en el panel central el cociente entre el tamaño del objeto en la imagen pseudodeconvolucionada y el tamaño del objeto en la imagen experimental, en función del tamaño de la PSF de prueba; finalmente, en el panel inferior el contraste en función del tamaño de la PSF de prueba. La línea punteada horizontal en el panel inferior indica el contraste de la imagen experimental.

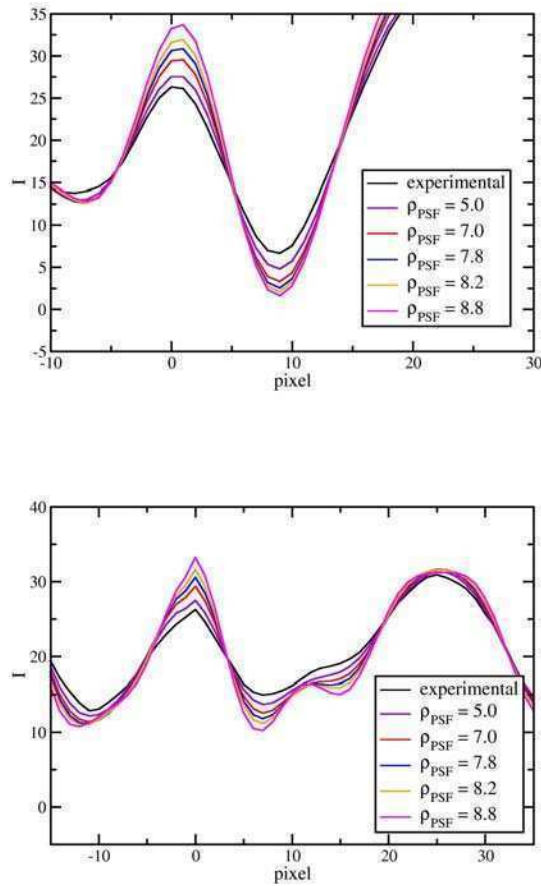


Figura 6.4: Cuantificación de las mejoras introducidas por la pseudodeconvolución en el caso del microscopio con análisis de polarización. En el panel superior los perfiles horizontales de intensidad centrados en un objeto puntual; en el panel inferior los correspondientes perfiles verticales. Se observa claramente que los picos crecen y los valles disminuyen en la imagen procesada, lo que implica un aumento de contraste. Por otra parte, en la imagen procesada los picos se angostan y aparecen otros no observados en la imagen experimental, lo que implica un aumento de resolución.

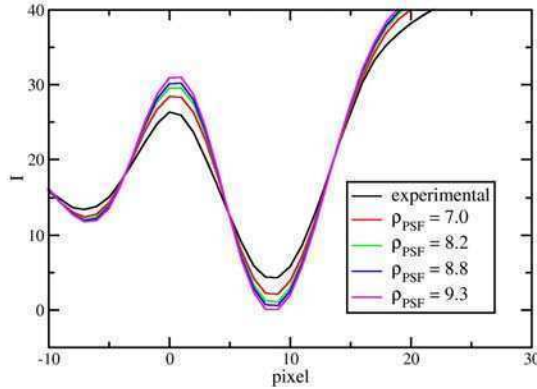


Figura 6.5: Cuantificación de las mejoras introducidas por la pseudodeconvolución en el caso de luz natural para una PSF meta con la pupila de entrada con obstrucción del 50% de su área. Los perfiles de intensidad centrados en un objeto puntual muestran que los picos crecen y los valles disminuyen en la imagen procesada, lo que implica un aumento de contraste. Por otra parte, en la imagen procesada los picos se angostan, lo que implica un aumento de resolución.

PSF simulada como meta, procesamos las imágenes experimentales de luz natural con el procedimiento descrito anteriormente. La figura 6.5 muestra los perfiles de intensidad de un objeto puntual en la imagen experimental y en las procesadas. Nuevamente se observa un aumento de la resolución en las imágenes procesadas del orden del 20%, así como también del contraste, en un 28%.

Comparando los resultados obtenidos en los casos investigados, encontramos que la utilización como meta de una PSF correspondiente a la pupila de entrada obstruida en un 50%, produce mejores resultados en la pseudodeconvolución de nuestras imágenes experimentales que los obtenidos de la utilización como meta de la TED sin obstrucción en la pupila de entrada.

