La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de lo Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE © 2022, Todos los Derechos Reservados, CICESE

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California

---

Maestría en Ciencias
en Óptica con orientación en Óptica Física

Deconvolución tridimensional para microscopía de hoja de luz con haces Gaussianos y Bessel

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:

Carlos Enrique Romero Martínez

Ensenada, Baja California, México

2022

Tesis defendida por

Carlos Enrique Romero Martínez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Israel Rocha Mendoza
Director de tesis

Dr. Jacob Licea Rodríguez

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier

Dr. Víctor Manuel Coello Cárdenas

Dr. Víctor Ruiz Cortés

Dra. Karina Garay Palmet
Coordinadora del Posgrado en Óptica

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Copyright © 2022, Todos los Derechos Reservados, CICESE
Prohibida su reproducción parcial o total sin la autorización por escrito del CICESE

Resumen de la tesis que presenta Carlos Enrique Romero Martínez como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Óptica con orientación en Óptica Física.

Deconvolución tridimensional para microscopía de hoja de luz con haces Gaussianos y Bessel

Resumen aprobado por:

Dr. Israel Rocha Mendoza
Director de tesis

Cualquier imagen adquirida a través de un sistema óptico como una simple lupa, una cámara fotográfica, o sistemas más complejos como microscopios o telescopios, es afectada por la calidad de sus lentes. El contraste y la resolución de la imagen dependerá de la luz reflejada, trasmitida o esparcida desde el objeto y la luz que se colecte por el sistema óptico; consecuentemente, la imagen resultante no es igual al objeto. La diferencia entre el objeto y su imagen no se aprecia fácilmente cuando se utilizan sistemas ópticos de alta calidad. Pero si se observa detenidamente las pequeñas estructuras del objeto (el detalle fino) en la imagen, es posible apreciar una falta contraste en la estructuras viéndose algo borrosas. Este efecto se debe al limite de difracción óptico donde la lente más cercana al objeto como la iluminación juegan un papel relevante. Matemáticamente, la imagen resulta de un proceso de convolución entre dos funciones: la función que representa al objeto y la función de respuesta de la lente conocida como la función de respuesta al impulso (PSF, por sus siglas en inglés), misma que define el límite de resolución óptico del sistema. Entonces, no se difícil intuir que, si se conoce la PSF del sistema, se puede recuperar una imagen "más parecida" al objeto mediante un proceso inverso llamado proceso de deconvolución. En esta tesis se presenta una metodología de deconvolución tridimensional para recuperar la imagen de un objeto bajo observación en un sistema de microscopía de hojas de luz láser Gaussianos o Bessel. Para llegar a esta metodología, primero se simuló el proceso de convolución bajo un sistema de hoja de luz en condiciones similares a las del laboratorio, con el fin de emular y comprender la distorsión de las imágenes que se obtienen experimentalmente. Con ello, se obtuvo una PSF volumétrica (3D) del sistema, la cual depende de las características de la hoja de luz y de los objetivos de microscopio. Una vez comprendido el proceso de la convolución en este sistema, se desarrolló un algoritmo para realizar la deconvolución de imágenes de muestras experimentales.

Palabras clave: bessel, gauss, huygens-fresnel, deconvolución, microscopía, hoja de luz

Abstract of the thesis presented by Carlos Enrique Romero Martínez as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Master in Optics with orientation in physical optics.

Three-dimensional deconvolution on light-sheet microscopy using Gaussian and Bessel beams

Abstract approved by:

Dr. Israel Rocha Mendoza
Thesis Director

Any image acquired through an optical imaging system, such as a magnifying glass, cameras, microscopes, or telescopes, is affected by the quality of its lenses. The image quality (in terms of contrast and resolution) depends on the light reflected, transmitted, or scattered from the object and the amount of it collected by such optical systems. Consequently, the resulting image is not precisely the same as the object. The difference between the object and the image is not easily appreciated when the latter is acquired through high-quality optical systems. However, if one looks carefully at the small object structures (the so-called fine details) in the image, it is possible to see specific differences. In particular, one will see that these tiny structures are not well defined, lack contrast, and appear somewhat blurry. This effect is due to the so-called optical diffraction limit, where the lens closest to the object and the light used to illuminate it play a relevant role. Mathematically, the resulting image is due to a convolution process between the object and a lens response function. This latter function, known as the impulse response function (PSF), is actually what defines the resolution limit in any optical imaging system. If the PSF of the system is known, then by a reverse process called deconvolution, an image whose shape is more like the object can be retrieved. This thesis presents a 3D-deconvolution methodology to recover an object under observation in a laser light sheet microscopy system that uses Gaussian or Bessel beams. To obtain this methodology, first it was necessary to simulate the convolution process under a light-sheet system under conditions similar to those used in the laboratory. This was made in order to emulate the distortion of the images as they are obtained experimentally. In this way, the volumetric PSF (3D) of the system is obtained, which, as will be seen in this thesis, depends on the characteristics of the excitation light-sheet and the collection microscope objective. Once the convolution process in this system was understood, an algorithm was developed to perform the deconvolution of images of experimental samples.

Keywords: bessel, gauss, huygens-fresnel, deconvolution, microscopy, light sheet

Dedicatoria

A mis padres y amigos

Agradecimientos

A mi madre por el apoyo y amor incondicional, a mi familia por apoyarme en los momentos difíciles y de desvelo. A mi hermano por el apoyo y preparar desayunito todas las veces que había que estar muy atento a las clases. A mi padre por el amor y las facilidades que me procuraba durante este tiempo de trabajo en casa. A Isra A. por escucharme, apoyarme y comprenderme en esta etapa.

A mis amigos, por todas las risas, apoyo, bicis y demás que me mantienen cuerdo en situaciones apremiantes. A Luis Arturo, por tantas risas en momentos tan complicados, su sabiduría, por ser un gran maestro y por todo el maná. A Omar por su amistad, apoyo emocional y enseñanzas de vida. A Yryx por su amistad, todo el apoyo, recibimiento y conocimiento; por las bicis y las aguas de cebada que hacen tan bonita la vida.

Al grupo de Microscopía Avanzada de CICESE, por el apoyo para la realización de este proyecto.

Al mi comité de tesis, el Dr. Victor Coello, Dr. Pierrick Fournier, Dr. Jacob Licea, Dr. Victor Ruiz, Dr. Israel Rocha por sus atenciones, consejos, sabiduría y comprensión. Por sus sugerencias en cada avance que me ayudaron a mejorar mucho el trabajo realizado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría. No. de becario: 995664

Tabla de contenido

Página

Resumen en español ii

Resumen en inglés iii

Dedicatoria iv

Agradecimientos v

Lista de figuras viii

Lista de tablas xii

Capítulo 1. Introducción

1.1. Hipótesis 2
1.2. Objetivos 2
1.3. Estructura de la tesis 2

Capítulo 2. Fundamentos Teóricos

2.1. Microscopía Fluorescente de Hoja de Luz Láser 4
2.2. Haces de luz para microscopía de hoja de luz 5
2.2.1. Haz Gaussiano 6
2.2.2. Haz Bessel 8
2.2.3. Generación de haces Bessel 9
2.3. Teoría escalar de propagación 10
2.4. Propagación en régimen de Huygens-Fresnel 12
2.4.1. Espectro angular 12
2.4.2. Propagación en coordenadas cilíndricas 13
2.5. Sistemas Ópticos Formadores de Imágenes 15
2.5.1. Función de respuesta al impulso 15
2.5.2. Sistemas coherentes e incoherentes 17
2.5.3. Resolución óptica 17
2.5.4. Función de Transferencia Modulada 18

Capítulo 3. Metodología

3.1. Configuración experimental 20
3.2. Esquema general de la convolución 3D 21
3.3. Propagación de haces 22
3.4. Obtención de la Función de Punto Extendido 25
3.4.1. Cálculo de la Función de transferencia de Modulación (MTF) 26
3.5. Simulación de adquisición de imágenes 27
3.5.1. Adquisición de imágenes bidimensionales 29
3.5.2. Deconvolución 3D 31

Capítulo 4. Resultados y discusión

4.1. Función de respuesta al impulso efectiva tridimensional 34

4.1.1. PSF efectiva utilizando una hoja de luz Gaussiana 35
4.1.2. PSF efectiva utilizando una hoja de luz Bessel 37
4.1.3. Función de transferencia modulada (MTF) 40
4.2. Convolución 3D en un sistema de hoja de luz 43
4.2.1. Convolución 3D con iluminación de hoja de luz Gaussiana 43
4.2.2. Convolución 3D con iluminación hoja de luz Bessel 44
4.2.3. Comparación en la convolución 3D entre iluminación con hoja Gaussiana y Bessel 45
4.3. Deconvolución 3D 49
4.3.1. Comparación en la Deconvolución 3D entre iluminación con hoja Gaussiana y Bessel 49
4.3.2. Aplicación a imágenes experimentales 53

Capítulo 5. Conclusiones

Literatura citada 57

Anexos 59

Lista de figuras

Figura Página

1. Esquema básico para microscopía de hoja de luz. Imagen modificada de (Olarte et al., 2018). . . . 4
2. Configuraciones comunes en microscopía LSFM. a) Diagrama de la técnica SPIM. Imagen modificada de (Gao et al., 2014) b)Diagrama de la técnica DSLM. En esta técnica, un espejo galvanométrico oscila verticalmente a la frecuencia de Nyquist formando una hoja de luz. Imagen modificada de (Keller et al., 2011). . . . 5
3. Representación de haz Gaussiano; se muestran parámetros característicos como la cintura del haz W_0, radio de curvatura $R(z)$. . . . 7
4. Diagrama experimental para generación de haz Bessel J_0. Imagen obtenida de (Durnin et al., 1987). . . . 9
5. Se muestra la sección lateral del haz Bessel generado con una abertura anular y lente. Imagen de simulación, obtenida de (Čižmár y Dholakia, 2009). . . . 10
6. Difracción por una pantalla plana. Σ representa la abertura, y P_0 el punto de observación, r_{01} la distancia entre los puntos P_0 y P_1. . . . 11
7. Debido a la simetría rotacional del problema planteado en este trabajo, es conveniente hacer cambio a coordenadas cilíndricas. Imagen tomada de (Luna-Palacios, 2022)) . . . 14
8. Sistema formador de imágenes en la teoría de Abbe. . . . 16
9. a) Perfil de un ejemplo de función de punto extendido $|h|$, resultado un haz que pasa por una pupila circular. b) Función de transferencia de modulación que muestra el cambio en el contraste y en las imágenes de franjas convolucionadas con la PSF mostrada en a). A medida que las franjas son más cerradas, la imagen tendrá menor contraste debido a la resolución máxima del sistema. . . . 19
10. a) Configuración experimental para microscopía de hoja luz por escaneo digital, imagen modificada de (Luna-Palacios, 2022). b) disposición de objetivos de microscopio para excitación y colección; colocados perpendicularmente entre sí. Se toma el eje Z como la dirección en que se colecta la luz. . . . 20
11. Diagrama de flujo que describe la metodología general para simular el proceso de convolución tridimensional . . . 22
12. Diagrama de flujo para el algoritmo de propagación de haces. Se usa la ecuación de Huygens-Fresnel en coordenadas cilíndricas por sus grandes ventajas computacionales. . 23
13. (a) Campo trasversal para simular la hoja de luz Gasussiana que se forma luego de transmitirse por el OE o la PSF del OC. (b) Campo trasversal para simular la hoja de luz Bessel. Esquema representativo de la propagación de haces Gaussiano (c) y Bessel (d). 24
14. Simulación de haz de iluminación para hoja de luz con haz Bessel. **a)** Haz 3D con simetría radial (dependiente de r y z). **b)** Vista del plano $y = 0$ que contiene el patrón Bessel. **c)** Hoja de luz Bessel final. . . . 25

Figura Página

15. Ejemplo de obtención de PSF efectiva con hoja de luz Bessel. Se realiza el producto elemento a elemento de las matrices 3D correspondientes a la PSF de colección (gráfico superior izquierda) y la iluminación con hoja Bessel (gráfico inferior izquierda). La forma de la PSF de colección se ve modulada por el patrón Bessel en z. Para este ejemplo, el patrón de intensidad de la hoja Bessel en el eje x tiene un cambio que no se aprecia, mientras la intensidad no depende de y, debido a la metodología de simulación de hoja de luz. La modulación primordial es en el eje z o de propagación de la PSF efectiva. . . 26

16. Planos de PSF^{OC} que pasan por el centro de la propagación: $x = 0$, $y = 0$ & $z = 0$. Estos planos son elegidos para el cálculo de la función de transferencia de modulación. . 27

17. a) Representación de una hoja de luz Gaussiana iluminando esferas que yacen dentro del volumen y posteriormente fluorescen. b) Esquema de la iluminación de una esfera con una hoja de luz Gaussiana y esfera. La sección de la muestra excitada debe considerarse como sección volumétrica, lo que numéricamente se representa como un conjunto de matrices 2D perpendiculares al eje z 27

18. a) PSF de colección para objetivo de microscopio de 10mm de distancia focal. Los puntos en verde representan el vector de datos que se extrae para observar el perfil de intensidad b) y medir su FWHM. 28

19. Esquema de barrido en un sistema de hoja de luz estática. En (a), (b) y (c) las esferas se mueven paso a paso a lo largo del eje-z 29

20. Diagrama de proceso de adquisición de imágenes. La PSF simulada para el objetivo de colección corre sobre los subíndices *ijk*, mientras que la PSF seccionada corre sobre los subíndices *ijk'*, donde $k' < k$; analogamente pasa con la matriz de la muestra B_{ijk}, cuando es seccionada posee subíndices *ijk'* y el super índice *n* corresponde al número de paso de la muestra sobre la hoja de luz, lo que conduce a la toma de una sola imagen 2D. La matriz $D^n_{ijk'}$ representa una sección (paso *n*) de la muestra convolucionada con la PSF^{ef}, a la cual se le toma la máxima proyección en el eje z. 30

21. Convolución plano a plano de la muestra (conjunto **a)**) con la PSF efectiva (conjunto **b)**) , dando como resultado el grupo de imágenes en el conjunto **c)**. Diagrama de la adquisición de una sola imagen 2D a partir de una sección de la muestra iluminada; se elije mismo grosor en z de la muestra y PSF_{ef}, realizando la convolución 2D de cada plano $z = cte$ que conforma el volumen correspondiente. La imagen en **d)** resulta de la proyección del máximo en intensidad en z sobre el grupo de imágenes en c). 31

Figura Página

22. Diagrama de Deconvolución 3D. Se muestra en rombos los dos procesos de cómputo a seguir para la deconvolución en dos pasos. Definimos *q,r,s* la dimensión máxima de las matrices tridimensionales correspondientes a los índices *i,j,k* respecivamente. En el primer paso se selecciona el plano central $PSF^{ef}_{i,j,k=s/2}$ para realizar la deconvolución 2D con cada plano de la muestra distorsionada D_{ijk}, lo que resulta en el arreglo D^{xy}_{ijk}; los súper índices *xy* denotan que se ha realizado la convolución 2D. En el segundo paso se realiza la deconvolución de cada vector axial del arreglo anterior, con el vector central axial de la PSF efectiva. El subíndice k' representa el k-ésimo plano paralelo al plano $z =$ y pertenece a la matriz seccionada con grosor $d_{FWHM-OC}$. 33

23. Simulación numérica del haz de excitación Gaussiano, la PSF del objetivo de colección(sin hoja de luz) y la PSF efectiva (con hoja de luz). Se muestran cortes de los planos principales. 36

24. Trazas de los perfiles de la PSF sin hoja de luz (a) y de la PSF efectiva con hoja de luz Gaussiana (b) 37

25. Simulación numérica del haz de excitación Bessel, la PSF del objetivo de colección (sin hoja de luz) y la PSF efectiva (con hoja de luz). Se muestran cortes de los planos principales. 38

26. Trazas de los perfiles de la PSF sin hoja de luz (a) y de la PSF efectiva con hoja de luz Bessel (b). 39

27. Comparación de perfiles de intensidad a lo largo del eje-x entre una hoja de luz Gaussiana (línea segmentada) y una Bessel (línea sólida). 39

28. Comparación de función de transferencia de modulación (MTF) para el caso sin incluir la iluminación, con iluminación de hoja Gaussiana y hoja Bessel. La primera fila del arreglo muestra que no hay cambio en las frecuencias espaciales f_x y f_y, sin embargo, hay gran diferencia en las frecuencias f_z. Se toman vectores de datos de cada imagen como se muestra en el primer gráfico con línea punteada verde. 41

29. a) Perfiles de MTF bidimensional para un sistema sin hoja de luz, b) perfiles de MTF con hoja de luz. Se muestra la información para los planos principales $f_y - f_z$ y $f_x - f_y$. Las líneas segmentadas se utilizan para hacer la comparación de los perfiles de dispersión plasmados en la figura 28. 42

30. Imagen volumétrica que muestra la deformación de esferas por el proceso de convolución 3D en un sistema con hoja de luz Gaussiano. a) esferas completas; b) esferas partidas a la mitad mostrando el efecto en la intensidad. 44

31. Imagen volumétrica que muestra la deformación de esferas por el proceso de convolución 3D en un sistema con hoja de luz Bessel. a) esferas completas; b) esferas partidas a la mitad mostrando el efecto en la intensidad. 45

Figura Página

32. Comparativa de esferas antes y después del proceso de convolución 3D. **a)** Esferas originales, **b)** esferas distorsionadas por la PSF effectiva de la hoja de luz Gaussiana, **c)** esferas distorsionadas par la PSF con hoja de luz Bessel. 46

33. Comparación de perfiles paralelos a ejes x, y, z. Convolución con PSF efectiva con iluminación de hoja Gaussiana (columna izquierda) y hoja Bessel (columna derecha). Se compara su forma y ancho de perfiles, los cuales son medidos como el FWHM. 47

34. Imagen 3D de las esferas 1, 2 y 3 después del proceso de deconvolución para un sistema de hoja de luz con hoja Gaussiana (Izquierda) y Bessel (Derecha). Las imágenes muestran la mitad de las esferas. 49

35. Comparativa corte 2D de las esferas originales (a) sin deconvolucionar y deconvolucionada para el caso de iluminación con de hoja Gaussiana (b) y el caso de hoja de luz Bessel (c). 50

36. Perfiles de esferas deconvolucionadas paralelos a ejes x, y, z. 52

37. S. macrospora, peritecios a 7 días de crecimiento. Imágenes tomadas por Yryx Luna. . . 53

38. S. macrospora. Imágenes originales adquiridas experimentalmente por Yryx Luna. Se presenta el caso de deconvolución con PSF efectiva con hoja de luz Bessel. 54

Lista de tablas

Tabla Página

1. Condiciones para el campo de entrada a los objetivos de excitación y colección. Los radios externo e interno hacen referencia al círculo de la pupila por la que pasa el campo a propagar, mostrados en la figura 13. 34
2. Anchos FHWM de las PSF a lo largo de los ejes-x, y & z obtenidos de la figura 24 37
3. Anchos FHWM de las PSF a lo largo de los ejes-x, y & z obtenidos en la figura 26 40
4. Frecuencia de corte para los tres casos, obtenida de los gráficos en figura 29. . . . 42
5. Tamaños de esferas originales (antes del proceso de convolución 3D) 43
6. Diámetros de esferas después de la Convolución tridimensional, medidos como FWHM. 48
7. Diámetros de esferas después de la deconvolución tridimensional, medidos como FWHM. 51

Capítulo 1. Introducción

En aquellas técnicas de microscopía de fluorescencia que poseen la capacidad de adquirir imágenes tridimensionales, como son los microscopios confocales y de hoja de luz láser, las imágenes adquiridas, si bien pueden estar dentro o fuera de foco, sufren una ligera degradación; es decir, no reproducen fielmente al objeto bajo observación. Estas imágenes degradadas (o difusas) se producen inevitablemente debido al límite de la resolución óptica (lateral y axial) del dispositivo, producto de la difracción de las lentes del sistema óptico. En otras palabras, las imágenes difusas son el resultado de la respuesta del sistema óptico a una fuente puntual, conocida como función de punto extendido (PSF por sus siglas en inglés) (Goodman, 1996; Song et al., 2005; Chao et al., 2016; Becker et al., 2019), particularmente la del objetivo con el que se forma la imagen. La contribución de la señal de fluorescencia fuera de foco resulta en una pérdida de contraste de las imágenes, siendo más drástica para objetivos de aperturas numéricas grandes. Dado que la formación de la imagen resulta de una convolución del objeto real con la PSF, los métodos inversos, es decir, los métodos de deconvolución (Becker et al., 2019; Zhang et al., 2020b; Biggs, 2010), son empleados para recuperar el objeto y la claridad de las imágenes fuera de foco.

En la práctica, la PSF se obtiene de manera experimental o numéricamente y, para el caso de haces Gaussianos no es más que una función de Airy en 3D, la cual converge en el plano focal formando el patrón de anillos característico y al pasar el plano focal vuelve a divergir. Una vez conocida la PSF tridimensional, cada plano de ésta se deconvoluciona con el respectivo plano de la imagen 3D para reconstruir el objeto real. No obstante, en microscopía de hoja de luz, las imágenes se adquieren ya sea moviendo la hoja a través de la muestra (hoja dinámica) (Zhang et al., 2020b), o bien se barre la muestra manteniendo la hoja de luz fija (hoja estática) (Elisa et al., 2018; Can-Uc et al., 2018; Kafian et al., 2020).