6.4 Aplicación a objetos conocidos

Aplicamos nuestra técnica a las imágenes de dos objetos conocidos. En primer lugar, en la figura 6.6 presentamos la imagen de una microesfera de 100nm, tomada con un microscopio confocal con objetivo de inmersión 63X/1.4NA (tomada de Cole et al. 2011) y la correspon-

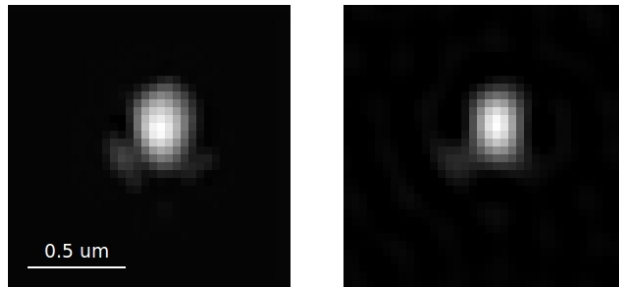


Figura 6.6: Aplicación de la técnica a la imagen de una microesfera de 100nm, tomada con un microscopio confocal con objetivo de inmersión 63X/1.4NA (tomada de Cole et al. 2011) y la correspondiente imagen procesada.

diente imagen procesada. Dado el tamaño del objeto, esta imagen constituye una PSF. Al aplicarle la técnica, se puede observar una disminución en el tamaño de la imagen (figuras 6.6 y 6.7). Para estimar la mejora en la imagen, hicimos un ajuste gaussiano bidimensional con dispersiones distintas en ambos ejes, obteniendo una disminución en el tamaño de la figura de difracción de $\sim 9\%$ en una dirección y $\sim 17\%$ en la otra.

También aplicamos la técnica a la imagen de fluorescencia de una célula HeLa, marcada con proteína verde fluorescente, GFP por sus siglas en inglés². La misma fue tomada con microscopía wide field, con iluminación LED 480nm de longitud de onda, y 40X/0.75NA. En la figura 6.8 presentamos la imagen original y la correspondiente imagen procesada. Se puede observar una mejora en la definición en las estructuras de la célula.

²Agradecemos por esta imagen a la Dra. Andrea Bragas

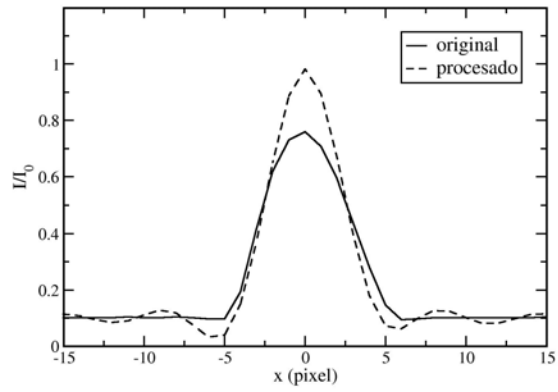


Figura 6.7: Perfiles de intensidad de la imagen original y la procesada.

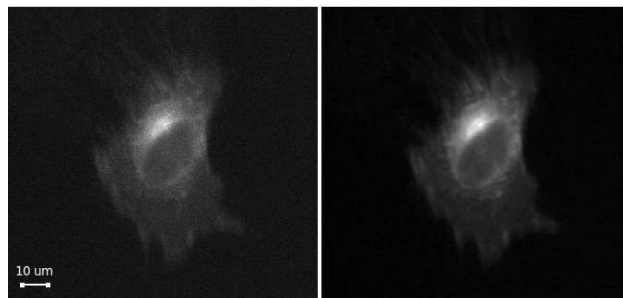


Figura 6.8: Aplicación de la técnica a la imagen de una célula HeLa y la correspondiente imagen procesada.

Capítulo 7

Conclusiones y perspectivas

El objetivo general de esta tesis es mejorar la resolución en sistemas formadores de imágenes de gran apertura numérica, a partir del desarrollo y la posterior aplicación de técnicas de procesamiento de imágenes en el espacio de las frecuencias. Particularmente aplicamos estas técnicas al microscopio con análisis de polarización.