Si bien los métodos de deconvolución 3D son ampliamente utilizados en ambas modalidades, no son los óptimos para el caso estático, ya que en esencia, todas las imágenes de los planos son tomadas justo en el plano focal del patrón Airy. Aunado a esto, la PSF en microscopía de hoja de luz no sólo depende del objetivo de colección, sino también de la iluminación, de manera que la *PSF efectiva* resulta de la multiplicación de la PSF de colección por la forma del haz de excitación. Como consecuencia, es de esperarse que los métodos convencionales de deconvolución, no sean óptimos para la reconstrucción 3D, sobre todo a lo largo de la resolución axial y particularmente para muestras relativamente grandes.

En este contexto, en este trabajo se propone desarrollar una metodología numérica para generar primeramente la simulación de imágenes 3D de esferas distorsionadas por la PSF efectiva, acercándose así a

las imágenes de microsesferas fluorescentes obtenidas experimentalmente y distorsionadas por la PSF del sistema óptico completo. Se pretende deconvolucionar imágenes adquiridas en un sistema de microscopía de hoja de luz láser con iluminación estática, cuyas hojas de luz sean generadas con haces Gaussianos y haces Bessel. En el grupo de miscroscopía avanzada se ha trabajado de manera experimental con estos tipos de iluminación y una motivación para realizar este proyecto es complementar los resultados experimentales obtenidos con resultados numéricos generados en este trabajo.

1.1. Hipótesis

Es posible mejorar la resolución espacial y reducir la distorsión en las imágenes volumétricas obtenidas con microcopía de hoja de luz en la dirección del eje z, considerando la influencia de la iluminación en la obtención de la función de punto extendido (PSF) del sistema óptico, es decir, obtener una PSF efectiva.

1.2. Objetivos

- Modelar las PSF que se obtienen con hojas de luz generadas con haces Bessel y Gaussiano, a diferentes longitudes de onda y con diferentes objetivos de colección.
- Modelar las PSF efectivas en tres dimensiones por haces Bessel y Gaussiano.
- Generar una metodología para la simulación de adquisición de imágenes 2D a partir de una sección volumétrica de la muestra iluminada con hoja de luz estática Gaussiana y Bessel.
- Comprobar la elongación axial de esferas de tamaño micrométrico resultado de la convolución con la PSF efectiva, simulando lo ocurrido al obtener imágenes experimentalmente al mover muestras de microesferas sobre el eje z.
- Emplear un algoritmo de deconvolución para la reconstrucción y mejoramiento de imágenes 3D adquiridas con microscopía con hoja de luz láser.

1.3. Estructura de la tesis

Esta tesis consta de cuatro capítulos y se estructura de la siguiente manera:

El Capítulo 1 presenta la introducción de la tesis, proporciona los antecedentes y la justificación a este trabajo, los objetivos perseguidos, la hipótesis y la manera en la que se estructura la tesis.

El Capítulo 2 contiene los fundamentos teóricos esenciales para comprender este tema de tesis, sus resultados y discusiones. Se presentan los conceptos básicos sobre los haces Bessel y Gaussianos, así como las definiciones generales de la terminología utilizada a lo largo de este trabajo como la función de punto extendido y la función de transferencia modulada. Se explica también, de una forma breve, la teoría escalar de la propagación mediante el formulismo de Huygens-Fresnel en coordenadas cilíndricas utilizada para simular la propagación de las diferentes hojas de luz Gaussiana y Bessel, así como las funciones de punto extendido resultantes en un sistema de hoja de luz láser.

El Capítulo 3 describe la metodología utilizada para el desarrollo de este trabajo. Se explican el método computacional para emular la convolución de microesferas bajo el microscopio de hojas de luz utilizando haces Gaussianos y Bessel. Posteriormente se describe la metodología para la deconvolución en dos pasos sobre el stack de imágenes simulado con distorsión.

El Capítulo 4 presenta los resultados obtenidos y discusiones. Primero se muestran resultados de la simulación de la PSF efectiva en un sistema de microscopio con hoja de luz láser. Se simulan las PSF efectivas resultante de iluminar con hojas de luz Gaussianas y Bessel. Las PSF resultantes se comparan con la PSF sin hoja de luz; es decir, con la PSF clásica de un sistema de microscopio. La información sobre la resolución óptica de estos tres casos, se analizan obteniendo la MTF. Posteriormente, se muestran los resultados de simular la formación de imágenes en el experimento; es decir, se emula el proceso de convolución 3D que ocurre en un microscopio de hoja de luz. Para esto se simulan esferas cercanas al límite de resolución (submicrométricas a unidades de micrómetros) como el objeto en observación. Este proceso explica el origen del porqué se obtienen como resultados experimentales microesferas distorsionadas. Es decir, se verá que el efecto resultante de la convolución del objeto con la PSF efectiva, lleva a una deformación característica que depende de la hoja de luz utilizada. Una vez comprendido el efecto de la convolución utilizando diferentes hojas de luz, se presentan los resultados de la deconvolución 3D. El capítulo concluye mostrando los resultados de la deconvolución en imágenes experimentales utilizando la metodología aquí propuesta.

El Capítulo 5 presenta, finalmente, las conclusiones derivadas de este trabajo.

Capítulo 2. Fundamentos Teóricos

En este capítulo se presentan los fundamentos teóricos esenciales para la comprensión de este tema de tesis, sus resultados y discusiones. Se introduce el arreglo genérico de la microscopía fluorescente de hoja de luz láser, se presentan los conceptos básicos sobre los haces Bessel y Gaussianos, se define en general la terminología utilizada a lo largo de este trabajo, tales como la función de punto extendido y la función de transferencia modulada. Se explica también de una forma breve la teoría escalar de la propagación mediante el formulismo de Huygens-Fresnel en coordenadas cilíndricas utilizada para simular la propagación de las diferentes hojas de luz Gaussiana y Bessel, así como las funciones de punto extendido resultantes en un sistema de hoja de luz láser.

2.1. Microscopía Fluorescente de Hoja de Luz Láser

La microscopía fluorescente con hoja de luz láser (LSFM, por sus siglas en inglés) se esquematiza de manera general con la figura 1 (Olarte et al., 2018). Consiste en iluminar la muestra bajo observación con un haz láser laminar, el cual es referido como una hoja de luz (LS). De esta manera, la fluorescencia resultante del plano iluminado se colecta en dirección perpendicular al eje de iluminación. Como consecuencia, la imagen es proyectada a un detector 2D que corresponde a una sección donde la muestra sólo es iluminada en la región focal.

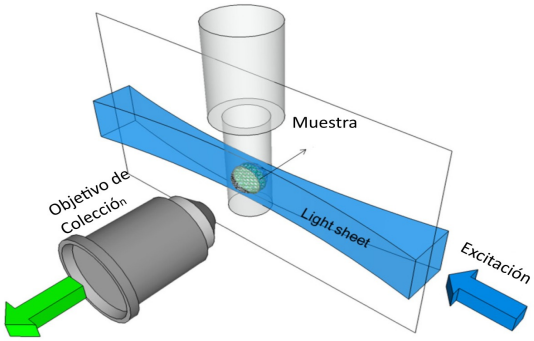

Figura 1. Esquema básico para microscopía de hoja de luz. Imagen modificada de (Olarte et al., 2018).

Debido a que la LSFM se basa en una iluminación plana con la cual se logra un seccionado óptico, se puede decir que compite con la microscopía confocal (Song et al., 2005) de barrido láser (CLSM, por sus siglas en inglés) permitiendo imágenes de volumen pero a escalas de longitud mucho mayor, manteniendo una alta resolución espacial óptica. Las ventajas principales que ofrece la LSFM sobre la CLSM están

la disminución drástica del foto-blanqueo fuera del plano de iluminación y un mayor campo de visión de la imagen. Además, la LSFM ha demostrado ser una herramienta poderosa para estudios in vivo particularmente en muestras grandes como lo son los peces Cebra (Rocha et al., 2019), los embriones de Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans (Olarte et al., 2012), las células tumorales, entre otros. Con lo cual, esta técnica se ha convertido en un método de imagen de elección para un gran número de investigaciones en el área de ciencias de la vida (Huisken et al., 2004). Asimismo, el uso de LSFM combinado con innovaciones recientes para clarificar tejidos y análisis de "big data", ha posibilitado la exploración de cerebros de ratón con resolución celular.

2.2. Haces de luz para microscopía de hoja de luz

Un elemento central en la microscopía de fluorescencia de hoja de luz, es cómo se genera la hoja para excitar la muestra (los fluoróforos que existen dentro) en una sección muy delgada con el fin de reducir la señal que se encuentra fuera de foco. Dicha hoja de luz puede ser generada básicamente de dos maneras. La primera es con el uso de una lente cilíndrica que enfoca la luz para la excitación. Esta forma es comúnmente conocida como microscopía de iluminación de plano selectivo (SPIM por las siglas en inglés) y se esquematiza en la figura 2a (Gao et al., 2014). La segunda forma está basada en el movimiento rápido de un haz enfocado (a través del objetivo de excitación) formando virtualmente una hoja de luz justo en el plano focal del objetivo de colección. Esta técnica es nombrada comúnmente como microscopía de hoja de luz láser digitalmente escaneada (DSLM por las siglas en inglés) y se esquematiza en la figura 2b (Keller et al., 2011).

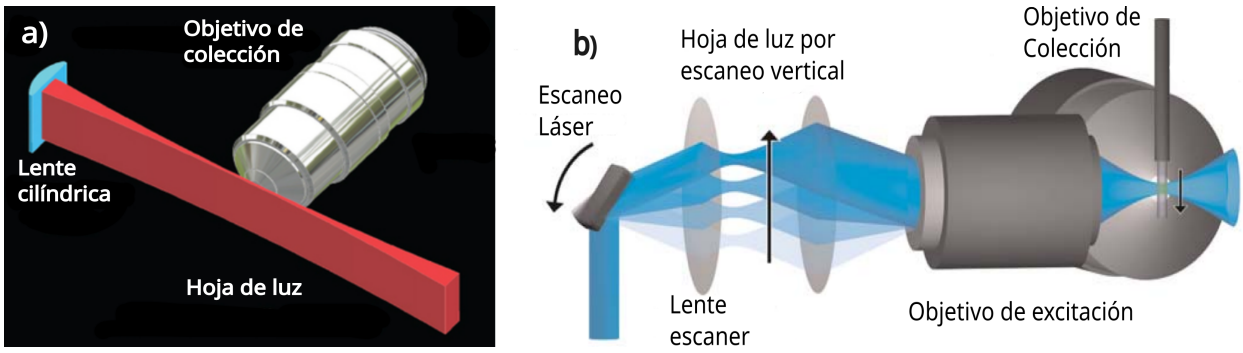

Figura 2. Configuraciones comunes en microscopía LSFM. a) Diagrama de la técnica SPIM. Imagen modificada de (Gao et al., 2014) b)Diagrama de la técnica DSLM. En esta técnica, un espejo galvanométrico oscila verticalmente a la frecuencia de Nyquist formando una hoja de luz. Imagen modificada de (Keller et al., 2011).

En el presente trabajo se tendrá contemplado el sistema DLSM para la formación de la hoja de luz; es

decir, implementando un barrido del haz de excitación. Ya que para simularlo numéricamente, simplemente se replica el haz enfocado en una dirección de manera que forma un plano normal al eje óptico del objetivo de colección. Una gran ventaja de esto es la posibilidad de escoger el tipo de haz para la generación de la hoja de luz, desde haces Gaussianos hasta haces estructurados más sofisticados como haces Bessel o Airy.

Además, como se verá en esta tesis, la simulación de haz con simetría radial enfocado (y no cilíndrica) facilita la estimación del campo de visión (FOV, por las siglas en inglés) y la resolución axial y lateral del sistema LSMF. En este tipo de sistemas el FOV de la imagen es la distancia dentro de la cual el haz de excitación se mantiene enfocado. Es decir, se define en términos de la longitud de Rayleigh, que es la longitud en la que el ancho de la cintura del haz láser se mantiene menor o igual por un factor de $\sqrt{2}$. Ocurre además que la resolución axial de LSFM está relacionada con este ancho que no es más que el ancho de la hoja de luz. Entonces, mientras menor sea el ancho de la hoja, se obtendrá mejor resolución axial (Girkin y Carvalho, 2018). Para obtener una resolución axial uniforme y capacidad de seccionado óptico, el ancho de la hoja de luz debe ser uniforme a través del plano de la muestra que ha de capturarse (Gao et al., 2014).

En el laboratorio de microscopía avanzada de CICESE, se han realizado comparaciones experimentales sobre las cualidades de los haces Gaussianos y Bessel utilizados para la excitación en un sistema LSFM, cualidades como la resolución lateral y axial, el campo de visión y profundidad de campo (Luna-Palacios, 2022). Es por ello que estos temas se abordan de manera general a continuación.

2.2.1. Haz Gaussiano

La amplitud compleja de un haz Gaussiano enfocado (Saleh y Teich, 2019) está dada por la ecuación:

$$U(\vec{r}) = A_0 \frac{W_0}{W(z)} exp\left[-\frac{\rho^2}{W^2(z)}\right] exp\left[-ikz - ik\frac{\rho^2}{2R(z)} + i\phi(z)\right], \tag{1}$$

donde ρ es la componente radial del campo, $W(z)$ es el ancho del haz (medido como $1/e$ de la amplitud del campo), W_0 el semi-ancho (o radio) en la cintura del haz, $R(z)$ conocido como el radio de curvatura del frente de onda del haz Gaussiano. El número de onda en el espacio libre está dado por $k = 2\pi/\lambda$, donde λ es la longitud de onda y $\phi(z)$ es el cambio de fase de Gouy.

Algunas características de los haces Gaussianos que son importantes al abordar el análisis de los resultados en esta tesis son su intensidad, su potencia, el radio que define su ancho espacial, su divergencia y al

profundidad de foco. Características que se definen a continuación:

Intensidad del haz: A partir de la ecuación 1 se puede obtener la intensidad óptica $I(\vec{r}) = |U(\vec{r})|^2$ que es una función de la coordenada axial z y radial $\rho = (x^2 + y^2)^{1/2}$.

$$I(\rho, z) = I_0 \left[\frac{W_0}{W(z)}\right]^2 exp\left[-\frac{2\rho^2}{W^2(z)}\right]. \tag{2}$$

Por lo que para cada valor de z, la intensidad es una función Gaussiana de la distancia radial ρ, con un valor pico en $\rho = 0$ (sobre el eje transversal) que decae de manera monótona al incrementarse ρ. Mientras que sobre el eje de propagación (z) la intensidad tiene un valor máximo en $z = 0$ y decae gradualmente al aumentar z, alcanzando la mitad del valor pico en $z = \pm z_0$; donde z_0 es conocido como el *rango de Rayleigh* (Goodman, 1996).

Potencia: La potencia óptica total transportada por el haz Gaussiano (a cierta distancia z) es la integral de la intensidad óptica sobre el plano transversal del haz y se expresa como $P = \frac{1}{2} I_0 \pi W_0^2$, de donde se puede apreciar que no es más que la mitad de la intensidad pico multiplicado por el área del haz en la cintura.

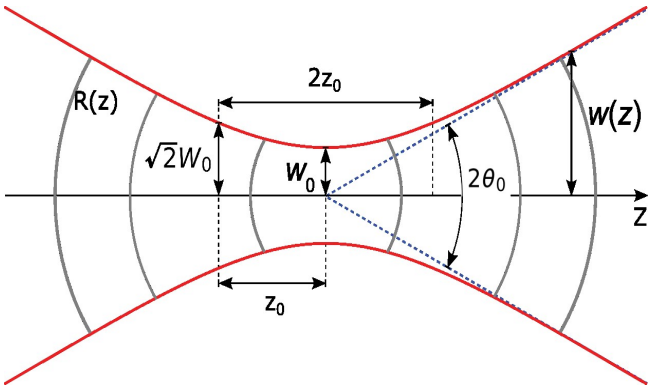

Figura 3. Representación de haz Gaussiano; se muestran parámetros característicos como la cintura del haz W_0, radio de curvatura $R(z)$.

Radio del haz: Observe en la figura 3 que para cada plano transversal la intensidad del haz (denotado por las curvas en gris) alcanza su valor máximo sobre el eje z, y decae a un factor $1/e^2$ a una distancia radial $\rho = W(z)$ (limitado por la línea gris segmentada). Al valor $W(z)$ se le conoce como el radio del

haz y concentra el 86 % de la potencia del haz en "un círculo de radio $W(z)$". Nótese, por otro lado, que el radio del haz alcanza el valor $\sqrt{2}W_0$ en el punto $z = z_0$; es decir, en el *rango de Rayleigh*.

Divergencia del haz: Al alejarse significativamente el haz del plano cental ($z = 0$); es decir, a distancias $z \gg z_0$ (ver figura 3), el radio del haz crece aproximadamente lineal con z, lo que define el cono con ángulo $2\theta_0$. De esta manera, la divergencia angular del haz está definida por el semi-ángulo $\theta_0 = \frac{2}{\pi}\frac{\lambda}{2W_0}$. En suma, si la cintura del haz $2W_0$ es menor, la divergencia del haz es mayor.

Profundidad de foco En un haz Gaussiano el ancho mínimo del haz se encuentra a $z = 0$, de manera que se enfoca mejor en el plano $z = 0$ (ver figura 3). En cualquier otra dirección, el haz crece gradualmente *fuera de foco*. Se conoce así a la *profundidad de foco* a la distancia sobre el eje z dentro de la cual el radio del haz se mantiene menor o igual a un valor a $\sqrt{2}W_0$. Por otro lado, la profundidad de foco es igual a dos veces la distancia de Rayleigh $2z_0 = \frac{2\pi W_0^2}{\lambda}$. Por lo anterior, cuando el haz está enfocado en una mancha pequeña, la profundidad de foco es corta, y el plano focal debe ser localizado con gran precisión.

2.2.2. Haz Bessel

Cualquier campo eléctrico con una longitud de onda λ limitado por un área finita es susceptible a difracción, a medida que se propaga cierta distancia desde el plano origen. Por otro lado, existen en teoría haces llamados *adifraccionales*, es decir, su sección transversal no cambia. Uno de estos haces son los haces Bessel y forman parte de un grupo de funciones propuestas por Durnin en 1987 como soluciones a la ecuación de Helmholz (Durnin et al., 1987). El campo eléctrico de un haz Bessel teórico está dado por

$$E(r, \Phi, z) = A_0 exp(ik_z z) J_n(k_r r) exp(\pm in\Phi), \tag{3}$$

donde A_0 es la amplitud de campo, k_z y k_r son los vectores de onda longitudinal y radial respectivamente; J_n es la función Bessel de orden n, r, Φ y z son las coordenadas radial, azimutal y longitudinal.

Cabe destacar que los modos libres de difracción descritos por las funciones Bessel propuestas por Durnin poseen la propiedad principal de ser bien definidos con radios angostos del haz. Citando textualmente dijo: *La mancha central puede ser extremadamente angosta, del orden de una longitud de onda, sin estar sujeta a dispersión por difracción* (Durnin et al., 1987), de manera que la ecuación 3 representa un haz sin difracción en cada plano normal al eje z. Cuando $n = 0$, J_0 corresponde a la función Bessel

de orden cero del primer tipo y se caracteriza por tener una distribución transversal que presenta un máximo central rodeado por anillos concéntricos. En contraste con un haz Gaussiano, donde el máximo central posee un $86\,\%$ de la energía disponible, la mancha central del haz Bessel contiene un porcentaje bajo de la energía total, mientras que el restante se distribuye entre los anillos concéntricos. Para el caso de haces Bessel de orden mayor ($n > 0$), estos poseen amplitud cero en la región central; por otro lado, el tamaño de la región oscura aumenta a medida que el orden del haz Bessel incrementa.

La solución de Durnin es exacta en espacio libre infinito, de modo que cualquier realización en el laboratorio para tales haces será limitada por una abertura finita. Por otro lado, en un haz Bessel adifraccional, el número de anillos es infinito, además de que el haz se propaga de manera indefinida sin difractarse debido a que hay una transferencia continua de energía desde los anillos hacia el centro, a lo largo del eje de propagación. No obstante, se debe enfatizar que experimentalmente esto no es posible, ya que de manera transversal no es posible crear un haz con extensión infinita, y en consecuencia hay una disminución en el intervalo en que el haz se mantiene libre de difracción.

De acuerdo con lo anterior, los métodos experimentales pueden generar haces con una propagación "adifraccional" limitada. No obstante, los haces Bessel poseen propiedades como autoreconstrucción, que permite su regeneración después de alguna obstrucción colocada en el camino de la propagación, tal propiedad es de gran interés para la iluminación en microscopía de hoja de luz.

2.2.3. Generación de haces Bessel

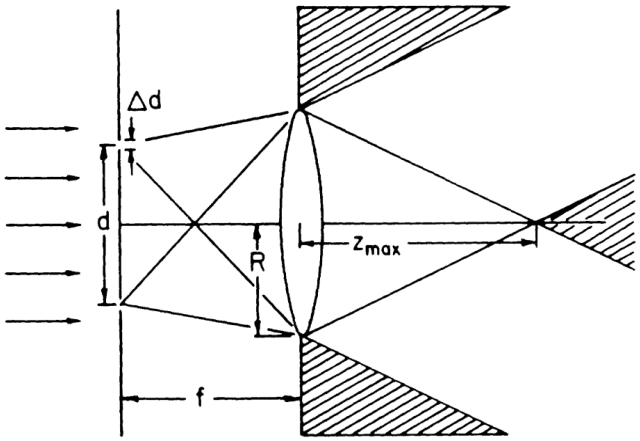

Figura 4. Diagrama experimental para generación de haz Bessel J_0. Imagen obtenida de (Durnin et al., 1987).

Existen diferentes métodos experimentales para la generación de haces Bessel. Basados en la relativa sencillez de implementación, se puede decir que hay dos métodos principales para la generar haces Bes-

sel en el laboratorio: el primer método utiliza una abertura anular y una lente esférica, mientras que el segundo método emplea una lente cónica llamada axicon.