El desarrollo y validación de las técnicas de procesamiento de imágenes requieren el conocimiento del proceso de formación de las imágenes. Para el estudio de la formación de imágenes en sistemas con gran apertura numérica es necesario tener en cuenta los efectos de la polarización. Como dijimos anteriormente en los capítulos 1 y 3, esto hace imprescindible el uso de una teoría vectorial de la difracción para describirlos. Por ello, desarrollamos un modelo numérico original, que calcula la integral de difracción a partir del principio de Huygens-Fresnel, modificado para tener en cuenta las propiedades vectoriales de la luz, y combinado con una técnica de integración de Monte Carlo. Este modelo numérico presenta ventajas sobre los modelos previos de la TVD. En primer lugar, es un modelo *ab initio*, con pocas aproximaciones. En segundo lugar, es suficientemente versátil como para permitir, con pocas modificaciones, el estudio de distintos tipos de objetos y sistemas ópticos.

Aplicando este método estudiamos la formación de imágenes en el microscopio, comparando las PSF predichas por las teorías escalar y vectorial de la difracción, para microscopios con distintas aperturas numéricas, considerando objetos autoluminosos no polarizados. Encontramos en primer lugar que, como predice la teoría, el tamaño del disco de Airy disminuye a medida que aumenta la apertura numérica, tanto para TED como para TVD. En segundo lugar, para aperturas numéricas grandes la teoría vectorial predice una PSF cuyo disco central es de mayor tamaño que el predicho por TED, lo que indica que la resolución del sistema empeora respecto de la predicha por TED cuando no son despreciables los efectos de la po-

larización. Para el caso del uso de un analizador a la salida del sistema óptico, la PSF se ensancha en la dirección normal al eje de absorción del analizador, lo que empeora la resolución del sistema en esta dirección. Un estudio cuantitativo de la resolución del sistema muestra que la resolución predicha por la teoría vectorial es aproximadamente 13% menor que la esperada para la teoría escalar (Ciocci et al. 2010). Por otra parte, también observamos que el primer mínimo de la PSF para TVD alcanza valores superiores que en el caso de TED, lo que muestra que hay un deterioro del contraste en el sistema debido a los efectos de la polarización. Al colocar un analizador, encontramos que la variación en el contraste es direccional, siendo similar a la predicha para TVD con luz natural en la dirección paralela al eje de absorción del polarizador y mejorando notablemente en la dirección perpendicular a dicho eje. Nuestros resultados concuerdan con los de Richards & Wolf (1959) y Sheppard & Wilson (1982). Estos autores encuentran como nosotros que la TVD predice PSFs con mayor tamaño y menor contraste. Si bien esto es esperable debido a que la hipótesis de trabajo de nuestro modelo de TVD son similares a las de Richards & Wolf, el tratamiento del principio de Huygens-Fresnel es diferente, ya que nosotros utilizamos ondas secundarias vectoriales esféricas mientras que estos autores utilizan ondas vectoriales planas. Nuestros resultados sugieren por lo tanto que las dos construcciones son físicamente equivalentes.

Como mencionamos en el capítulo 1, una forma experimental de mejorar la resolución del sistema es mediante el uso de condensadores anulares. Usando nuestro método, estudiamos los efectos en el patrón de difracción producidos por el uso de un condensador anular para iluminar un objeto puntual. En primer lugar calculamos la PSF para un objeto puntual iluminado y la comparamos con la PSF de un objeto autoluminoso. Encontramos que el disco central del patrón de difracción es más angosto y el primer mínimo de difracción más profundo para objetos iluminados. Esto muestra que el cambio en la resolución no se debe solamente a efectos de la coherencia de la iluminación, como plantean McKechnie (1972) o Nayyar & Verma (1976), sino que también hay un cambio en la PSF del sistema, tal como encuentran Sheppard & Wilson (1982) para el caso de un condensador anular y luz incidente linealmente polarizada. Sin embargo, al analizar la resolución encontramos que empeora en el caso de objetos iluminados, lo que muestra que los efectos de coherencia investigados por McKechnie (1972) o Nayyar & Verma (1976) se encuentran presentes (Ciocci et al. 2011a). Planeamos investigar con mayor profundidad los orígenes y la naturaleza de este efecto.