El primer método es descrito en (Durnin et al., 1987) y resulta poco eficiente, ya que la mayor parte de la luz inicial es absorbida o bloqueada por la abertura. Tal abertura anular posee un diámetro d y un ancho Δd, que se localiza a la distancia focal f de la lente con radio R (ver figura 4) donde la máxima distancia de propagación está dada por $z_{max} = R/tan\theta$, con el ángulo $\theta = tan^{-1}(d/2f)$.

En este caso, los frentes de onda esféricos provenientes de la abertura anular son colimados por la lente. Tales haces interfieren de manera que se obtiene un haz Bessel adifraccional, a lo largo de la distancia de propagación en que los frentes de onda se traslapan. La figura 5 ejemplifica este proceso de formación de haz Bessel con una simulación tomada de (Čižmár y Dholakia, 2009). Nótese que la distribución de intensidad, representado por la traza amarilla a lo largo de la propagación, no es constante y que por lo tanto el haz Bessel tiene una profundidad de campo limitada que bien puede ser definida por algún criterio de intensidad (1/e o FHWM).

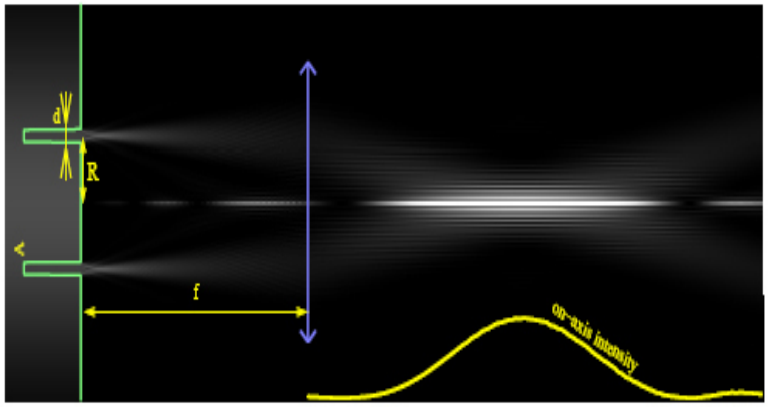

Figura 5. Se muestra la sección lateral del haz Bessel generado con una abertura anular y lente. Imagen de simulación, obtenida de (Čižmár y Dholakia, 2009).

2.3. Teoría escalar de propagación

Partiendo del principio enunciado por Christian Huygens en el siglo XVII con su estudio cualitativo de la luz (Huygens, 1885), Fresnel describe más tarde el fenómeno de manera matemática a principios

del siglo XIX (Fresnel, 1819; Huygens et al., 1900). Concretamente, Fresnel realizó una síntesis de los conceptos de Huygens sobre la descripción de ondas y principio de interferencia en donde el modo de propagación de una onda primaria es vista como una sucesión de frentes de onda esféricos secundarios, los cuales se superponen e interfieren para generar la onda primaria que avanza como aparecería un instante después. Citando a Fresnel, *" Las vibraciones de una onda lumínica en cualquiera de sus puntos puede ser considerada como la suma de los movimientos elementales que se le transmiten al mismo tiempo, de la acción separada de todas las porciones de la onda no obstruida consideradas en cualquiera de sus posiciones anteriores"*. Fresnel fue capaz de calcular los patrones de difracción que surgen de varios obstáculos y aberturas y tuvo en cuenta la propagación rectilínea en medios isotrópicos homogéneos.

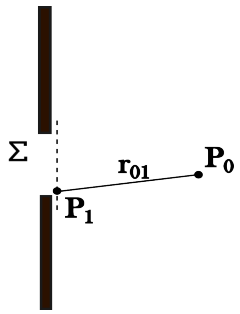

Figura 6. Difracción por una pantalla plana. Σ representa la abertura, y P_0 el punto de observación, r_{01} la distancia entre los puntos P_0 y P_1.

La descripción de Huygens-Fresnel, permite realizar un análisis al fenómeno de difracción de un frente de onda. En este fenómeno se considera cierta abertura con la cual se encuentra cierto frente de onda, de manera que para conocer la evolución del sistema se puede visualizar al campo en el punto $\vec{P_0}$ como el resultado de la superposición del campo de un número infinito de puntos que conforman el frente de onda en la abertura. Las fuentes secundarias tendrán amplitud y fase, descritas por $U'(\vec{P_1})$, que están relacionadas con el frente de onda de iluminación y los ángulos de iluminación y observación (Goodman, 1996, p.46).

Lo anteriormente descrito, se puede plasmar en la ecuación siguiente:

$$U(\vec{P_0}) = \int\int_{\Sigma} U'(\vec{P_1}) \frac{exp(ikr_{01})}{r_{01}} ds, \tag{4}$$

donde Σ representa la superficie de la abertura, k el vector de onda ($k = 2\pi/\lambda$) y r_{01} representa la distancia entre los puntos en el espacio $\vec{P_0}$ y $\vec{P_1}$.

La ecuación 4 expresa el campo observado $U(\vec{P}_0)$ como una superposición de ondas esféricas divergentes $exp(ikr_{01})/r_{01}$ que se origina de fuentes secundarias localizadas en cada punto $\vec{P}_1$ dentro de la abertura Σ (figura 6).

Para enfatizar esta perspectiva en la descripción del principio de Huygens-Fresnel es útil reescribir como sigue

$$U(\vec{P}_0) = \int\int_{\Sigma} h(\vec{P}_0, \vec{P}_1) U'(\vec{P}_1) ds, \tag{5}$$

donde la función de respuesta al impulso $h(\vec{P}_0, \vec{P}_1)$ está dado explícitamente por

$$h(\vec{P}_0, \vec{P}_1) = \frac{1}{i\lambda} \frac{exp(ikr_{01})}{r_{01}} cos\theta. \tag{6}$$

En la interpretación del principio de Huygens-Fresnel se menciona a cada punto sobre una abertura como una nueva fuente puntual de onda esférica, sin embargo otra interpretación puede tener mayor sigfinicado físico.

Thomas Young expresó este otro punto de vista, en el cual el campo observado es el resultado de la superposición de la onda incidente transmitida a través de la abertura sin perturbaciones, y una onda difractada que se origina en el borde de la abertura (Goodman, 1996).

2.4. Propagación en régimen de Huygens-Fresnel

2.4.1. Espectro angular

En la teoría escalar de difracción es posible tener una descripción desde el marco de sistemas lineales invariantes. Si la distribución del campo complejo de una perturbación monocromática es analizado en el espacio de Fourier para cualquier plano, las componentes de Fourier pueden ser identificadas como ondas planas que viajan en distintas direcciones desde este plano inicial. La amplitud del campo en cualquier otro punto se puede calcular al sumar las contribuciones de estas ondas planas, tomando en cuenta el desfase que ocurre durante la propagación (Goodman, 1996).

A esta descomposición de un campo en sus componentes espectrales se le conoce como análisis del espectro angular y se puede representar por la siguiente ecuación

$$A\left(\frac{\alpha}{\lambda},\frac{\beta}{\lambda};z\right)=\int\int_{-\infty}^{\infty}U(x,y,z)exp\left[-i2\pi\left(\frac{\alpha}{\lambda}x+\frac{\beta}{\lambda}y\right)\right]dxdy, \tag{7}$$

donde α y β son cosenos directores de las ondas planas que componen el campo y se relacionan con las frecuencias espaciales por medio del número de onda, en la forma $\alpha=\lambda f_X$, $\beta=\lambda f_Y$.

Si se toma en cuenta el campo de ondas que viajan cierta distancia z, el efecto de la propagación sobre esta distancia z es simplemente un cambio de las fases relativas de las componentes del espectro angular. Finalmente, el campo observado en un plano paralelo al plano de inicio en una posición (x,y,z) puede ser descrito en términos del espectro angular inicial al usar la transformada inversa de Fourier.

$$U(x,y,z)=\int\int_{-\infty}^{\infty}A\left(\frac{\alpha}{\lambda},\frac{\beta}{\lambda};0\right)e^{\left(i\frac{2\pi}{\lambda}\sqrt{1-\alpha^2-\beta^2}z\right)}e^{-i2\pi\left(\frac{\alpha}{\lambda}x+\frac{\beta}{\lambda}y\right)}\frac{d\alpha}{d\lambda}\frac{d\beta}{d\lambda}, \tag{8}$$

donde $A\left(\frac{\alpha}{\lambda},\frac{\beta}{\lambda};0\right)$ representa el espectro angular del campo al en el plano de entrada, el cual ya contempla máscaras de fase o elementos ópticos que tengan influencia sobre un campo justo antes del plano $z=0$.

2.4.2. Propagación en coordenadas cilíndricas

Las ecuaciones presentadas en la sección 2.4.1 pueden ser simplificadas si el campo con el que se trabaja posee simetría radial. Esto desde el punto de vista de cómputo numérico aporta ventajas en costo computacional. Si se trabaja en un sistema de coordenadas cilíndricas, es posible realizar cambios de variable que permitan simplificar la integral de propagación de Huygens-Fresnel y pasar de doble integral a una integral en una dimensión (figura 7, sin perder la validez de obtener así un campo en $\mathbb{R}^3$.

A partir de la ecuación de Huygens-Fresnel en coordenadas cartesianas

$$U(x,y,z)\simeq\frac{-ie^{ikz}e^{\frac{ik(x^2+y^2)}{2z}}}{\lambda z}\int\int U(x_0,y_0,z=0)e^{\frac{ik(x_0^2+y_0^2)}{2z}}e^{\frac{-ik(xx_0+yy_0)}{z}}dx_0dy_0, \tag{9}$$

donde $U(x_0,y_0,z=0)$ representa el campo en el plano de inicio y $U(x,y,z)$ el campo complejo propagado después de una distancia z.

Tomando en cuenta que el campo inicial posee simetría radial, al realizarse un cambio de coordenadas cartesianas al sistema de coordenadas cilíndrico, entonces la ecuación 9 toma la forma

$$U(\rho,z) \simeq \frac{-ie^{ikz}e^{\frac{ik(\rho^2)}{2z}}}{\lambda z}\int_0^{2\pi} d\psi_0 \int_A U(\rho_0, z=0)e^{\frac{ik(\rho_0^2)}{2z}} e^{\frac{-ik[\rho\rho_0 cos\psi cos\psi_0 + \rho\rho_0 sin\psi sin\psi_0]}{z}}\rho_0 d\rho_0, \qquad (10)$$

Esta transformación de coordenadas sobre la ecuación se encuentra ya desarrollada en la bibliografía (Goodman, 1996; Becker et al., 2019), y donde se usa la identidad trigonométrica $\rho\rho_0 cos\psi cos\psi_0 + \rho\rho_0 sin\psi sin\psi_0 = \rho\rho_0 cos(\psi_0 - \psi)$. Por otro lado, la integral sobre la variable ψ_0 puede ser reescrita con el uso de la función Bessel de orden cero

$$\int_0^{2\pi} e^{\frac{-ik\rho\rho_0 cos(\psi_0-\psi)}{z}} = 2\pi J_0\left(\frac{k\rho\rho_0}{z}\right), \qquad (11)$$

donde la variable ρ_0 representa la distancia radial en coordenadas cilíndricas del plano de inicio y z la distancia entre los planos de inicio y plano resultante de la propagación. La variable ρ representa la distancia radial en el plano final.

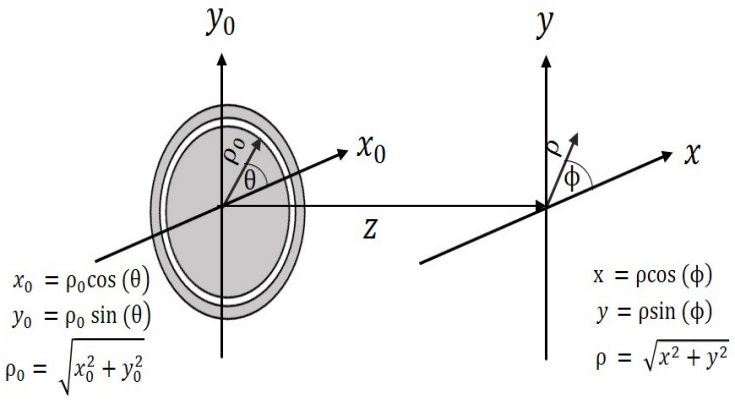

Figura 7. Debido a la simetría rotacional del problema planteado en este trabajo, es conveniente hacer cambio a coordenadas cilíndricas. Imagen tomada de (Luna-Palacios, 2022))

Haciendo uso de las identidades anteriores, la ecuación de Huygens-Fresnel en coordenadas cilíndricas (Becker et al., 2019) para un campo inicial con simetría radial toma la forma

$$U(\rho,z) \simeq \frac{-2\pi ie^{ikz}e^{\frac{ik\rho^2}{2z}}}{\lambda z}\int_{abertura} \rho_0 U(\rho_0, z=0)e^{\frac{ik\rho_0^2}{2z}} J_0\left(\frac{ik\rho\rho_0}{z}\right) d\rho_0, \qquad (12)$$

donde se logra reducir una integral doble a una integral en una sola dimensión. Esto representa una ventaja en términos de cálculo numérico debido a que reduce enormemente el costo computacional.

La ecuación 12 permite calcular propagación de campo eléctrico en el régimen escalar y ha sido de gran ventaja a comparación de su forma en coordenadas cartesianas.

Se usa la ecuación anterior para la propagación de los haces simulados en este trabajo, donde además, se realiza la simulación del objetivo de microscopio pensando en una lente delgada. De esta manera, se agrega el término de la fase de lente delgada

$$U(\rho,z) \simeq \frac{-2\pi i e^{ikz} e^{\frac{ik\rho^2}{2z}}}{\lambda z} \int_{abertura} \rho_0 U(\rho_0, z=0) e^{\frac{ik\rho_0^2}{2z}} e^{\frac{ik\rho_0^2}{2f}} J_0\left(\frac{ik\rho\rho_0}{z}\right) d\rho_0. \tag{13}$$

2.5. Sistemas Ópticos Formadores de Imágenes

Como ya se ha mencionado a lo largo de esta tesis, el desempeño de un sistema de imágenes puede ser cuantificado a través de su función de respuesta al impulso, PSF. Por un lado, la PSF puede dar origen a las diferencias o deformaciones de una imagen, dependido de las caracterísitcas de ella. Por otro lado, define la habilidad de resolver objetos muy pequeños, del orden de la longitud de onda con la que se ilumina; es decir, define el límite de resolución de un sistema óptico, lo cual se conoce también como límite de difracción. La PSF es una función del espacio coordenado (x, y, z) y resulta del análisis de la difracción de la luz en un sistema óptico formador de imagen como se realiza a continuación.

2.5.1. Función de respuesta al impulso

En un sistema formador de imágenes, la función de punto extendido de una lente puede medirse con el ancho transversal de la imagen de una fuente puntual perfecta, proyectada en el plano del detector. En otras palabras, la PSF describe la respuesta de un sistema de imagen a una fuente puntual (punto objeto) esquematizado en la figura 8. Tal respuesta al impulso, matemáticamente corresponde a la amplitud compleja denotada por $h(u, v; \zeta, \eta)$.

Ahora bien, según la teoría de Abbe (1873), en el proceso de formación de la imagen de dicha fuente puntual, cierta porción de las componentes difractadas de la amplitud $U_o(\zeta, \eta)$ transmitida a través de una abertura u objeto O (ver figura 8) son interceptadas por la pupila de entrada de la lente. De manera similar, según Lord Rayleigh (1896), el campo final $U_i(v, u)$ que llega al plano imagen resulta de los efectos de difracción de la pupila de salida $P(x, y)$.

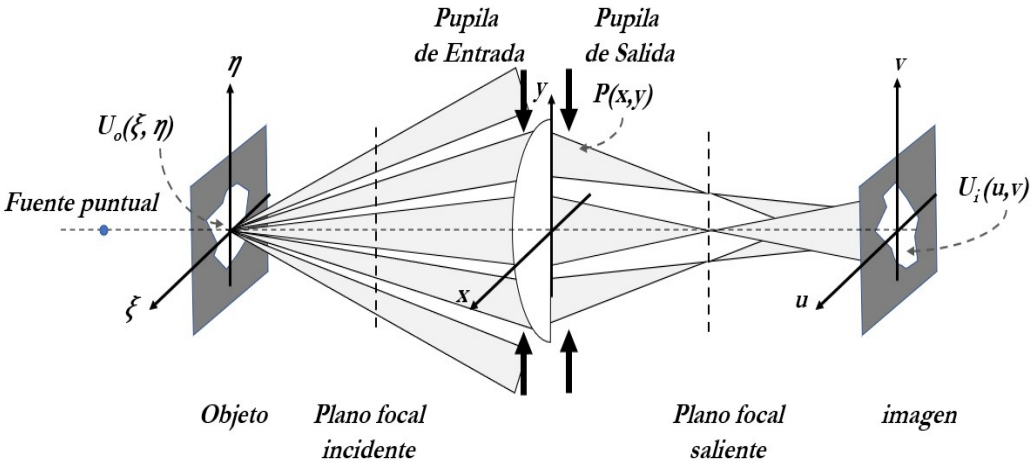

Figura 8. Sistema formador de imágenes en la teoría de Abbe.

El desarrollo matemático de la amplitud $U_i(v,u)$ del campo proyectado en el plano imagen se describe en detalle en (Goodman, 1996) dando como resultado final

$$U_i(u,v) = \int_{-\infty}^{\infty} \int h(u-\zeta, v-\eta) U_g(\zeta,\eta) d\zeta d\eta. \tag{14}$$

En otras palabras, la ecuación 14 establece que, para un sistema limitado por difracción, la amplitud de la imagen $U_i(u,v)$ de una fuente puntual con amplitud $U_o(\zeta,\eta)$ es la convolución de la imagen predicha por la óptica geométrica $U_g(\zeta,\eta)$; es decir, la amplitud $U_o(\zeta,\eta)$ escalada por el factor de magnificación M que introduce la lente, y la función de respuesta al impulso $h(u,v)$. Donde la imagen predicha por la óptica geométrica está dada por

$$U_g(\zeta,\eta) = \frac{1}{|M|} U_o\left(\frac{\zeta}{M}, \frac{\eta}{M}\right). \tag{15}$$

Mientras que la función de respuesta al impulso está dada por

$$h(u,v) = \frac{1}{\lambda^2 z_i^2} \int_{-\infty}^{\infty} \int P(x,y) exp\left\{-i\frac{2\pi}{\lambda z_i}(ux+vy)\right\} dxdy. \tag{16}$$

Es decir, la función de respuesta al impulso $h(u,v)$ en un sistema óptico es proporcional a la difracción de Fraunhofer de la pupila de salida de la lente. Nótese que la ecuación 9 es esta misma ecuación sólo que se considera allí explícitamente a la pupila de salida como la distribución del campo a propagar.

2.5.2. Sistemas coherentes e incoherentes

En microscopía, la formación de imágenes puede ser coherente o incoherente. En el primer caso, las amplitudes de cada onda que emanan del plano objeto se suman en amplitud luego de interactuar con la amplitud de la PSF del sistema. En contraste, en el segundo caso la intensidades de cada onda es la que se suma en el plano imagen luego de interactuar con la intensidad de la PSF. Ejemplos de imágenes coherentes en microscopía pueden ser los obtenidos mediante la generación de segundo armónico y suma de frecuencias, procesos Raman inducidos de manera coherente y efectos plasmónicos, por mencionar algunos. En contraste, dado que la fluorescencia es un proceso incoherente, aquellas técnicas de microscopia basados en la fluorescencia forman imágenes incoherentes. En cualquiera de los casos, coherente e incoherente, la formación de imágenes son descritas por teorías de sistemas lineales.

Para el caso coherente la intensidad de la imagen no es más que el módulo al cuadrado de la ecuación 14 denotada por

$$I_i(u,v) = \left| \int_{-\infty}^{\infty} \int h(u-\zeta, v-\eta) U_g(\zeta,\eta) d\zeta d\eta \right|^2 . \tag{17}$$

En contraste, para el caso incoherente, la imagen resulta de la convolución del módulo cuadrado de la función de respuesta al impulso en intensidad $|h|^2$ con la intensidad de la imagen predicha por la óptica geométrica I_g.

$$I_i(u,v) = \kappa \int_{-\infty}^{\infty} \int |h(u-\zeta, v-\eta)|^2 I_g(\zeta,\eta) d\zeta d\eta. \tag{18}$$

Dado que la imagen en un sistema de microscopía de hoja de luz láser es incoherente, su PSF está dada por una función de respuesta, resultante de multiplicar el módulo de función de respuesta al impulso en amplitud $|h|^2$ del objetivo de microscopio y la iluminación de la hoja de luz I_{hoja}; es decir, en la ecuación 18 el módulo al cuadrado $|h|^2$ se sustituye por $|h_{eff}|^2 = |h|^2 \cdot I_{hoja}$. Entonces, para efectos de esta tesis al decir "la PSF del sistema" en realidad se refiere a la $PSF_{eff} = |h_{ef}|^2$.