También estudiamos el comportamiento del sistema en el espacio de las frecuencias, comparando las características de la Función Transferencia en los casos analizados. Encontramos

que para grandes aperturas numéricas, la TF predicha por TED posee mayor amplitud para cada frecuencia que la TF predicha por TVD. Al colocar un analizador, la TF a lo largo de su eje de absorción es muy similar al caso de TVD sin analizador, presentando esta última valores ligeramente superiores. En cambio, la TF a lo largo de un eje perpendicular al de absorción del analizador tiene una pendiente más pronunciada y presenta lóbulos laterales con valores superiores a los de TVD sin polarizar. Esto indica que para estas frecuencias, la TF usando el analizador contiene mayor información, que puede ser utilizada para mejorar la resolución del sistema. Actualmente estamos trabajando en el desarrollo de un método que permita explotar esta información.

Al calcular la transformada de Fourier de una imagen, superpuesto al patrón que esperamos encontrar (la convolución de la PSF y el objeto) aparece un patrón espúreo con forma de cruz. Investigamos los orígenes de este patrón simulando la imagen de un objeto puntual desplazado hacia los bordes del campo visual. Encontramos que el patrón espúreo se origina en el recorte de la PSF de los objetos cercanos al borde del campo, por parte del detector. Este efecto es problemático a la hora de implementar técnicas de procesamiento basadas en la transformada de Fourier de la imagen. Consecuentemente, la TF de imágenes simuladas con muchos puntos muestran el mismo patrón espúreo cuando los puntos llegan hasta el borde del campo. A partir de estos resultados proponemos un método experimental basado en el filtrado espacial para eliminar el patrón espúreo (Ciocci et al. 2011b). Por otra parte, esto también muestra que no es conveniente simular una imagen multiplicando las transformadas de Fourier del objeto y la PSF y antitransformando el resultado. Las imágenes simuladas con este procedimiento tienen propiedades de periodicidad que no se encuentran en el objeto original, y que en particular eliminan los efectos de borde, por lo que no representan correctamente a las imágenes reales (Ciocci et al. 2011b).

A partir de nuestro método de simulación de imágenes para TVD desarrollamos una técnica de procesamiento de imágenes en el espacio de las frecuencias, que mejora la resolución de sistemas con gran apertura numérica. Esta técnica, a la que denominamos pseudodeconvolución, se basa en la corrección de la TF de las imágenes a procesar a partir de la relación simulada entre la TF de un objeto puntual y una TF meta. Según nuestros estudios numéricos permite obtener una mejora de entre un 10 y un 15% en la resolución del sistema (Ciocci et al. 2011c). Aplicamos finalmente esta técnica a imágenes experimentales, verificando los resultados obtenidos en las simulaciones numéricas. La mejora de la resolución que introduce nuestra técnica permite acercar el desempeño del microscopio convencional al

límite planteado por la teoría escalar de la difracción. Sin embargo, esta mejora es modesta comparada con la lograda por otras técnicas que combinan distintos tipos de iluminación y funciones de apodización (e.g. Sheppard & Choudhury 2004 alcanzan una resolución de 112 nm con $\lambda = 488nm$) o dispositivos experimentales más complejos. La importancia de nuestra técnica radica en que puede aplicarse a microscopios convencionales, ampliamente utilizados y de bajo costo, sin modificaciones del arreglo experimental.

Agradecimientos

Hacer este trabajo llevó mucho tiempo y esfuerzo, no sólo por mi parte. En esta empresa participó un ejército de personas, que hizo posible que yo pueda presentar hoy esta tesis. Espero recordar a todos aquellos que, de una manera o de otra, estuvieron junto a mi...

Quiero agradecer en primer lugar a mis directores, Hanns y Rodolfo, por su buena disposición en todo momento, por escuchar, sugerir, enseñar y por el buen clima que hubo siempre entre nosotros.

En segundo lugar a Liliana y a Teresa, por estar siempre cuando necesité una mano, por la asesoría sentimental en los momentos de desesperación, por las opiniones y consejos, y por escuchar muchas veces el ensayo de esta presentación (esto va por adelantado!!!).

A todos los integrantes del Grupo de Láser, Óptica de Materiales y Aplicaciones Electromagnéticas de la FI-UBA, en particular a los que trabajan junto a mí en el Laboratorio Láser: Liliana y Teresa, Guillermo, Martín, Francisco V., Celeste, Francisco A. y Gabriel. A todos ellos, muchas gracias por hacer que trabajar en el Laboratorio sea un placer.

A mis compañeros en la docencia: Alicia Corsini, Román Martino, Carlos Barach, Manuel Fernandez, Sergio Rossi, Marcela Pereyra y Marcos Solá por liberarme de trabajo docente para que pudiera terminar mi tesis. Gracias, ya lo voy a compensar...