2.5.3. Resolución óptica

Dado que la PSF está dada por la transformada de Fourier del campo de entrada al sistema, que en este caso está limitado por una pupila y pasa por una lente (ecuación 16); si se considera entonces una lente esférica, libre de aberración y la función pupila es uniforme, puede demostrarse que la función de respuesta al impulso en la aproximación paraxial tiene la forma de una función de Airy $h(r) = \frac{2J_1(\nu)}{\nu}$, con la función $J_1(\nu)$ como la función Bessel de primer orden como se muestra en la figura 9a). Una

forma de medir la *la resolución* de un microscopio óptico estándar es midiendo el ancho de esta función, puesto que representa la imagen de una fuente puntual infinitesimal. Para el caso coherente, se considera el módulo cuadrado de la función de respuesta al impulso sobre $|h(r)|^2$, con lo cual, el ancho resultante se mide como el ancho completo a la mitad del máximo de intensidad (FWHM) del lóbulo principal de la función de Airy. Este ancho resulta en la siguiente expresión:

$$d_r = \frac{0.51\lambda}{nsin\theta_0} = \frac{0.51\lambda}{N.A.} \tag{19}$$

En resumen, el ancho de la PSF está relacionado con la resolución del sistema. Una PSF "más ancha" conlleva a una imagen más distorsionada debido al proceso de convolución. Esto nos lleva a considerar el análisis de la PSF del sistema en 3 dimensiones para conocer la resolución en las tres direcciones del espacio.

2.5.4. Función de Transferencia Modulada

Es conveniente hacer un análisis en frecuencia de los sistemas ópticos formadores de imágenes, en el caso incoherente, para ver el comportamiento espectral del sistema óptico, por lo que es necesario hacer uso de la óptica de Fourier. Para pasar la intensidad del campo incoherente (ecuación 18),al espacio de frecuencias, se puede utilizar la siguiente notación para la convolución:

$$I_i = PSF_{ef} * I_g \tag{20}$$

para obtener su transformada de Fourier llegando a la siguiente expresión en el dominio de frecuencias:

$$G_i(f_x, f_y) = H(f_x, f_y)G_o(f_x, f_y) \tag{21}$$

donde G_i, G_o, y H son las transformadas de Fourier de I_i, PSF_{ef} y I_g, respectivamente.

A la transformada H se le conoce como la función de transferencia de óptica (OTF por sus siglas en inglés); mientras que a su módulo al cuadrado $|H|^2$ se le denomina la función de tranferencia modulada (MTF, por sus siglas en inglés). Dicha MTF es la herramienta matemática utilizada para calcular el contraste y el poder de resolución, señalando tanto la nitidez como la calidad de una imagen. Una manera más completa para definir la resolución óptica de un sistema es usar el dominio de la frecuencia espacial mediante la MTF. Es más completa ya que también da información del contraste para cada

frecuencia espacial que soporta el sistema óptico a través de la magnitud de la MTF. Mientras que la resolución del sistema se define cuando dicha magnitud decae por debajo de un determinado valor (Boreman, 2001). Para valores del $10\,\%$ de la intensidad máxima de la MTF se consideran que el sistema ya no es capaz de resolver dicha frecuencia. La figura 9b) muestra un gráfico típico de la MTF. Se puede apreciar que para valores mayores de la frecuencia el contraste de las franjas va disminuyendo hasta llegar a un valor en que ya no es posible distinguirlas; es en este punto donde ya el sistema no puede resolver las frecuencias y se ha llegado al límite de difracción óptica o límite de resolución.

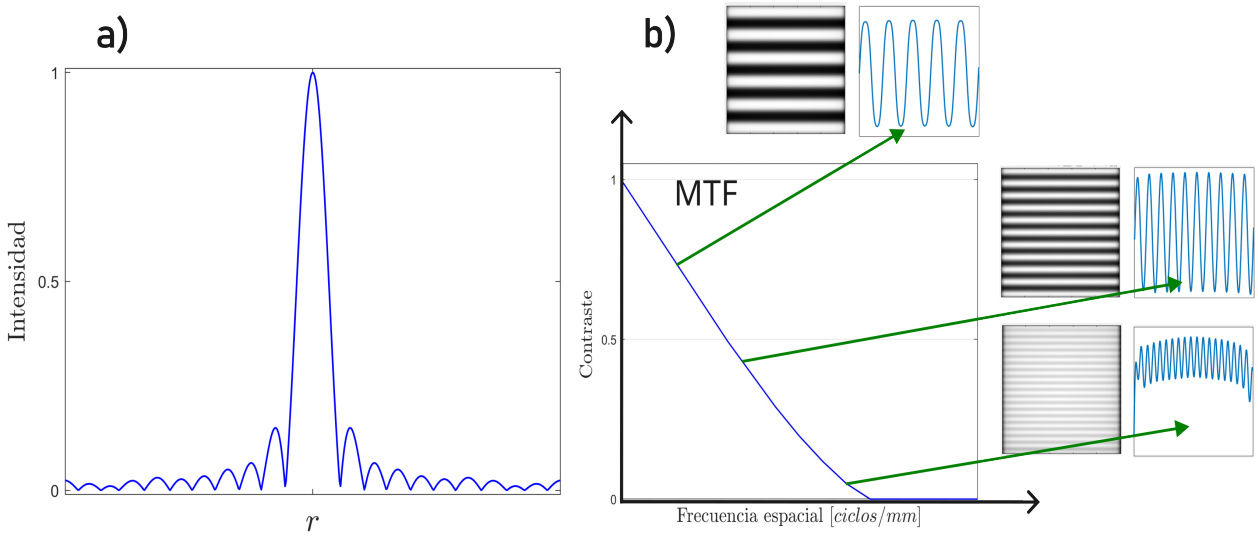

Figura 9. a) Perfil de un ejemplo de función de punto extendido $|h|$, resultado un haz que pasa por una pupila circular. b) Función de transferencia de modulación que muestra el cambio en el contraste y en las imágenes de franjas convolucionadas con la PSF mostrada en a). A medida que las franjas son más cerradas, la imagen tendrá menor contraste debido a la resolución máxima del sistema.

Capítulo 3. Metodología

En esta sección se describe la metodología empleada para simular la adquisición de imágenes por un sistema de microscopía de hoja de luz usando un haz de excitación Gaussiano o Bessel. Se inicia con una breve descripción de la configuración experimental que se utiliza en el laboratorio. Esto con el fin de establecer el espacio tridimensional y los correspondientes planos de observación que se analizarán en los resultados. Posteriormente, se muestra la metodología para la simulación de la propagación de los haces Gaussiano y Bessel a través de un objetivo de microscopio y su respectiva PSF. Posteriormente se muestra cómo calcular la PSF efectiva y MTF. También se explica la metodología para simular la adquisición de imágenes de micro-esferas fluorescentes de diferentes tamaños, y por último, la metodología propuesta para la deconvolución 3D.

3.1. Configuración experimental

Las simulaciones en este trabajo se basan en el arreglo experimental mostrado en la figura 10, la cual corresponde al diagrama de hoja de luz láser implementado en el laboratorio de microscopía avanzada del CICESE (Luna-Palacios, 2022). Se simula la propagación de la luz láser luego de incidir en el objetivo de excitación (OE) para formar la hoja de luz (Bessel o Gaussiana) en el plano focal del objetivo de colección (OC). Además de simular la función de punto extendido PSF del sistema que observaría este segundo objetivo.

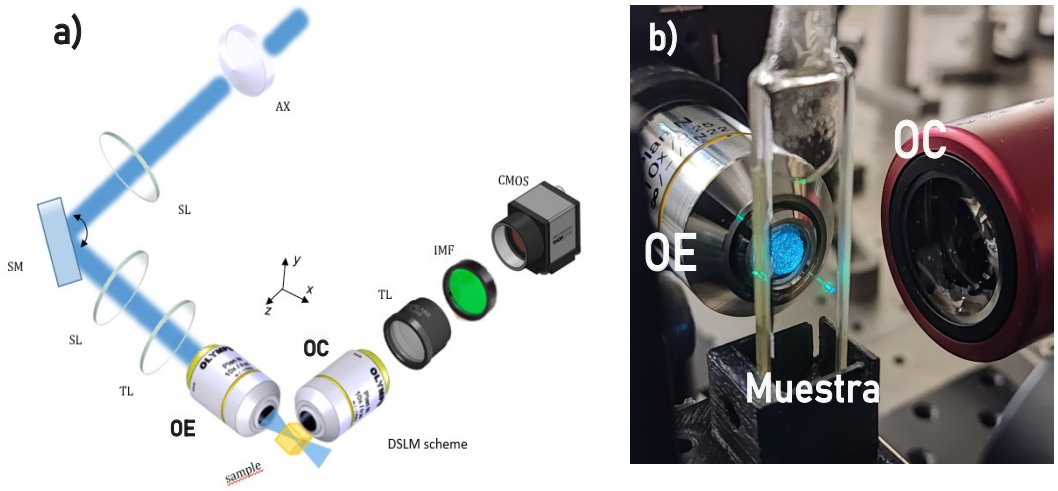

Figura 10. a) Configuración experimental para microscopía de hoja luz por escaneo digital, imagen modificada de (Luna-Palacios, 2022). b) disposición de objetivos de microscopio para excitación y colección; colocados perpendicularmente entre sí. Se toma el eje Z como la dirección en que se colecta la luz.

En la figura 10a se puede apreciar un sistema coordenado (x, y, z) donde el eje óptico del OE coincide

con el eje x, mientras que el del OC coincide con el eje z. Un sistema de espejos, SM escanea el haz enfocado hacia arriba y abajo en el plano xy, de manera tal que la hoja de luz formada yace en el plano focal del OC. Vale la pena detenerse un momento y entender qué se observa en cada uno de los tres planos principales xy, yz y xz. El plano xy, ademas de contener la hoja de luz, representa la perspectiva que se tiene desde el objetivo de colección; es decir, lo que se ve a través del microscopio. Por su parte, el plano yz muestra la perspectiva que se tendría desde el objetivo de excitación. Mientras que el plano xz representa una "vista aérea". La figura 10b muestra una fotografía del sistema en esta zona específica.

3.2. Esquema general de la convolución 3D

La Figura 11 presenta un esquema, en forma de diagrama de flujo, que explica de manera general la metodología para simular para el proceso de convolución 3D que se utiliza en el presente trabajo. Primero, se simula por un lado y de forma independiente, la propagación del haz que generará la hoja de luz dando como resultando en una distribución de intensidad $I_{ijk}^{hojaLuz}$. Por otro lado, se simula la función de punto extendido del OC denotada por PSF_{ijk}^{OC}. Los subíndices ijk representan la entrada del elemento de matriz tridimensional; tanto el haz correspondiente a la PSF de colección como la iluminación son calculadas y guardadas en matrices de tres dimensiones, que más adelante pueden ser analizadas como planos por separado en distintas direcciones. Posterior al cálculo de cada haz, se obtiene la PSF efectiva del sistema mediante la multiplicación elemento a elemento de ambas matrices; esto es, $(PSF_{ijk}^{eff} = PSF_{ijk}^{OC} \cdot I_{ijk}^{hojaLuz})$.

Puesto que en la práctica el ancho de la hoja de luz no es infinitesimal, los objetos de tamaño menor que yacen en diferentes profundidades dentro de la hoja serán vistos como si estuviesen en un mismo plano perdiéndose entonces información de la profundidad. Lo anterior deberá ser analizado sobre el ancho de la hoja de luz, además de la profundidad de campo del objetivo de colección. Ambos parámetros tendrán influencia en los objetos que son registrados "en foco" en el plano imagen. Para considerar estos efectos, primero se segmenta (se modula) la PSF_{ijk}^{ef} del sistema a lo largo del eje axial (eje-z) con la distancia de la profundidad de campo d_{FWHM}, lo que da como resultado una PSF efectiva segmentada con nueva dimensión en z representada por el subíndice k' (de manera que $k' < k$). Paralelamente se realiza la simulación de un volumen con las mismas dimensiones que la PSF efectiva que contiene microesferas B_{ijk}. Posteriormente se maneja cada matriz 3D como una colección de planos paralelos y perpendiculares al eje z para simular la adquisición de imágenes y barrido de la muestra sobre la hoja de luz.

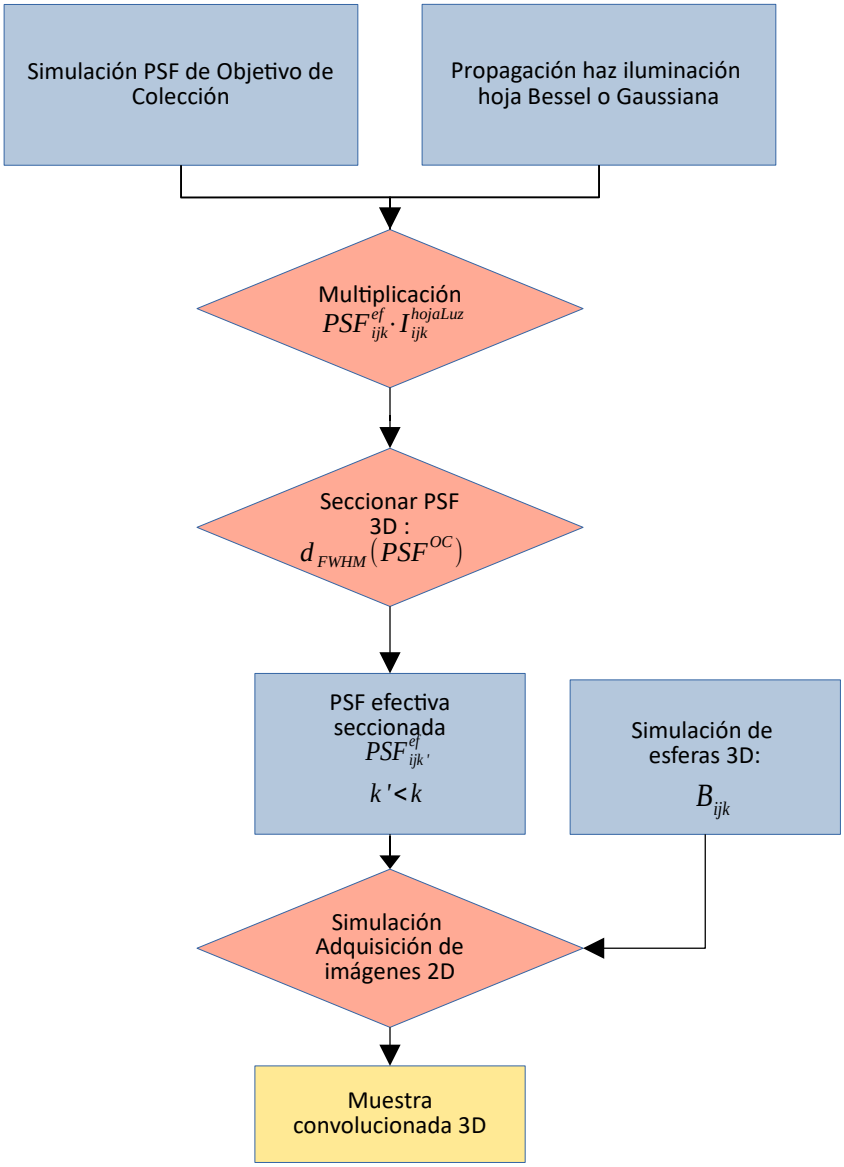

Figura 11. Diagrama de flujo que describe la metodología general para simular el proceso de convolución tridimensional

3.3. Propagación de haces

La metodología de propagación de haces consiste en el cálculo numérico de la intensidad del campo en planos paralelos, transversales a la propagación, que se encuentran a cierta distancia z del plano inicial, tomando la geometría del campo a propagar. Las distancias requeridas para propagar los haces están relacionadas con las distancias de trabajo de los objetivos de microscopio utilizados en el experimento y que pueden ir de 4mm a 30 mm, según la distancia focal. Tomando en cuenta que estas son distancias

relativamente cortas para simular una propagación de haces respecto a la dimensión del campo inicial, y mucho mayor a las longitudes de onda óptica, se propuso una manera en la que se aprovechan mejor los recursos de hardware y se disminuye el costo computacional (Zhang et al., 2020a) en cada simulación. Es así que se utilizan campos con simetría radial, lo cual hace posible el muestreo requerido en estas simulaciones que es del orden de décimas de micras por pixel.

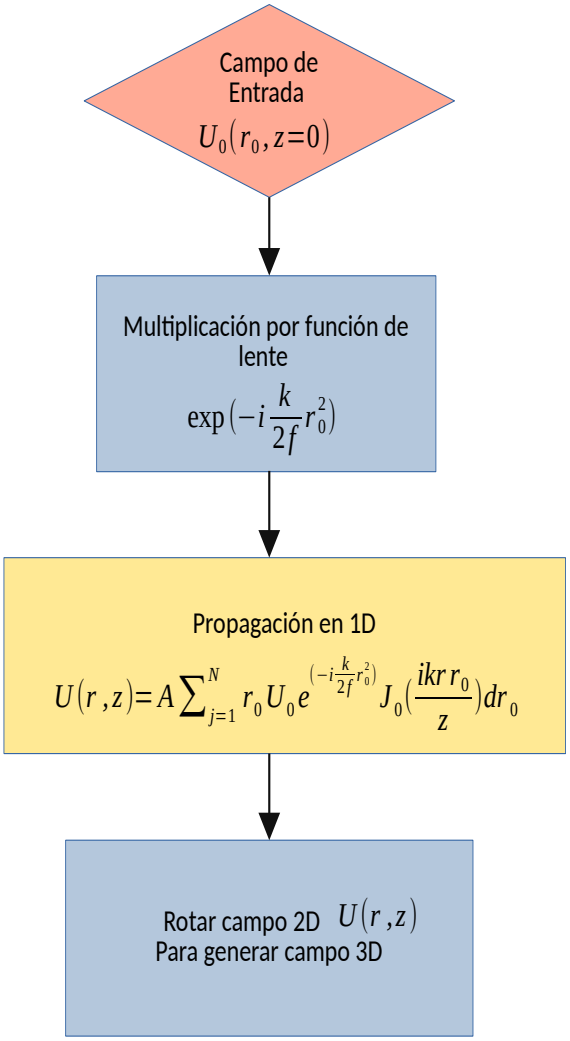

Figura 12. Diagrama de flujo para el algoritmo de propagación de haces. Se usa la ecuación de Huygens-Fresnel en coordenadas cilíndricas por sus grandes ventajas computacionales.

Usando la ecuación de propagación de Huygens-Fresnel en coordenadas cilíndricas (ecuación 13) es posible calcular la propagación para los haces en la iluminación y la colección. La forma del campo inicial dependerá de la forma del haz que se desea (Bessel o Gaussiano) y seguirá el proceso plasmado en el diagrama de flujo de la figura 12. Donde el campo inicial se define inicialmente, pudiendo ser Bessel o Gaussiano, luego se multiplica por la función de fase de una lente delgada (objetivo de microscopio).

Posteriormente, se calcula el campo en un sólo vector del campo radial $U(r,z)$ de 0 a r, con $r = \sqrt{x^2+y^2)}$ como el semi-ancho del haz en el plano xy. Finalmente, debido a la simetría radial, el vector del campo se rota azimutalmente para obtener el campo $U(x,y)$ en determinado plano a una distancia z para luego reconstruir el campo tridimencional $U(x,y,z)$.

En general, los campos a simular corresponden a aquellos campos que viajan a través de los dos objetivos utilizados en un microscopio de hoja de luz láser. El haz que se forma luego de pasar por el objetivo de colección formará la PSF de dicho objetivo, mientras que el haz que se forma luego de pasar por el objetivo de excitación forma la hoja de luz. La figura 13 resume los campos iniciales utilizados según sea el caso. Para generar una hoja de luz Gaussiana y la PSF, se utiliza un campo inicial con una distribución de intensidad Gaussiana (figura 13a); en el primer caso se propaga a través del objetivo de excitación, en el segundo, a través del objetivo de colección. Para generar la hoja de luz Bessel, se inicia con un campo de intensidad de forma anular con cierto grosor, dentro del cual la intensidad es constante (figura 13a). Este campo se propaga a través del objetivo de excitación. Una vez que establecidos tales parámetros de entrada, ya sea para el haz Gaussiano o el haz Bessel (además del grosor del anillo para el segundo caso), se realiza la propagación. La distribución de intensidad del campo justo a la entrada del objetivo de excitación y en su enfoque generado para el caso del haz Gaussianno se esquematiza en la figura 13c y para el haz Bessel en la figura 13d, respectivamente. Los resultados experimentales mostrarán la distribución 2D y 3D para ambos casos.

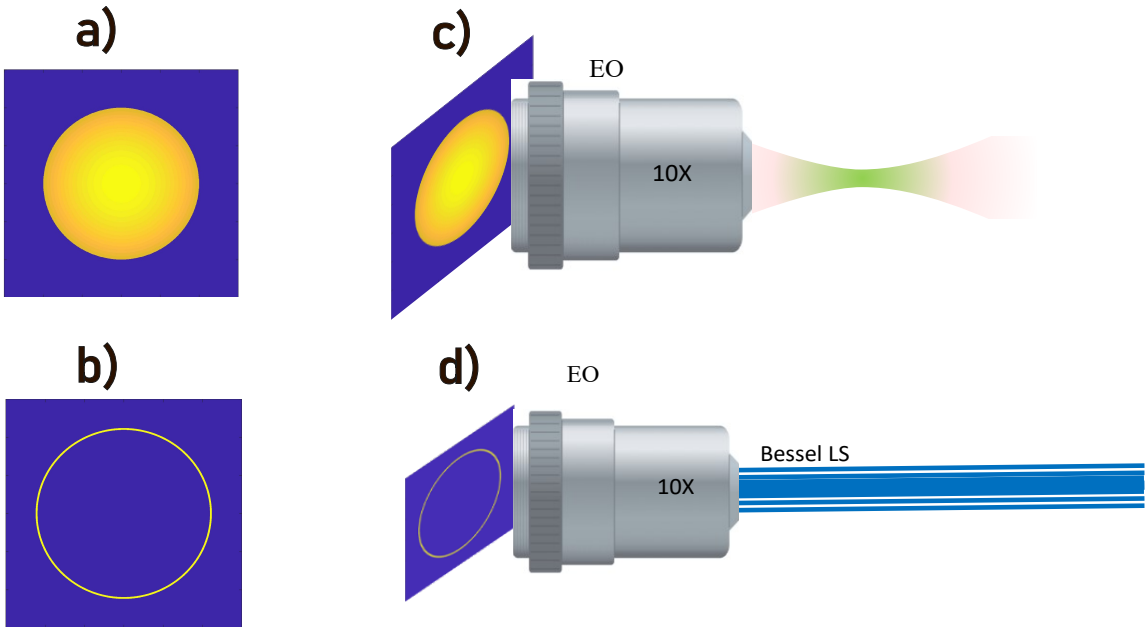

Figura 13. (a) Campo trasversal para simular la hoja de luz Gasussiana que se forma luego de transmitirse por el OE o la PSF del OC. (b) Campo trasversal para simular la hoja de luz Bessel. Esquema representativo de la propagación de haces Gaussiano (c) y Bessel (d).

Para las simulaciones se contemplan los siguientes parámetros de entrada: la distribución escalar (2D) de campo inicial (transversal a la propagación), el diámetro de la pupila limitadora (pupila de entrada), la distancia focal efectiva del objetivo de microscopio, la longitud de onda, la densidad de puntos de muestreo en matriz inicial y la densidad de puntos de muestreo en campo final.

3.4. Obtención de la Función de Punto Extendido

La función de punto extendido en un sistema de microscopio de hoja de luz es la PSF del objetivo de colección PSF^{OC} delimitada (o modulada) por la intensidad de la hoja de luz láser $I^{hojaLuz}$, que ilumina a la muestra y excita la fluorescencia en un plano de interés. La PSF^{OC} se obtiene numéricamente utilizando la propagación 3D de un frente de onda plano con distribución de intensidad Gaussiana que incidiría sobre el OC. Para ello se calcula el campo correspondiente en una sola línea radial para un conjunto discreto de distancias en z, con valores centrados en la distancia focal efectiva del objetivo de colección. Posteriormente se rota azimutalmente este campo radial en el plano transversal al eje z para tener el campo 3D con simetría radial, dando como resultado una matriz de tres dimensiones.

Para simular la intensidad de la hoja de luz se genera de manera similar el campo 3D con simetría radial ya sea con un haz Gausianno o Bessel. Con este haz 3D es posible generar el campo correspondiente a una hoja de luz. La figura 14 esquematiza este proceso a partir de la formación de un haz Bessel alrededor del foco de la lente elegida (figura 14a). Luego, se selecciona el plano horizontal correspondiente al plano xz en $y = 0$ (ver figura 14b). Finalmente se replica en los pixeles superiores e inferiores hasta llenar el volumen con el patrón Bessel que se formó en el plano central hasta generar la hoja de luz con intensiad $I^{hojaLuz}$ (ver figura 14c).

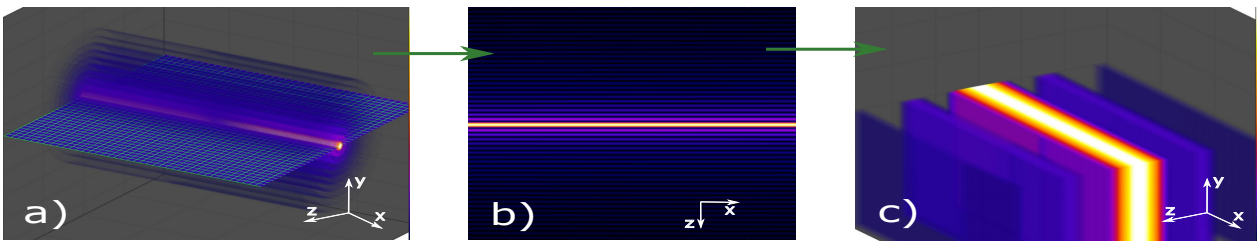

Figura 14. Simulación de haz de iluminación para hoja de luz con haz Bessel. **a)** Haz 3D con simetría radial (dependiente de r y z). **b)** Vista del plano $y = 0$ que contiene el patrón Bessel. **c)** Hoja de luz Bessel final.

Una vez calculados la PSF^{OC} y la $I^{hojaLuz}$ se calcula la PSF efectiva PSF^{ef} multiplicando las primeras dos de modo que

$$PSF^{ef}_{ijk} = PSF^{OC}_{ijk} \cdot I^{hojaLuz}_{ijk},$$

donde los subíndices *ijk* representan las entradas en las tres dimensiones de la matriz. Nótese que como resultado de esta multiplicación elemento por elemento, la PSF^{ef} se modula por los lóbulos presentes en el patrón de intensidad (Bessel o Gaussiano) cercanos al foco causados por la difracción de la luz.

En la figura 15 se ilustra las simulaciones de la PSF^{OC}, la iluminación $I^{hojaLuz}$ formada con un haz Bessel y la PSF^{ef}. Ha de aclararse que los campos correspondientes a la iluminación y colección son previamente normalizados al valor máximo en el volumen delimitado. Asimismo, se trabaja bajo el supuesto de que los campos están alineados, es decir, se hace coincidir el punto focal de la propagación de ambos haces de iluminación y colección.

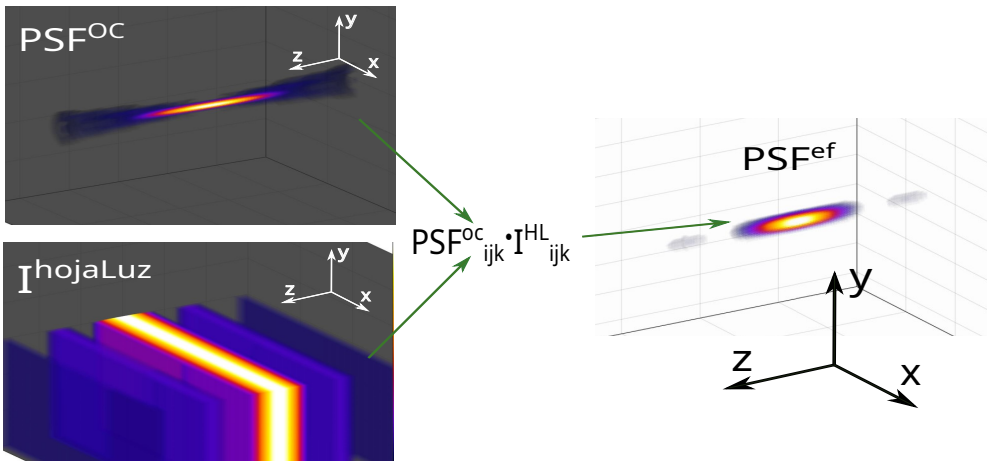

Figura 15. Ejemplo de obtención de PSF efectiva con hoja de luz Bessel. Se realiza el producto elemento a elemento de las matrices 3D correspondientes a la PSF de colección (gráfico superior izquierda) y la iluminación con hoja Bessel (gráfico inferior izquierda). La forma de la PSF de colección se ve modulada por el patrón Bessel en z. Para este ejemplo, el patrón de intensidad de la hoja Bessel en el eje x tiene un cambio que no se aprecia, mientras la intensidad no depende de y, debido a la metodología de simulación de hoja de luz. La modulación primordial es en el eje z o de propagación de la PSF efectiva.

3.4.1. Cálculo de la Función de transferencia de Modulación (MTF)

En la sección 2.5.4 se abordaron las ecuaciones para el cálculo de la función de transferencia modulada a partir de la PSF del sistema. En esta sección se describe de manera breve el cálculo numérico de la misma a partir de la PSF 3D obtenida en MATLAB usando matrices de tres dimensiones.

La figura 16 muestra una proyección en 3D de un ejemplo de PSF, mostrando solamente los planos $x = 0$, $y = 0$ y $z = 0$, los cuales coinciden con el centro de la propagación. El centro se hizo coincidir con el punto focal del objetivo de microscopio. A partir de estos planos principales, la MTF se calcula mediante los siguientes pasos:

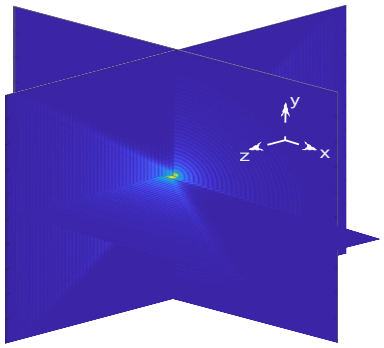

Figura 16. Planos de PSF^{OC} que pasan por el centro de la propagación: $x = 0$, $y = 0$ & $z = 0$. Estos planos son elegidos para el cálculo de la función de transferencia de modulación.

1. Se obtiene la transformada de Fourier de cada plano, para la PSF^{OC} y PSF^{ef}.
2. Se normaliza cada matriz 2D al máximo del valor en el conjunto.
3. Se guardan los perfiles en ejes principales f_x, f_y y f_z para cada MTF-2D obtenida.

Con el proceso anterior se compara la influencia de la iluminación de hoja de luz Gaussiana y Bessel en la PSF del sistema. Finalmente, se grafica la modulación contra la frecuencia espacial comparando ambos casos de iluminación.

3.5. Simulación de adquisición de imágenes

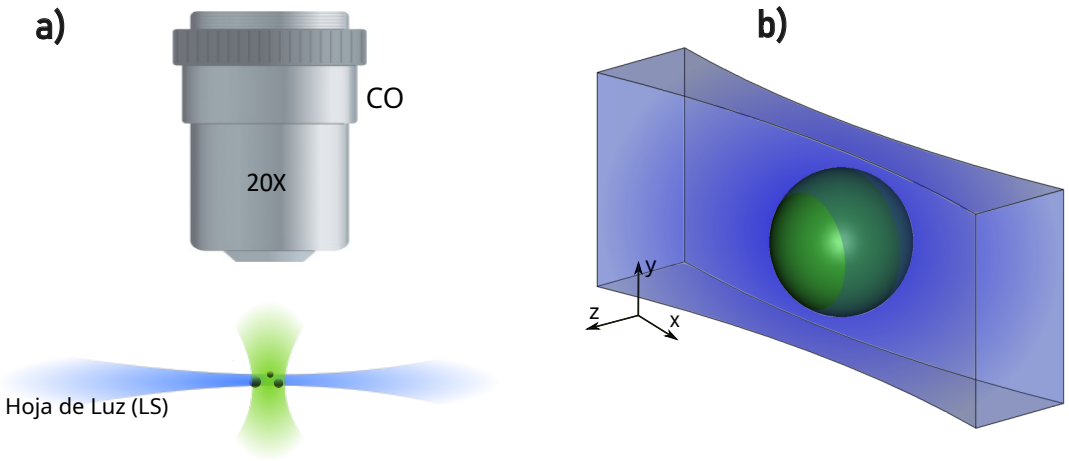

Figura 17. a) Representación de una hoja de luz Gaussiana iluminando esferas que yacen dentro del volumen y posteriormente fluorescen. b) Esquema de la iluminación de una esfera con una hoja de luz Gaussiana y esfera. La sección de la muestra excitada debe considerarse como sección volumétrica, lo que numéricamente se representa como un conjunto de matrices 2D perpendiculares al eje z

Como ya se ha mencionado, la hoja de luz no es infinitesimalmente delgada y, en consecuencia, una

pequeña sección de volumen rectangular es excitada pudiendo quedar dentro de él estructuras con tamaño de menor volumen. Para ejemplificar esto, la figura 17a presenta un diagrama con la iluminación en hoja de luz Gaussiana y microesferas comúnmente usadas para obtener la PSF de manera experimental. En este caso, el sistema verá como si todas las esferas estuvieran en el mismo plano y la imagen específica de ese plano registrará todo lo que esté en ese volumen. Esto debe tomarse en cuenta seleccionando el volumen de la PSF efectiva durante el proceso de convolución con la muestra.

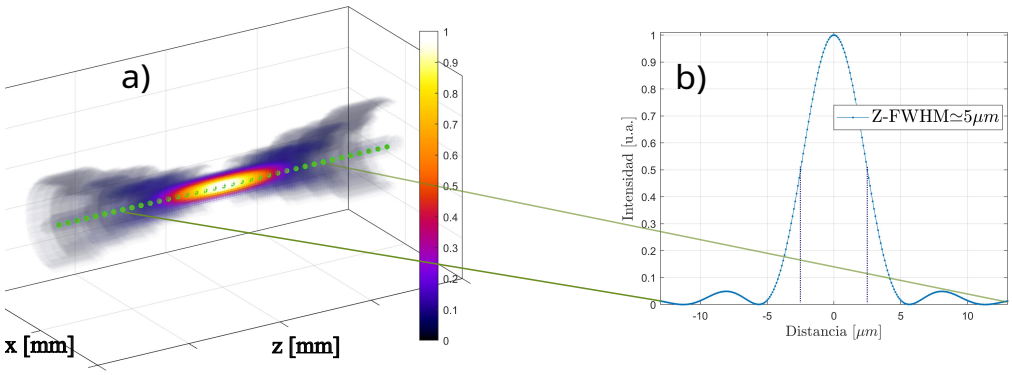

Figura 18. a) PSF de colección para objetivo de microscopio de 10mm de distancia focal. Los puntos en verde representan el vector de datos que se extrae para observar el perfil de intensidad b) y medir su FWHM.

La figura 17b esquematiza el volumen de la hoja de luz con un grosor mayor al de una esfera cuya gran parte de su volumen es iluminado. En este caso en particular el llamado seccionado óptico producido por la hoja de luz no es el ideal. La profundidad de campo (Depth of Field) del objetivo de colección juega un papel importante en la sección volumétrica del objeto iluminado. En la figura 17b, la profundidad de campo sería el intervalo (la distancia) a lo largo de z en que el objeto está enfocado. Nótese que el ancho de la hoja de luz en principio debe estar dentro de este intervalo. Entonces, la profundidad de campo es el intervalo que se considera para seccionar la PSF efectiva simulada y se procede a la convolución tridimensional. Para seleccionar el grosor en z de la PSF efectiva que interacciona con la muestra, es necesario medir el perfil de intensidad en z de la PSF de colección, el cual resulta en una curva Gaussiana. Se toma así el ancho completo a la mitad del máximo de intensidad (FWHM) del perfil en z de la PSF de colección. Una vez cuantificado este ancho (un ejemplo de ello se plasma en la figura 18 con un FWHM de $5\mu m$), se toma como parámetro para cortar la matriz 3D de la PSF efectiva y lo denominaremos d_{FWHM}. Nótese que este ancho no es más que la profundidad de campo de este objetivo, mismo que se utiliza más adelante.

La figura 19 esquematiza el proceso de barrido en un sistema de hoja de luz estática. La muestra, en este caso las esferas, se mueven a lo largo del eje-z en pasos discretos del orden de décimas de micrómetro,

generando así un conjunto de imágenes 2D para formar una visualización 3D en post-procesamiento. Lo mencionado anteriormente, se traduce al cómputo con matrices de 3 dimensiones que representen esferas de distintos diámetros cercanos a $1\mu m$ (la muestra) y la PSF efectiva con un cierto grosor en z.

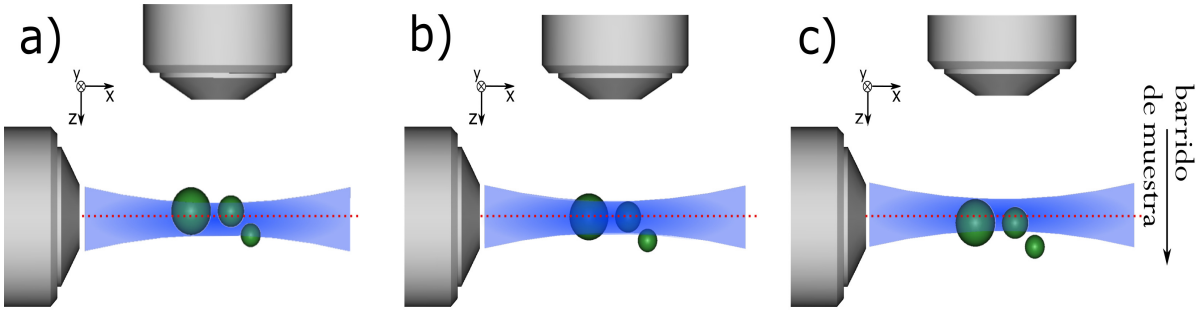

Figura 19. Esquema de barrido en un sistema de hoja de luz estática. En (a), (b) y (c) las esferas se mueven paso a paso a lo largo del eje-z

3.5.1. Adquisición de imágenes bidimensionales

Antes de proceder a la simulación de convolución 3D es necesario establecer el algoritmo para la adquisición de una sola imagen 2D; esto es, el caso en que tanto muestra como iluminación y colección se mantienen fijos. Esto se esquematiza con el diagrama de flujo de la figura 20. Una vez que se logra una imagen 2D, se selecciona otro segmento de la matriz 3D de la muestra para simular el barrido en z de la misma. En general el diagrama indica que para simular la convolución en una sola imagen 2D, se requiere trabajar con matrices de mismas dimensiones. Asimismo, es necesario contar con el mismo número de planos a lo largo de z tanto para la muestra como para la PSF efectiva, dentro de la profundidad de campo, denotado por d_{FWHM}, medida a lo largo de z de la PSF de colección. En el diagrama, la matriz 3D de la PSF efectiva y la matriz 3D de la muestra son representados como $PSF^{ef}_{ijk'}$ y $B^{n}_{ijk'}$, respectivamente.

Una vez seccionadas las matrices 3D que contienen la información de la muestra dentro del ancho d_{FWHM}, se procede a calcular la convolución 2D plano a plano, como se muestra en la figura 21, las cuales se proyectarán en el plano xy con el máximo de la intensidad de cada k'-ésimo plano para formar una sola imagen $D^{n}_{ij'}$ que contiene una imágen "distorsionada" debido al proceso de convolución. En la figura 21a, se puede ver un conjunto de matrices de dos dimensiones que están espaciados a una distancia $z = constante$, los cuales son planos equidistantes de la muestra paralelos al plano cartesiano xy. La separación entre cada plano es de $0.1\mu m$, por lo que el grupo de imágenes corresponde a un volumen con grosor de $0.5\mu m$. Análogamente, la figura 21b muestra matrices 2D de un subconjunto de la PSF efectiva y la figura 21c muestra la convolución 2D plano a plano mediante resultante del producto

$PSF^{ef}_{ijk'} * B^{n}_{ijk'}$; donde ijk' representan el conjunto de matrices 2D con filas i, columnas j y k' planos equidistantes en z.

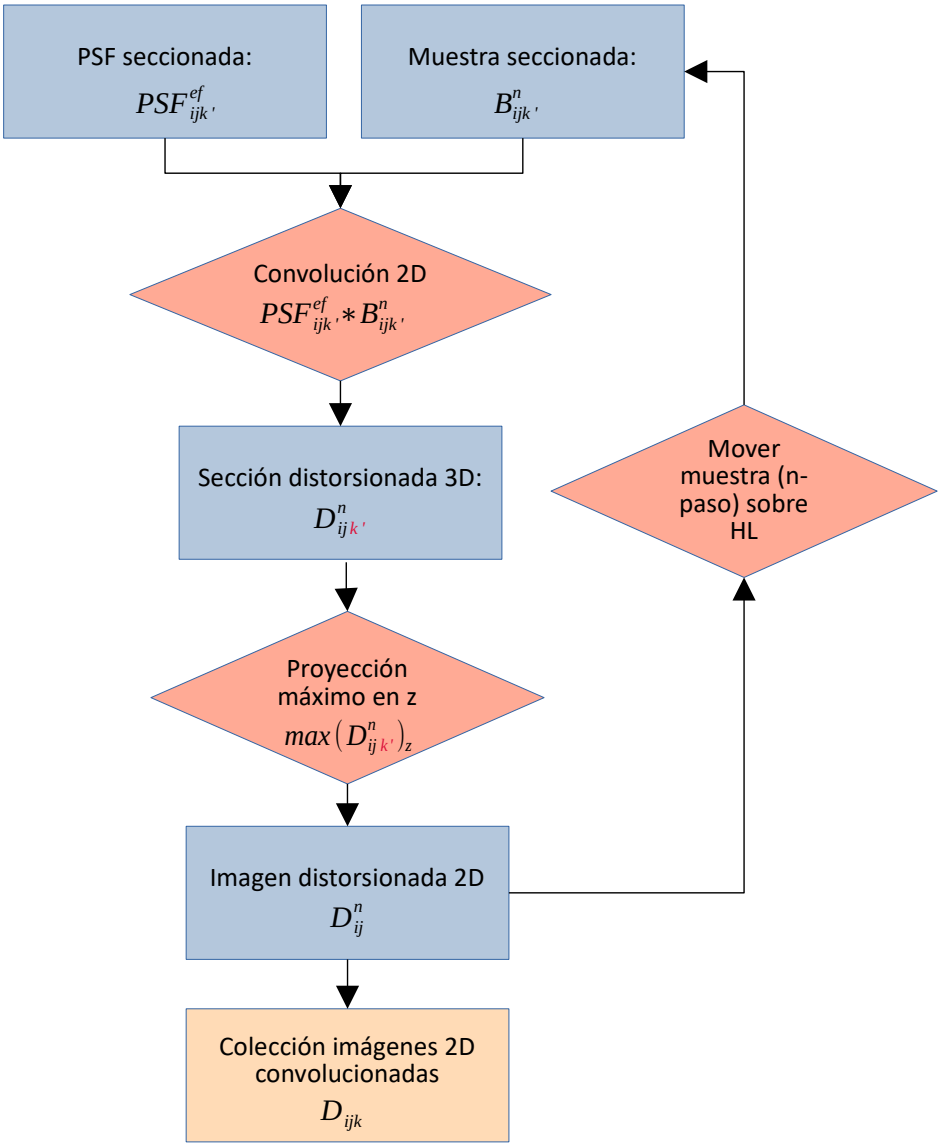

Figura 20. Diagrama de proceso de adquisición de imágenes. La PSF simulada para el objetivo de colección corre sobre los subíndices *ijk*, mientras que la PSF seccionada corre sobre los subíndices *ijk'*, donde $k' < k$; analogamente pasa con la matriz de la muestra B_{ijk}, cuando es seccionada posee subíndices *ijk'* y el super índice *n* corresponde al número de paso de la muestra sobre la hoja de luz, lo que conduce a la toma de una sola imagen 2D. La matriz $D^{n}_{ijk'}$ representa una sección (paso *n*) de la muestra convolucionada con la PSF^{ef}, a la cual se le toma la máxima proyección en el eje z.