A Mariano Mayoche, por su amistad, por prestarme una oreja cuando fue necesario, y por conseguirme todos los papers que le pedí.

A Cris y a Mamitita, que están siempre presentes, pero las extraño mucho...

A Lita y Fernando, a Alejandro, a mi abuela Ñata, a Mireya, Juan Pedro y a Fabiana. A todos muchas gracias por el amor, por jugar muchas tardes (y también mañanas y noches) con un príncipe y una princesa, y por el esfuerzo de acompañarme.

A Andrés y Sofía, mis dos bellezas. Gracias por quererme a pesar de todos mis defectos. Gracias por iluminarme el día con sus sonrisas. Gracias por entender que a veces (con demasiada frecuencia en los últimos tiempos) mami no puede armar castillos, ir la plaza o jugar toda la tarde. Los quiero mucho.

Finalmente, pero no por eso el menos importante de todos, a Leo. Gracias, mi caballero de reluciente armadura, por rescatarme de los abismos, por despertarte todos los días conmigo, por jugar con los chicos mientras yo no pude hacerlo, por leer este trabajo en sus incontables versiones, por las discusiones, por escuchar una y otra vez, repetida hasta el hartazgo, la misma canción en la compu...

Referencias

- [1] Bertero M, Boccacci P, Introduction to Inverse Problems in Imaging, IoP Publishing, Bristol (1998)
- [2] Bertero M, Boccacci P, Super-resolution in computational imaging, *Micron*, **34**, 265-273 (2003)
- [3] Born M, Wolf E, Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light, Sixth edition, Pergamon Press (1987)
- [4] Ciocci L, Simon JM, Echarri R, Diffraction in high numerical aperture systems: Polarization effects, *J. Opt.*, **12** (2010)
- [5] Ciocci L, Simon JM, Echarri R, Study of the diffraction in the microscope: Annular condenser *J. Phys.: Conf. Ser.*, **274** (2011, a)
- [6] Ciocci L, Simon JM, Echarri R, Border effects in image simulation, en preparación (2011, b)
- [7] Ciocci L, Simon JM, Echarri R, Resolution enhancement in high numerical aperture systems, en preparación (2011, c)
- [8] Ciocci L, Simon JM, Echarri R, Polarization Effects in the Transfer Function of a Conventional Microscope, enviado a la 95⁰ Reunión Anual de la Optical Society of America (2011, d)
- [9] Ciocci L, Veiras FE, Simon JM, The polaroid far from normal incidence, en preparación (2011, e)
- [10] Cole RW, Jinadasa T, Brown CM, Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control *Nature Protocols* **6** (2011)
- [11] Comeau JWD, Costantino S, Wiseman PW, A Guide to Accurate Fluorescence Microscopy Colocalization Measurements *Biophysical Journal* **91**, 4611-4622 (2006)

- [12] den Dekker, van den Bos, Resolution: A survey, *JOSAA*, **14** (1997)
- [13] Evans JA, Nishioka NS, Endoscopic confocal microscopy, *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **21**, 578-584 (2005)
- [14] Farahat AM, Polarized Light Microscopy Technique for Imaging Articular Cartilage, *Journal of Applied Sciences Research*, **6**, 1208-1211 (2010)
- [15] Frigo M, Johnson SG, The design and implementation of FFTW3, *Proceedings of the IEEE*, **93** 216 (2005)
- [16] Gillen GD, Baughman K, Guha S, *Opt. Express*, **17**, 1478-1492 (2009)
- [17] Goodman JW, Introduction to Fourier Optics, Third edition Englewood, Colorado, Roberts & Company (2005)
- [18] Guha S, Gillen GD, Vector diffraction theory of refraction of light by a spherical surface, *J. Opt. Soc. Am. B*, **24**, 1-8 (2007)
- [19] Hecht E, Optics, Second edition, Addison-Wesley Publishing Company (1987)
- [20] Horikawa Y, Resolution of annular-pupil optical system, *J. Opt. Soc. Am. A*, **11**, 1985-1992 (1994)
- [21] Huang B, Bates M, Zhuang X, Super-Resolution Fluorescence Microscopy, *Annual Review of Biochemistry*, **78**, 993-1016 (2009)
- [22] Jackson JD, Classical Electrodynamics, Second edition, New York: Wiley y Sons (1975)
- [23] Jenkins FA, White HE, Fundamentals of Optics, Third edition, McGraw-Hill Book Company (1957)
- [24] Kubota H, Inoué S, Diffraction images in the polarizing microscope, *JOSA*, **49** (1959)
- [25] LaLonde A, Emelander D, Jeannette J, Larson C, Rietz W, Swenson D, Henderson DW, Quantitative metallography of -Sn dendrites in Sn-3.8Ag-0.7Cu ball grid array solder balls via electron backscatter diffraction and polarized light microscopy, *Journal of Electronic Materials*, **33**, 1545-1549 (2004)