La convolución 2D se calcula a través de la función de MATLAB *conv2* entre el primer plano de la esfera Ub_{ij1} con el primer plano de la PSF efectiva PSF^{ef}_{ij1} para obtener como resultado el primer plano de la esfera convolucionada D_{ij1}.

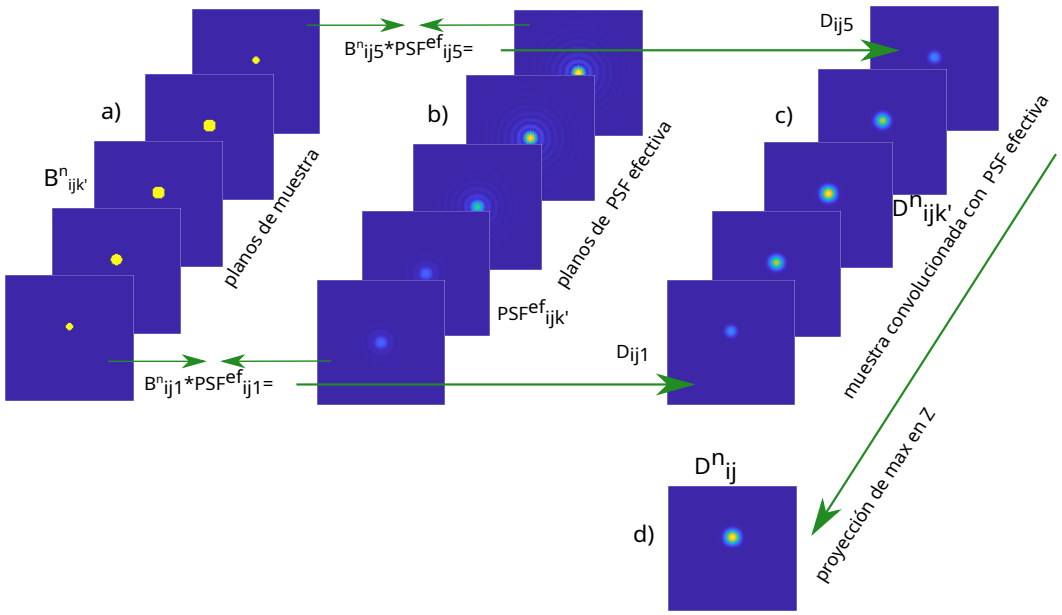

Figura 21. Convolución plano a plano de la muestra (conjunto **a)**) con la PSF efectiva (conjunto **b)**) , dando como resultado el grupo de imágenes en el conjunto **c)**. Diagrama de la adquisición de una sola imagen 2D a partir de una sección de la muestra iluminada; se elije mismo grosor en z de la muestra y PSF_{ef}, realizando la convolución 2D de cada plano $z = cte$ que conforma el volumen correspondiente. La imagen en **d)** resulta de la proyección del máximo en intensidad en z sobre el grupo de imágenes en c).

Volviendo a la figura 20. del conjunto de matrices 2D $D_{ijk'}$, se toma la proyección en z de la máxima intensidad en el arreglo bidimensional, i.e. $max(D_{ijk'})_z$, obteniendo así una sola imagen 2D "distorsionada" por la PSF efectiva y en la que se tuvo consideración de la profundidad de campo del objetivo de colección. Posteriormente, se simula el movimiento de la muestra en un paso de $0.1\mu m$ en el eje z. Esto se realiza, manteniendo fijo el volumen de la PSF efectiva previamente cortado, y eligiendo otra sección del volumen de la muestra con el mismo grosor anteriormente determinado por la PSF de colección. Si las esferas simuladas en su volumen original constaban de 500 planos en z, y para el primer paso en la adquisición de una imagen se tomaron los 50 primeros planos, el paso siguiente será tomar del plano 2 al plano 51. De esta manera se mantiene el grosor de la sección a interactuar con la PSF efectiva, y se simula el barrido de la muestra con una hoja de luz fija.

3.5.2. Deconvolución 3D

La figura 22 muestra el diagrama de flujo para simular el proceso de deconvolución aquí propuesto. Este consta de dos partes para su implementación tridimensional:

1. Deconvolución 2D. El volumen conformado por imágenes 2D, se maneja como un conjunto de

matrices de dos dimensiones, en planos perpendiculares al eje z. De la PSF efectiva volumétrica se selecciona el plano central y perpendicular al eje z, realizando la deconvolución 2D con cada plano de la muestra, mejorando así la resolución en xy.

2. Deconvolución axial. Una vez realizada la deconvolución 2D, se manipula la matriz 3D de la muestra como un conjunto de vectores en la dirección del eje z. Se elige el vector axial central de la PSF efectiva y seccionado axialmente con un grosor d_{FWHM} de la PSF de colección como se ha explicado en la figura 18. Se realiza entonces la deconvolución entre cada vector axial del volumen de la muestra y el vector axial central de la PSF efectiva ($PSF^{ef}_{i=n/2,j=m/2,k} *^{-1} D_{11k}$).

En cada paso de la deconvolución 3D se emplea el algoritmo de Richardson-Lucy con la función de MATLAB $deconvlucy$ usando 5 iteraciones. Por último, la matriz 3D resultante de la deconvolución 3D se normaliza al máximo valor en el volumen.

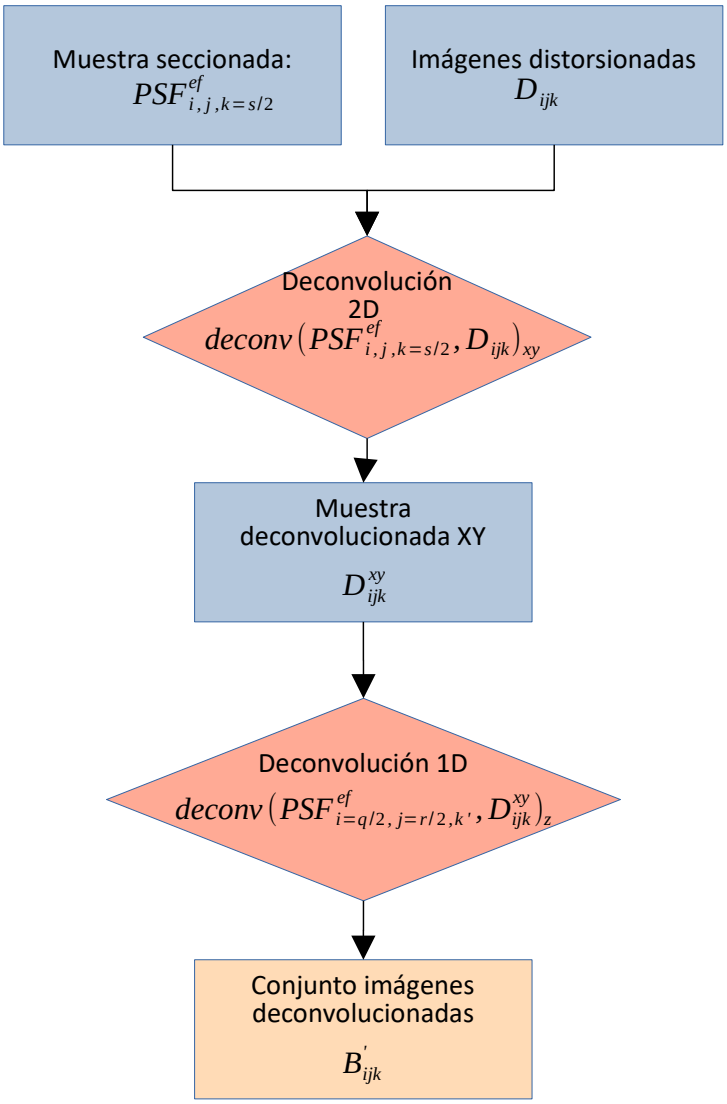

Figura 22. Diagrama de Deconvolución 3D. Se muestra en rombos los dos procesos de cómputo a seguir para la deconvolución en dos pasos. Definimos *q,r,s* la dimensión máxima de las matrices tridimensionales correspondientes a los índices *i,j,k* respecivamente. En el primer paso se selecciona el plano central $PSF^{ef}_{i,j,k=s/2}$ para realizar la deconvolución 2D con cada plano de la muestra distorsionada D_{ijk}, lo que resulta en el arreglo D^{xy}_{ijk}; los súper índices *xy* denotan que se ha realizado la convolución 2D. En el segundo paso se realiza la deconvolución de cada vector axial del arreglo anterior, con el vector central axial de la PSF efectiva. El subíndice k' representa el k-ésimo plano paralelo al plano $z =$ y pertenece a la matriz seccionada con grosor $d_{FWHM-OC}$.

Capítulo 4. Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados para la simulación de la propagación de haces correspondientes a la iluminación en hoja de luz y la colección del sistema óptico, obteniéndose como consecuencia la PSF efectiva. Se presenta la MTF del sistema realizando la comparación entre la MTF sin incluir la iluminación, MTF de la PSF con iluminación de hoja Gaussiana y Bessel; asimismo se hace un análisis de la resolución del sistema con base en la información de la MTF. Se muestra la convolución 3D de esferas del orden de micrómetros en el proceso de adquisición de imágenes. Por último se presentan resultados para el proceso de deconvolución 3D propuesto en la metodología, a partir de las microesferas distorsionadas bajo el algoritmo de adquisición de imágenes simulado, finalizando con la aplicación del proceso de deconvolución 3D en dos pasos, usando imágenes obtenidas experimentalmente.

4.1. Función de respuesta al impulso efectiva tridimensional

Los resultados que se muestran en esta sección corresponden a la función de respuesta al impulso efectiva tridimensional, los cuales fueron obtenidos bajo condiciones muy próximas al experimento. Como se ha descrito en la sección 3.3, son resultados de la simulación de la propagación en espacio libre de dos haces de excitación diferentes, Gaussiano y Bessel, en los que se tienen condiciones similares, como la longitud de onda, el radio externo del haz, la distancia focal del objetivo y la apertura numérica.

Tabla 1. Condiciones para el campo de entrada a los objetivos de excitación y colección. Los radios externo e interno hacen referencia al círculo de la pupila por la que pasa el campo a propagar, mostrados en la figura 13.

Parámetros	Excitación Gaussiana	Excitación Bessel	Colección Gaussiana
Distancia focal [mm]	18	18	10
Longitud de onda [nm]	561	561	570
Radio externo [mm]	4.486	4.486	4.486
Radio interno [mm]	0	4.386	0
Apertura numérica	0.2418	0.2418	0.4093

La tabla 1, resume los principales parámetros de simulación utilizados. Estos corresponden básicamente a las características de los objetivos de microscopio que se usan en el laboratorio para la excitación y la colección respectivamente. Dado que ambos haces de excitación tiene el mismo diámetro externo, la apertura numérica es la misma. Nótese que la diferencia principal para simular los haces Bessel y Gaussiano es la forma del campo que incide en la lente, siendo el primero un anillo y el segundo una

distribución Gaussiana bidimensional. Mientras que la diferencia entre la excitación y la colección es la longitud de onda. Ya que el objetivo de colección colecta únicamente la fluorescencia inducida por los haces de excitación. En el experimento se utiliza un filtro óptico para bloquear la luz de los haces incidentes.

4.1.1. PSF efectiva utilizando una hoja de luz Gaussiana

La figura 23 muestra el efecto que tiene una hoja de luz Gaussiana en la PSF de un sistema formador de imagen (en este caso el microscopio de hoja de luz). Para evidenciar tal efecto, se compara la PSF del sistema sin hoja de luz láser con la la PSF efectiva resultante al considerar una hoja de luz. Para esta comparación se muestran los tres planos principales del sistema cartesiano: el plano YZ (primer renglón), el plano XY (segundo renglón) y el plano XZ (tercer renglón). En la figura, la imágenes de la primera columna corresponden a los planos principales de la hoja Gaussiana en una ventana de $40\mu m$; es decir, en la zona focal de ambos objetivos (excitación y colección). La segunda y tercera columna muestran la PSF y la PSF efectiva, sin y con la hoja de luz, respectivamente, dentro de una ventana de $12\ \mu m$, esto con el fin de tener una mejor perspectiva cercana al centro del foco.

Como se describe en la configuración experimental mostrada en la sección 3.1, el plano YZ, muestra la perspectiva que se tendría desde el objetivo de excitación (el plano $x = 0$); el plano XY, muestra la perspectiva que se tendría desde el objetivo de colección (el plano $z = 0$, lo que se ve a través del microscopio); mientras que el plano XZ representa una "vista aérea"(el plano $y = 0$).

Si se observan de izquierda a derecha las imágenes del plano YZ (vistas desde el OE), es posible apreciar que el ancho de la hoja de luz (imagen *1a*) es menor que el ancho de la PSF sin hoja de luz (imagen *1b*). En consecuencia, la PSF efectiva (imagen *1c*) resulta de una modulación de la PSF del sistema por la presencia de la hoja de luz. No obstante, este efecto de modulación en la PSF efectiva no ocurre en el plano XY (imágenes vistas desde el OC). En otras palabras, la presencia de la hoja de luz afecta únicamente la PSF a lo largo del eje-Z disminuyendo su tamaño, mientras que las PSF a lo largo de los ejes-X y -Y no se modifican, como se puede apreciar en las imágenes *2b* y *2c*.

Para apreciar aún mejor este efecto de la modulación de la PSF en el eje Z, y su mejora en la resolución axial, la figura 24 presenta el perfil de intensidad en cada eje del sistema coordenado (X , Y y Z) para la PSF sin hoja de luz láser (figura 24 a) y para la PSF efectiva con hoja de luz Gaussiana (figura 24 b). En ambos casos las trazas para los ejes-X y Y, no sufren cambio, mientras que para las trazas de los perfiles en Z se aprecia una disminución considerable en la figura 24 b con respecto a la figura 24 a,

como consecuencia de la modulación de la hoja de luz láser en la PSF del sistema.

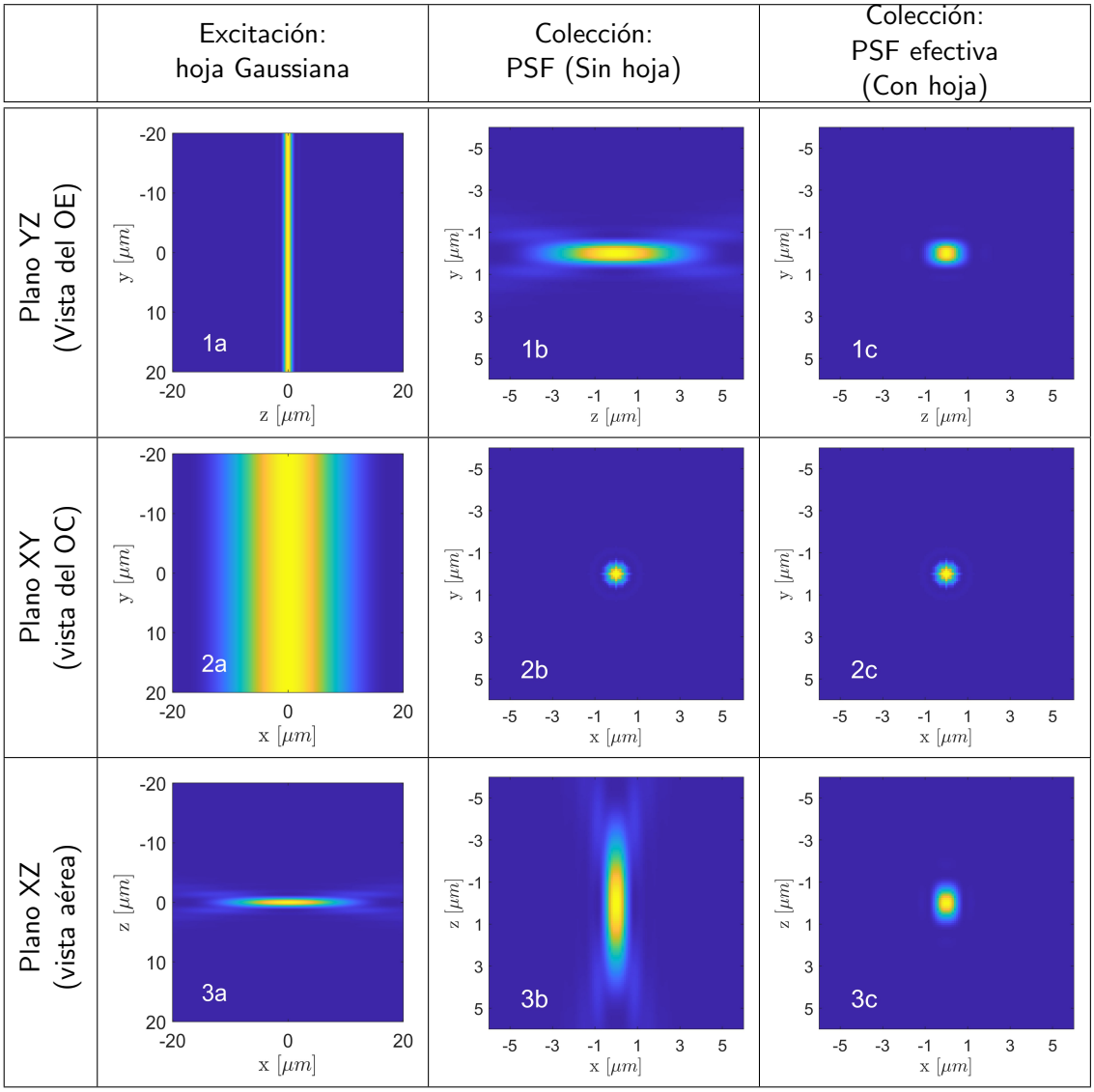

Figura 23. Simulación numérica del haz de excitación Gaussiano, la PSF del objetivo de colección(sin hoja de luz) y la PSF efectiva (con hoja de luz). Se muestran cortes de los planos principales.

La Tabla 2 muestra el ancho de la PSF a la mitad del máximo (FWHM, por las siglas en inglés de Full Width Half Maximum) de las trazas obtenidas para cada perfil mostrado en la figura 24. Efectivamente, los anchos de la PSF del sistema y de la PSF efectiva en dirección de x y y no cambian. Mientras que en la dirección z hay una gran reducción. Físicamente esto implica que aunque el objetivo de colección "pueda ver" en foco cualquier estructura dentro dentro de $5\mu m$ de profundidad, la iluminación determina qué sección del volumen de la muestra será captada por el objetivo de colección.

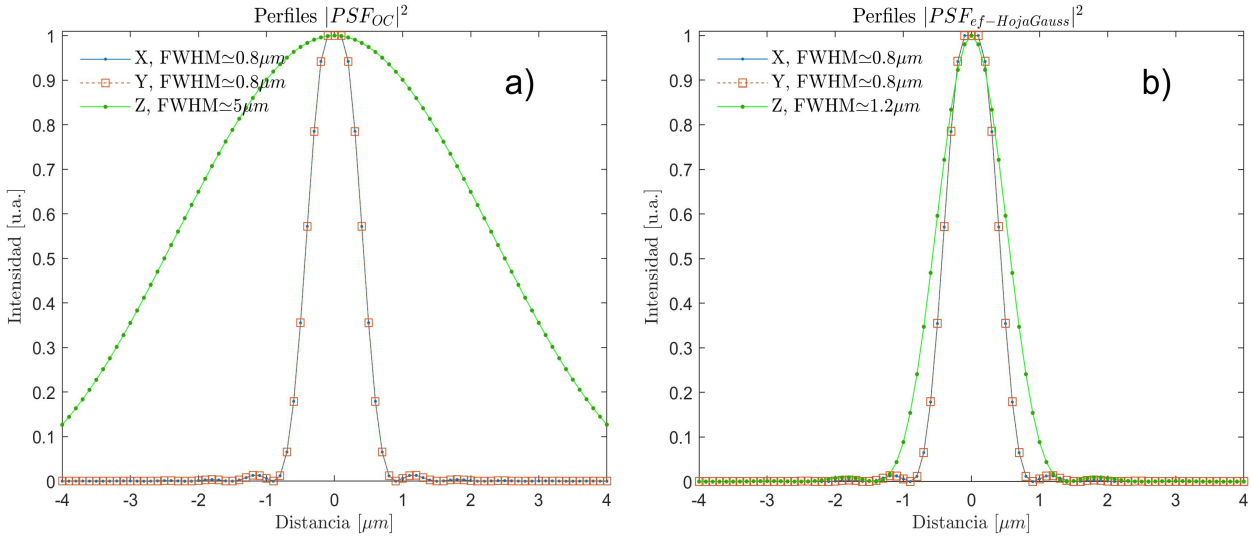

Figura 24. Trazas de los perfiles de la PSF sin hoja de luz (a) y de la PSF efectiva con hoja de luz Gaussiana (b)

En este contexto, ya que la resolución óptica de un sistema óptico está relacionado con la PSF del sistema, se puede deducir que la resolución óptica axial se mejora en un sistema de hoja de luz láser debido a la presencia acotada en la iluminación a lo largo del eje-Z. En contraste, la resolución óptica lateral (a lo largo de los ejes-x y Y) no cambia debido al tipo de la iluminación plana. La mejoría en la resolución mencionada será analizada a través de la MTF del sistema en la siguiente sección.

Tabla 2. Anchos FHWM de las PSF a lo largo de los ejes-x, y & z obtenidos de la figura 24

Perfil	PSF (sin hoja de luz) [μm]	PSF efectiva (con hoja Gaussiana) [μm]
x	0.8	0.8
y	0.8	0.8
z	5.0	1.2

4.1.2. PSF efectiva utilizando una hoja de luz Bessel

De manera similar a la sección anterior, la figura 25 muestra el efecto que tiene una hoja de luz Bessel en la PSF effectiva en un microscopio de hoja de luz. Donde se compara la PSF del sistema sin hoja de luz láser con la la PSF effectiva resultante al considerar una hoja Bessel. La imágenes de la primera columna corresponden a los planos principales de la hoja Bessel en una ventana de $40\mu m$. Mientras que la segunda y tercera columna muestran la PSF y la PSF efectiva, sin y con la hoja de luz, respectivamente, dentro de una ventana de 12 μm.

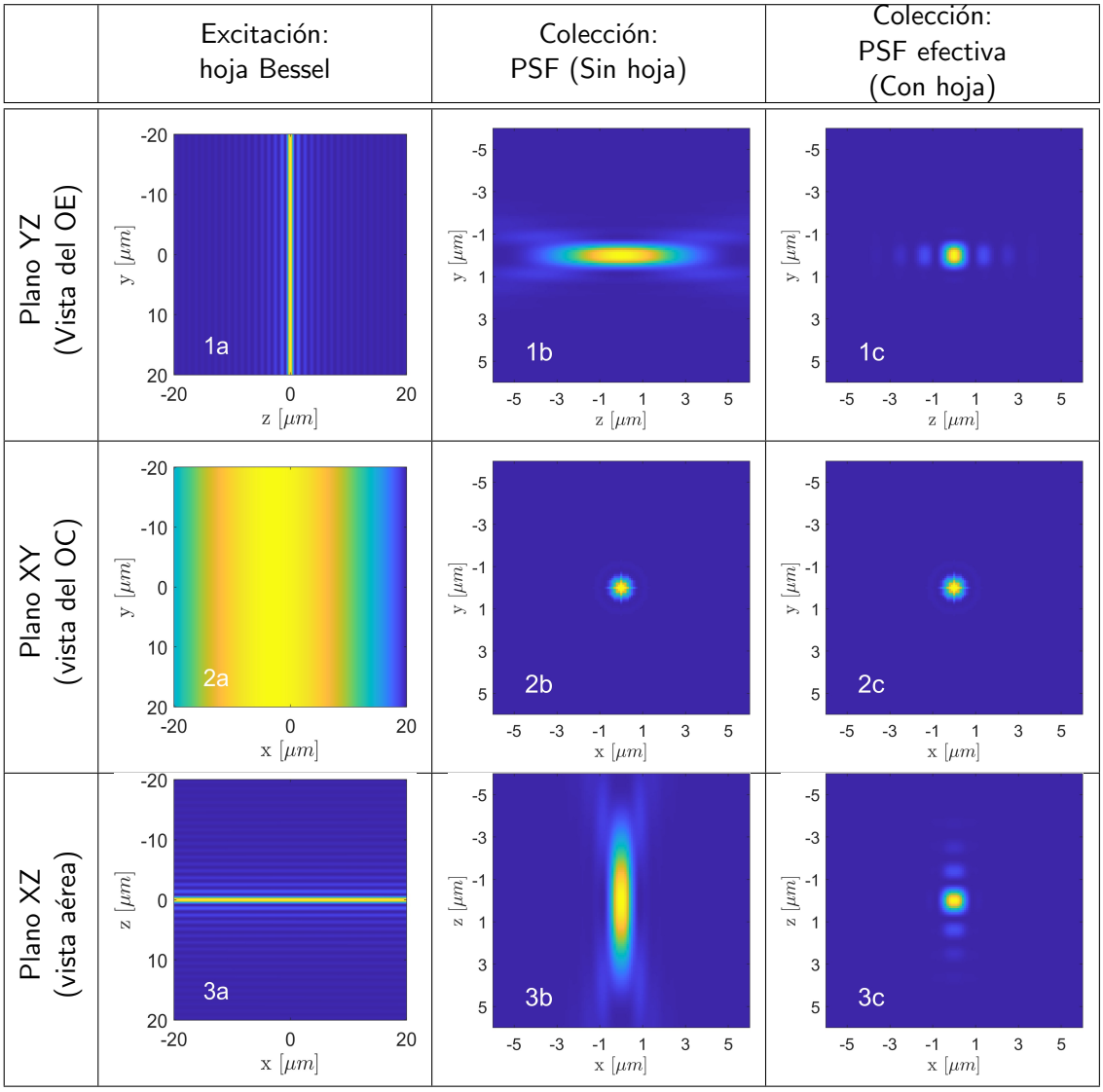

Figura 25. Simulación numérica del haz de excitación Bessel, la PSF del objetivo de colección (sin hoja de luz) y la PSF efectiva (con hoja de luz). Se muestran cortes de los planos principales.

Al observar de izquierda a derecha las imágenes del plano YZ, vistas desde el objetivo del excitación, se aprecia nuevamente que el ancho de la hoja de luz (imagen *1a*) es menor que el ancho de la PSF sin hoja de luz (imagen *1b*). Es importante resaltar que, a diferencia de la hoja de luz Gussiana (figura 23-*1a*), la hoja Bessel de la figura 25-*1a* muestra los lóbulos de intensidad característicos de este tipo de función. Consecuentemente, la PSF efectiva (imagen *1c*) resulta con lóbulos axiales debido a dicha modulación de la hoja de luz Bessel. Nuevamente, este efecto de modulación en la PSF efectiva no ocurre en el plano XY (imágenes vistas desde el OC). Por lo que la presencia de la hoja de luz afecta únicamente la PSF a lo largo del eje-Z disminuyendo su tamaño, mientras que las PSF a lo largo de los ejes-x y -y no se modifican, como se puede apreciar en las imágenes *2b* y *2c*.

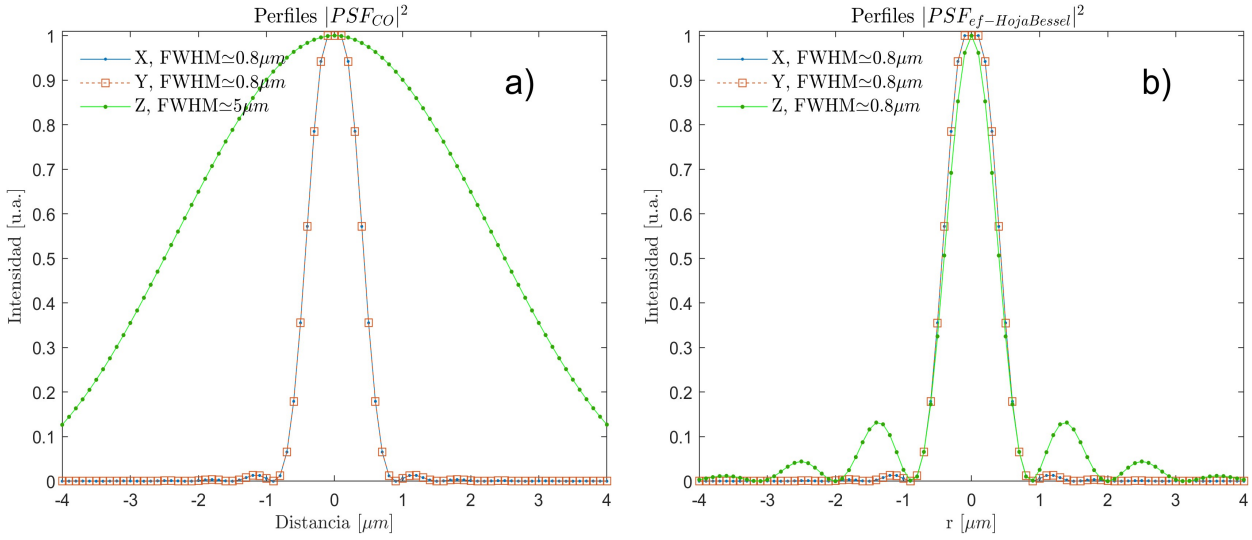

Figura 26. Trazas de los perfiles de la PSF sin hoja de luz (a) y de la PSF efectiva con hoja de luz Bessel (b).

Este efecto de la modulación de la PSF en el eje-Z, y su mejora en la resolución axial, se aprecia mejor en la figura 26. La cual grafica el perfil de intensidad en cada eje del sistema coordenado (z , y y Z) para la PSF sin hoja de luz láser (figura 26a) y para la PSF efectiva con hoja de luz Bessel (figura 26b). Nuevamente, las trazas para los ejes-z y -Y, no sufren cambio, mientras que para las trazas de los perfiles en z se aprecia la disminución considerable en la figura 26b) como consecuencia de la modulación de la hoja de luz láser en la PSF del sistema. Aunque, a diferencia del caso de la hoja Gaussiana (ver figura 24b), los lóbulos obtenidos como consecuencia de la hoja Bessel (ver traza verde de la figura 26b) son más pronunciados.

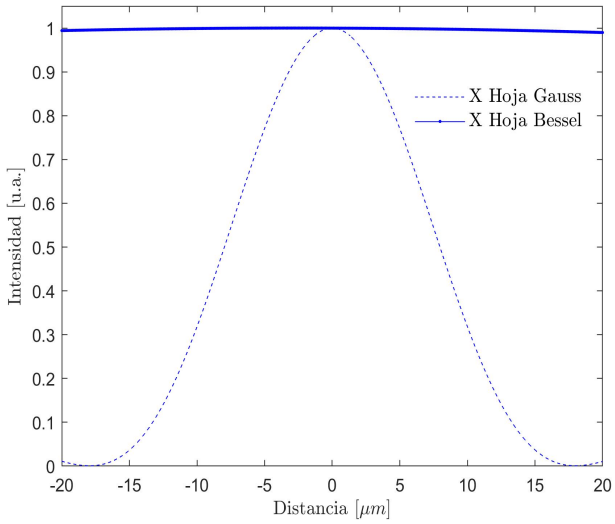

Figura 27. Comparación de perfiles de intensidad a lo largo del eje-x entre una hoja de luz Gaussiana (línea segmentada) y una Bessel (línea sólida).

Por otro lado, comparando la figura 23-*2a* para el caso de la hoja Gaussiana y la figura 25-*2a* para el caso de hoja Bessel, las cuales dan la perspectiva que se tiene desde el objetivo de colección, se puede apreciar que el campo de visión es mayor para la hoja Bessel. Recuérdese que el campo de visión en un sistema de hoja de luz láser está definido por la profundidad de campo (es decir, el doble de la distancia de Rayleigh) del haz de luz que forma la hoja de luz. Para visualizar mejor esto, la figura 27 presenta el perfil de la intensidad a lo largo del eje-x de las dos hojas de luz Gaussiana (línea segmentada) y Bessel (línea sólida); donde el centro corresponde al foco de la la propagación. Tomando como referencia el foco $X = 0$, es fácil notar que la intensidad es más homogénea para la iluminación Bessel. En consecuencia, una ventaja de utilizar iluminación Bessel es que se tiene un mayor campo de visión comparada con el uso de una hoja de luz Gaussiana.

La Tabla 3 expone el ancho a la mitad del máximo (FWHM) de las trazas obtenidas para cada perfil mostrado en la figura 26. Similar al caso de la hoja Gaussiana, los anchos de la PSF del sistema y de la PSF efectiva en dirección de x y y no cambian, mientras que en la dirección z también existe una reducción. Mejor aún, vale la pena remarcar el hecho de que la PSF efectiva a lo largo del eje-z , bajo una iluminación con hoja Bessel es menor que con iluminación Gaussiana. Esto si se considera sólo la parte central del patrón de intensidad; no obstante, la hoja Bessel presenta lóbulos a lo largo de este eje que introducen señal fuera del plano central.

Tabla 3. Anchos FHWM de las PSF a lo largo de los ejes-x, y & z obtenidos en la figura 26

Perfil	PSF (sin hoja de luz) [μm]	PSF efectiva (con hoja Bessel) [μm]
x	0.8	0.8
y	0.8	0.8
z	5.0	0.8

Como ya se ha mencionado, la PSF proporciona información de la resolución del sistema y además, dependiendo de su forma, causa una distorsión a las imágenes adquiridas debido al proceso de su convolución con el objeto bajo observación. En este contexto, los perfiles mostrados en las figuras 23 y 25 dan una idea de cómo se deformaría la imagen de un objeto 3D adquirida por el sistema óptico de hoja de luz, como se verá más adelante.

4.1.3. Función de transferencia modulada (MTF)

La figura 28 muestra las corresponidentes funciones de transferencia modulada (MTF), calculadas a partir de los planos mostrados en la figura 23 y 25. El primer renglón de imágenes de la figura muestra

de izquierda a derecha las MTF bidimencionales en el plano de frecuencias espaciales $f_x f_y$ (es decir, en el plano $f_z = 0$), correspondientes a un sistema sin hoja de luz, con hoja de luz gaussiana y con hoja de luz Bessel, respectivamente. La figura 29-a compara las MTF a lo largo del eje f_y donde es evidente el traslape entre para los tres casos; nótese que la gráfica para f_x es idéntica para f_y, por esta razón se omite la figura con las frecuencias f_x. Entonces, como era de esperarse, tanto la resolución como el contraste de las imágenes en el plano XY no cambian.

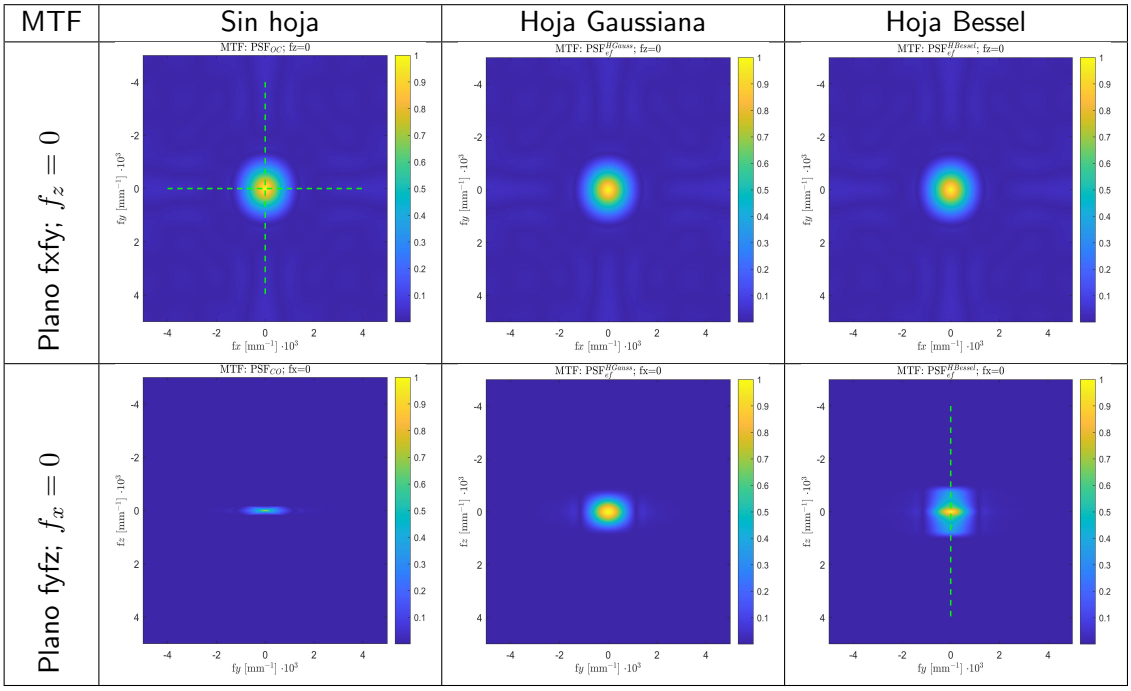

Figura 28. Comparación de función de transferencia de modulación (MTF) para el caso sin incluir la iluminación, con iluminación de hoja Gaussiana y hoja Bessel. La primera fila del arreglo muestra que no hay cambio en las frecuencias espaciales f_x y f_y, sin embargo, hay gran diferencia en las frecuencias f_z. Se toman vectores de datos de cada imagen como se muestra en el primer gráfico con línea punteada verde.

Por otro lado, el segundo renglón de imágenes de la figura 28 se muestran de izquierda a derecha las MTF en el plano de frecuencias espaciales $f_y f_z$, de un sistema sin hoja de luz, con hoja de luz Gaussiana y con hoja de luz Bessel, respectivamente. Mientras que la figura 29-b compara las MTF a lo largo del eje f_z. Recordemos que la máxima resolución de un sistema está determinada por el punto en el que la MTF cae a cero. En consecuencia, dado que las MTF "se alargan" a lo largo del eje-z se tiene vislumbra una mejor resolución axial cuando el sistema tiene una iluminación de hoja de luz (Gaussiana o Bessel).

Además, dado que la amplitud de la MTF proporciona información del contraste, de la figura 29-b se puede apreciar que para frecuencias espaciales mayores a $432.6\ mm^{-1}$ el contraste generado con iluminación de hoja Bessel es mayor que el caso Gaussiano. En cambio, para frecuencias espaciales

menores a $432.6\ mm^{-1}$ el sistema con iluminación de hoja Gaussiana genera mayor contraste.

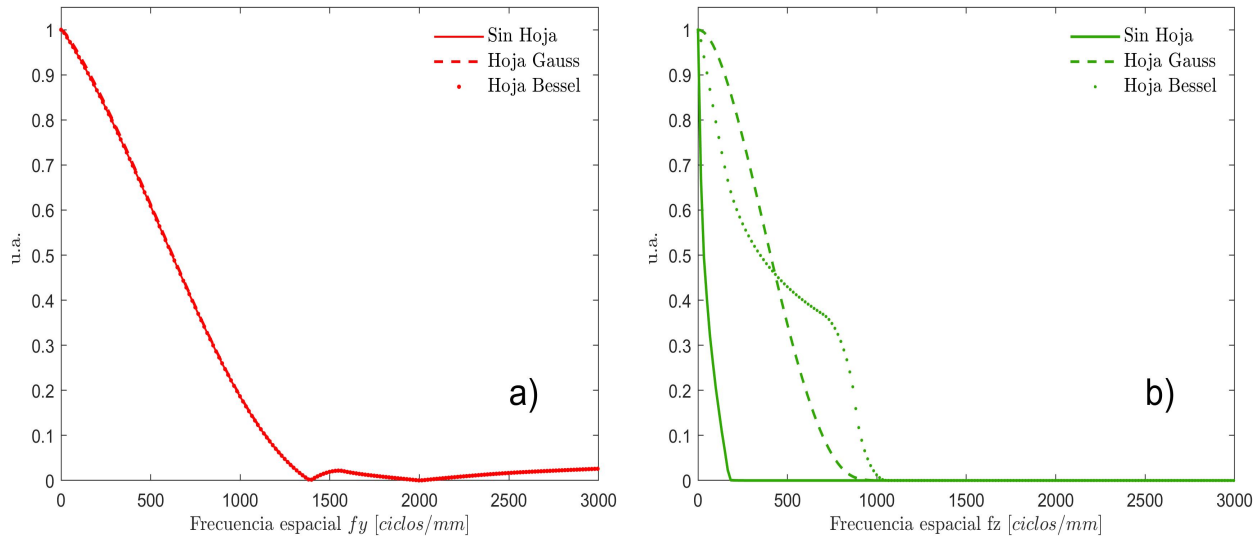

Figura 29. a) Perfiles de MTF bidimensional para un sistema sin hoja de luz, b) perfiles de MTF con hoja de luz. Se muestra la información para los planos principales $f_y - f_z$ y $f_x - f_y$. Las líneas segmentadas se utilizan para hacer la comparación de los perfiles de dispersión plasmados en la figura 28.

De la misma figura 29 se pueden estimar los valores de la resolución óptica para los tres casos de análisis, mediante las frecuencias de corte f_x, f_y y f_z, mismas que se resumen en la Tabla 4. En la tabla se puede leer que las frecuencias laterales f_x y f_y son iguales para los tres casos. No obstante, la frecuencia axial f_z es máxima para el sistema con hoja de luz Bessel, seguida del sistema con hoja de luz Gaussiana y finalmente el sistema sin hoja de luz.

Tabla 4. Frecuencia de corte para los tres casos, obtenida de los gráficos en figura 29.

	Frecuencia de corte	
	$f_x = f_y\ [mm^{-1}]$	$f_z\ [mm^{-1}]$
Sin hoja	1381	200
Hoja Gaussiana	1381	965
Hoja Bessel	1381	1048

Mediante la expresión de Abbe que mide la resolución lateral (a lo largo de x o y) tomando en cuenta la apertura numérica del objetivo de colección ($NA = 0.4093$), se puede calcular teóricamente la frecuencia de corte f_c con la expresión $f_c = \frac{2 \cdot NA}{\lambda}$. (Born y Wolf, 2013) Con lo cual, utilizando una longitud de onda $\lambda = 570\ nm$ se obtiene un valor de $f_c = 1436.14\ mm^{-1}$, lo que corresponde a una resolución de $d = 0.693\ \mu m$. La cual es cercana a la resolución obtenida utilizando las frecuencias de corte de la

Tabla 4 siendo esta de $d = 0.72\ \mu m$. Por otro lado, la resolución axial (en el eje z) para el caso sin hoja de luz se calcula teóricamente con la expresión para la profundidad de campo dada por $d_z = \frac{2\lambda}{NA^2}$. lo cual da como resultado $d_z = 6.8\ \mu m$, o un valor de $R_{ax} = 146.95\ mm^{-1}$ un tanto cercano al valor obtenido de la MTF de $200\ mm^{-1}$.