- [26] Maude RJ ,Buapetch W, Silamut K, Short Report: A Simplified, Low-Cost Method for Polarized Light Microscopy, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **81**, 782783 (2009)
- [27] Marathay AS, McCalmont JF, Vector diffraction theory for electromagnetic waves, *J. Opt. Soc. Am. A*, **18**, 2585-2593 (2001)
- [28] McKechnie TS, The effect of condenser obstruction on the two-point resolution of a microscope, *Optica Acta*, **19**, 729-737 (1972)
- [29] Nayyar VP, Verma NK, Resolution of a microscope: improvement using a centrally obstructed condenser aperture and semitransparent II-phase annular aperture objective system, *Applied Optics*, **15**, 134–1344 (1976)
- [30] Pence WD, Chiappetti L, Page CG, Shaw RA, Stobie E, Definition of the Flexible Image Transport System (FITS), version 3.0, *Astronomy & Astrophysics* **524**, A42 (2010)
- [31] Pepperkok R, Ellenberg J, High-throughput fluorescence microscopy for systems biology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 690 (2006)
- [32] Prasad V, Semwogerere D y Weeks ER, Confocal microscopy of colloids, *J. Phys.: Condens. Matter*, **19** (2007)
- [33] Richards B, Wolf E, Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structure of the image field in an aplanatic system *Proc. R. Soc. Lon. A*, **253**, 358-379 (1959)
- [34] Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H, A guide to super-resolution fluorescence microscopy, *J. Cell Biol.* **190** 165175 (2010)
- [35] Seo SK, Kang SK, Shih DY, Lee HM, An Investigation of Microstructure and Microhardness of Sn-Cu and Sn-Ag Solders as Functions of Alloy Composition and Cooling Rate, *Journal of Electronic Materials*, **38**, 257-265 (2009)
- [36] Sheppard CJR and Wilson T, The image of a single point in microscopes of large numerical aperture *Proc. R. Soc. Lon. A* **379** 145-158 (1982)
- [37] Sheppard CJR, Choudhury A, Image Formation in the Scanning Microscope, *Ac. Opt.* **24** 1051-1073 (1977)

- [38] Sheppard CJR, Choudhury A, Annular pupils, radial polarization, and superresolution, *App. Op.*, **43**, 4322-4327 (2004)
- [39] Simon MC, Simon JM, Garea MT, Phase shift in dielectric reflection, *App. Opt.*, **26**, 3871-3877 (1987)
- [40] Simon JM, Comastri SA ,The compound microscope: optical tube length or parfocalization?, *Eur. J. Phys.*, **26**, 11011105 (2005)
- [41] Tody D, The IRAF data reduction and anlysis system, *Proc. SPIE Instrumentation in Astronomy VI*, **627**, 733 (1986)
- [42] Török P, Higdon PD, Wilson T, On the general properties of polarised light conventional and confocal microscopes, *Opt. Commun.*, **148**, 300-315 (1998)
- [43] Webb RH, Confocal optical microscopy, *Rep. Prog. Phys.*, **59**, 427-471 (1996)
- [44] Wilson T, Juškaitis R, Higdon P, The image of dielectric points scatterers in conventional and confocal polarisation microscopes, *Opt. Commun.*, **141**, 298-313 (1997)
- [45] Wolf E, Electromagnetic diffraction in optical systems I. An integral representation of the image field, *Proc. R.Soc. London Ser. A*, **253**, 349-357 (1959)
- [46] Youngworth KS, Brown TG, Focusing of high numerical aperture cylindrical vector beamss, *Opt. Express*, **7**, 77-87 (2000)
- [47] Zhan Q, Cylindrical vector beams: from mathematical concepts to applications, *Advances in optics an Photonics*, **1**, 1-57 (2009)