4.2. Convolución 3D en un sistema de hoja de luz

En la sección 4.1 anterior, se obuvieron las PSF efectivas para un sistema óptico sin hoja de luz, con hoja Gaussiana y con hoja Bessel. En esta sección se muestran resultados de la convolución 3D propuesta en esta tesis. Como se describió en la sección 3.5.1, se propone como objeto en observación a tres esferas sólidas de diferente dimensión, en el orden del límite de resolución lateral determinado anteriormente ($0.638\ \mu m$), cercanos también a los valores obtenidos en las PSF de las Tablas 2 y 3. Numéricamente, las esfereas se forman por voxeles con valor a 1 dentro su volumen esférico y un valor 0 fuera del mismo.

La Tabla 5 muestra el tamaño de las esferas simuladas como el objeto bajo observación en el sitema óptico formador de imagen (sin iluminación y con iluminación de hoja de luz). De aquí en adelante, los resultados harán referencia a las eferas de esta tabla. Es decir, esfera 1 para una esfera de $1\ \mu m$ (ligeramente mayor a la resolución), esfera 2 para una esfera de $0.6\ \mu m$ (igual a la resolución) y esfera 3 para una esfera de $0.2\ \mu m$ (menor al límite de resolución).

Tabla 5. Tamaños de esferas originales (antes del proceso de convolución 3D)

	Diámetro [μm]
Esfera 1	1.0
Esfera 2	0.6
Esfera 3	0.2

Vale la pena resaltar que hablar de una convolución 3D tiene cierta generalidad y para evitar ambigüedades, hay que conocer el proceso o algoritmo de convolución específico. En este trabajo, el proceso de convolución involucra el barrido de funciones (en este caso de voxeles) en las tres direcciones del espacio. Involucra un barrido en el eje z (o eje de axial a la colección) y la correspondiente convolución entre planos 2D en el plano xy a partir de un grupo de cortes (planos paralelos) a lo largo del eje z.

4.2.1. Convolución 3D con iluminación de hoja de luz Gaussiana

La Figura 30 presenta la reconstrucción 3D resultante de simular la convolución volumétrica propuesta en este trabajo de tesis, para un sistema de hoja de luz Gaussiana y las tres esferas sólidas de diferente

tamaño. Cada esfera está en un plano diferente xy a diferente profundidad del eje-z, pero espaciadas aleatoreamente dentro en el plano yz. El volumen se forma apilando las imágenes 2D generadas en el proceso descrito en la sección 3.5.1. Nótese que a pesar de que los objetos simulados son esféricos, en la figura se aprecia una deformación (un ensanchamiento) a lo largo de los tres ejes. Mostrando una elongación mayor hacia el eje z. Esta deformación es característica en un sistema de microscopio y se debe precisamente al efecto de convolucionar el tamaño del objeto con la PSF del sistema.

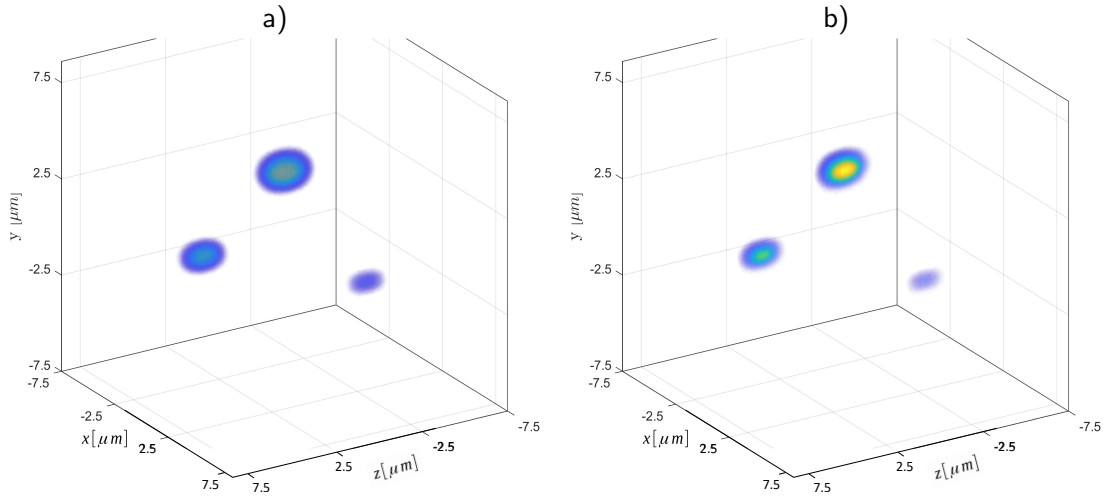

Figura 30. Imagen volumétrica que muestra la deformación de esferas por el proceso de convolución 3D en un sistema con hoja de luz Gaussiano. a) esferas completas; b) esferas partidas a la mitad mostrando el efecto en la intensidad.

Por otro lado, se observa que el proceso de convolución de la hoja de luz con las esferas no sólo induce una deformación, también produce un cambio en la intensidad de los voxeles contenidos en el volumen de la esfera como se puede apreciar en la figura 30b. Esto es, la intensidad no es homogénea y decae monótonamente del centro hacia afuera.

4.2.2. Convolución 3D con iluminación hoja de luz Bessel

La figura 31 presenta el resultado de simular la convolución 3D en un sistema de hoja de luz Bessell y las tres esferas sólidas simuladas en la figura 30. De manera similar, se aprecia una deformación (un ensanchamiento) a lo largo de los tres eje, con una elongación mayor hacia el eje z. No obstante, a diferencia del caso Gussiano, se tienen lóbulos laterales debidos precisamente al efecto de convolucionar el tamaño del objeto con la PSF effectiva de un sistema con hoja de luz Bessel. En este caso, también existe cambio en la intensidad de los voxeles contenidos en el volumen de las esfera (ver figura 31b), donde se aprecia que la intensidad no es homogénea. Más adelante se analiza la distorsión extrayendo

los perfiles de intensidad paralelos a los ejes coordenados que pasan por el centro de cada muestra.

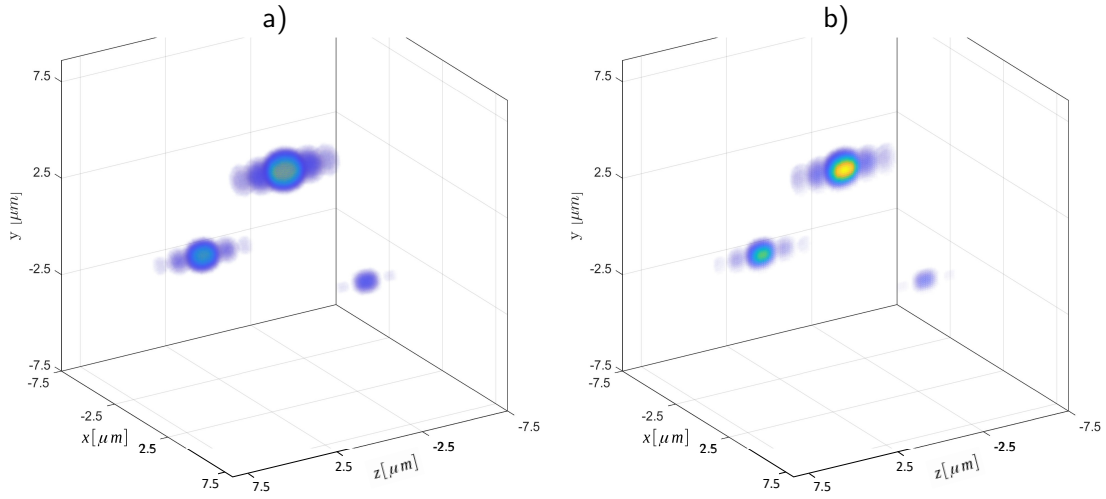

Figura 31. Imagen volumétrica que muestra la deformación de esferas por el proceso de convolución 3D en un sistema con hoja de luz Bessel. a) esferas completas; b) esferas partidas a la mitad mostrando el efecto en la intensidad.

4.2.3. Comparación en la convolución 3D entre iluminación con hoja Gaussiana y Bessel

Como ya se mencionó, cada esfera está en un plano diferente xy pero espaciadas aleatoreamente dentro en el plano yz. Esto es, geométricamente, las coordenadas del centro de cada esfera es $\vec{c}_i = (x = 0, y_i, z_i)$. De esta manera tal, que al hacer un el plano yz con $x = 0$, se tiene una imagen que contiene el centro de todas las esferas.

La figura 32 compara las imágenes de las esferas originales (sin deformación), antes del proceso de convolución 3D, con las esferas deformadas bajo el sistema de microscopio con hoja de luz Gaussiana y Bessel. Se ha etiquetado cada esfera de acuerdo al tamaño mostrado en la Tabla 5. Se puede apreciar el aumento en el tamaño de las microesferas en la imagen b) y c), siendo notablemente mayor a lo largo del eje z que en la dirección del eje y. Esto a pesar de que, de acuerdo a las PSF efectivas de ambas hojas de luz (Tablas 2 y 3), deberían mejorar por mucho la resolución a lo largo de z.

Lo anterior, de hecho sucede comúnmente en el laboratorio, y se debe a que la hoja no es infinitesimalmente delgada, de hecho es más grande que la esfera. Experimentalmente, en el proceso de adquisición de imágenes, al barrer la esfera sobre la hoja de luz (a lo largo del eje- z), cierta sección de su volumen vuelve a iluminarse al tomar dos imágenes subsecuentes debido al ancho de la hoja. No es hasta que la esfera "abandona" la hoja de luz que deja de contribuir en la imagen. Como consecuencia, no sólo existe

distorsión en la imagen final debido a la forma en la PSF efectiva, también se debe a que el ancho y la forma de la hoja de luz sea más ancha que el tamaño del objeto bajo observación.

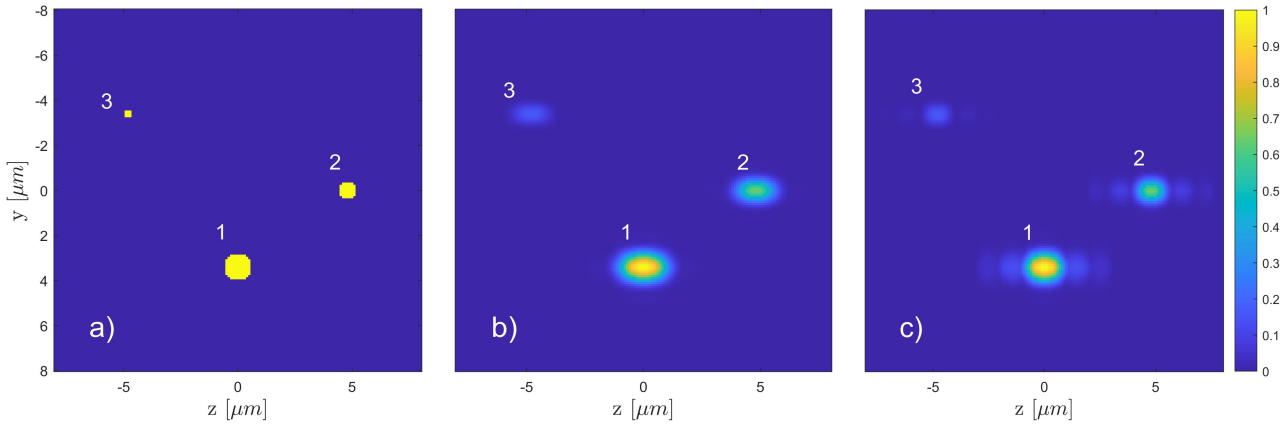

Figura 32. Comparativa de esferas antes y después del proceso de convolución 3D. **a)** Esferas originales, **b)** esferas distorsionadas por la PSF effectiva de la hoja de luz Gaussiana, **c)** esferas distorsionadas par la PSF con hoja de luz Bessel.

La deformación de la imagen como dependencia de la forma de la hoja de luz se puede apreciar claramente para el caso de la hoja Bessel en la figura 32-c. En la cual se visualizan con mayor intensidad los lóbulos que no forman parte de una elipsoide resultante de una convolución de la PSF con la esfera. Este efecto es más pronunciado en la esfera 1 que en la esfera 3. Por tanto, la elongación y aparición de lóbulos se magnifica para objetos mayores al límite de resolución axial.

Es importante hacer notar que si bien una modulación predominante en el patrón de intensidad dependerá de la forma de la hoja de luz (como en el caso de la hoja Bessel), la apertura numérica del objetivo de colección también juega un papel muy importante en el resultado de la convolución. Si se tiene una mayor apertura numérica, se obtendrá en consecuencia una PSF efectiva con menor ancho axial. Esto a su vez influye en la sección de la muestra que el sistema óptico percibe en foco: es decir, la misma profundidad de campo del objetivo de colección tiene influencia en el ancho en z de la muestra iluminada que logra captarse. En otras palabras, si se mantuviera la misma hoja de luz (Gaussiana o Bessel) como en las figuras 32-b y -c, y se usara un objetivo de colección con mayor apertura numérica, la deformación de las esferas después de adquirir la imagen en 3D sería menor axialmente.

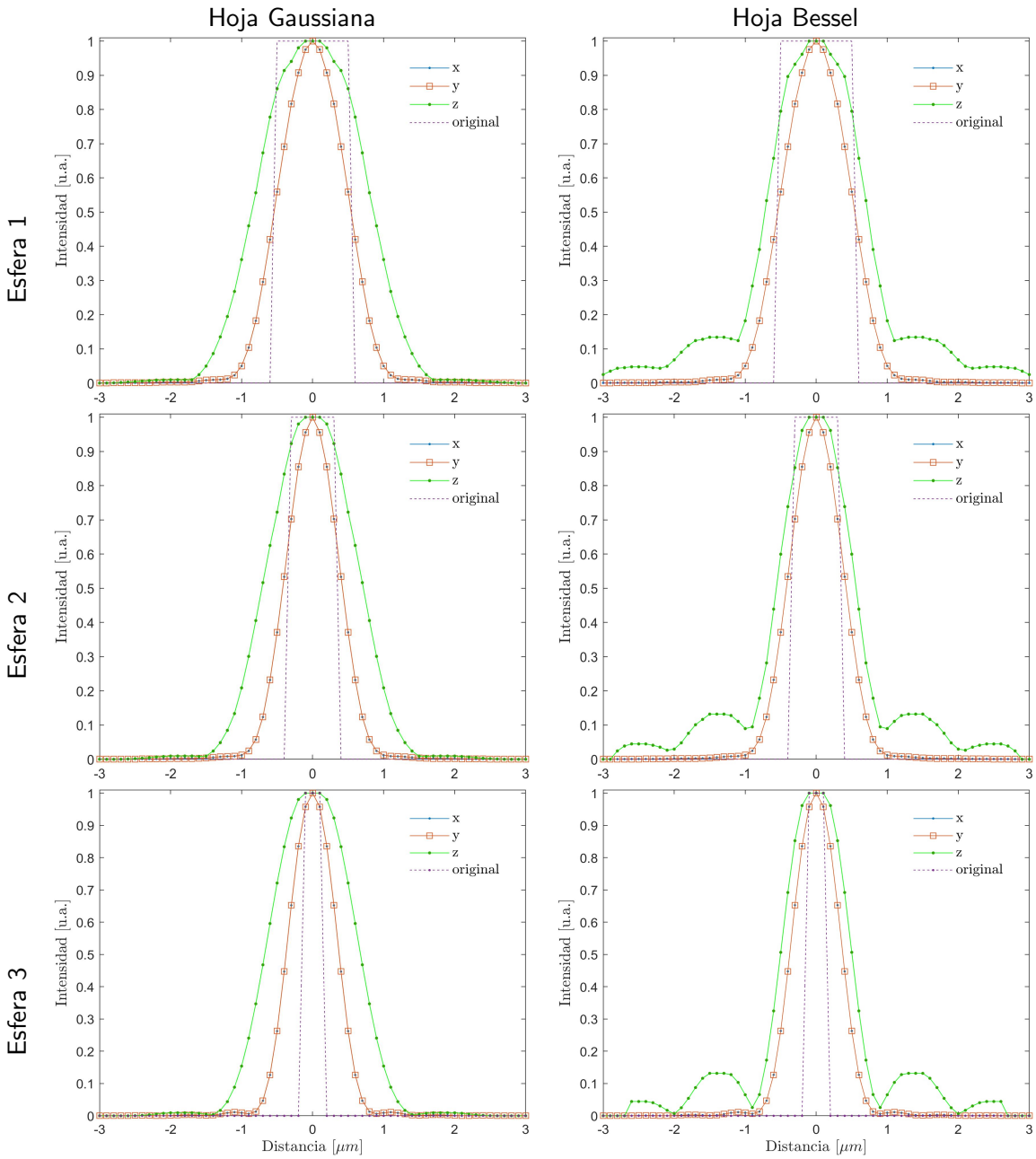

Figura 33. Comparación de perfiles paralelos a ejes x, y, z. Convolución con PSF efectiva con iluminación de hoja Gaussiana (columna izquierda) y hoja Bessel (columna derecha). Se compara su forma y ancho de perfiles, los cuales son medidos como el FWHM.

La figura 33 presenta los diferentes perfiles de cada esfera a lo largo de los tres ejes principales x, y, y z, antes y después de la convolución 3D. La columna izquierda corresponde al sistema con hoja de luz Gaussiana y la columna derecha para la hoja de luz Bessel. Mientras que las esferas 1, 2 y 3, se muestran en la primera segunda y tercera hilera respectivamente. En cada gráfico se muestran cuatro trazas correspondientes a: $i)$ el perfil de intensidad de las esferas sin distorsión (línea negra punteada) y

$ii)$ los perfiles de intensidad de las esferas distorsionadas a lo largo de x (línea con punto azul), y (línea con cuadrado rojo) y z (línea con punto verde). Se observa que para todos los gráficos de la figura, el perfil de la esfera original (sin distorsión) tendrá una forma cuadrada puesto que está formada por voxeles con intensidad 1 dentro del conjunto cerrado; los perfiles en las direcciones x y y serán idénticos en cada caso por la simetría cilíndrica a lo largo del eje z y el perfil en z mostrará mayor distorsión por la gran influencia del la hoja de iluminación.

Tabla 6. Diámetros de esferas después de la Convolución tridimensional, medidos como FWHM.

		Hoja Gaussiana			Hoja Bessel		
	Original [μm]	x [μm]	y [μm]	z [μm]	x [μm]	y [μm]	z [μm]
Esfera 1	1.0	1.0	1.0	1.8	1.0	1.0	1.4
Esfera 2	0.6	0.8	0.8	1.4	0.8	0.8	1.2
Esfera 3	0.2	0.8	0.8	1.4	0.8	0.8	1.0

Analizando el caso de la esfera 1 (primera hilera de la figura 33) para esferas mayores al límite de resolución lateral, ambos perfiles en x y y muestran un ancho muy similar al diámetro de las esferas originales (línea punteada) tanto en el caso de hoja Gaussiana como de hoja Bessel. En consecuencia, para esferas mayores a la resolución del sistema, la convolución tridimensional no resulta en un gran aumento en su diámetro pero sí produce un cambio en la distribución de intensidad. Esto se puede entender del proceso de convolución ya que entre más grande sea la esfera comparado con la PSF el efecto del ensanchamiento será minimo y el efecto del cambio de intensidad se dará sólo en la parte extrema de las esferas. En contraste, para los casos de las esferas 2 y 3 (segunda y tercera hilera, respectivamente) de la figura 33; es decir, esferas con tamaños iguales o menores al límite de resolución, es más fácil apreciar un aumento respecto a su tamaño original, siendo más visible cuando la microesfera es mucho menor a dicho límite. En otras palabras, el sistema óptico podrá resolver sólo objetos con un tamaño igual o mayor a la resolución del sistema. Estructuras u objetos con tamaños menores a este valor, se verán con un ancho muy próximo a la resolución del sistema como es el caso de la esfera 3.

La Tabla 6 resume los diferentes valores de anchos para cada perfil de la figura 33. Es importante resaltar que los valores de las esferas para el sistema de hoja Bessel son más pequeños que para la hoja Gaussiana. Esto se debe a que se está ignorando los lóbulos al considerar el ancho FHWM, en la práctica, sin embargo, a veces no es posible distinguir los lóbulos y las esferas dan la impresión de tener menos resolución para el caso Bessel que para el caso Gaussiano.

4.3. Deconvolución 3D

El resultado del método de deconvolución 3D desarrollado en esta tesis, aplicado a las esferas convolucionadas con hojas de luz láser para simular las imágenes que se obtienen experimentalmente en este típo de microscopía, se muestra en las figura 34. En la cual se puede observar las esferas partidas a la mitad para el caso de hoja de luz Gaussiano (Izquierda) y Bessel (Derecha). Un detalle muy satisfactorio, es notar que pareciera que fueran dos figuras repetidas, lo cual no lo son. Si se observa detenidamente la esfera 1, se puede aprerciar mejor resulución tanto lateral como axial para el caso del sistema de hoja de luz Bessel. Para visualizar mejor este resultado, se realiza un análisis similar al que se ha realizado en las secciones anteriores, mediante el trazo de perfiles de esferas ahora deconvolucionadas.

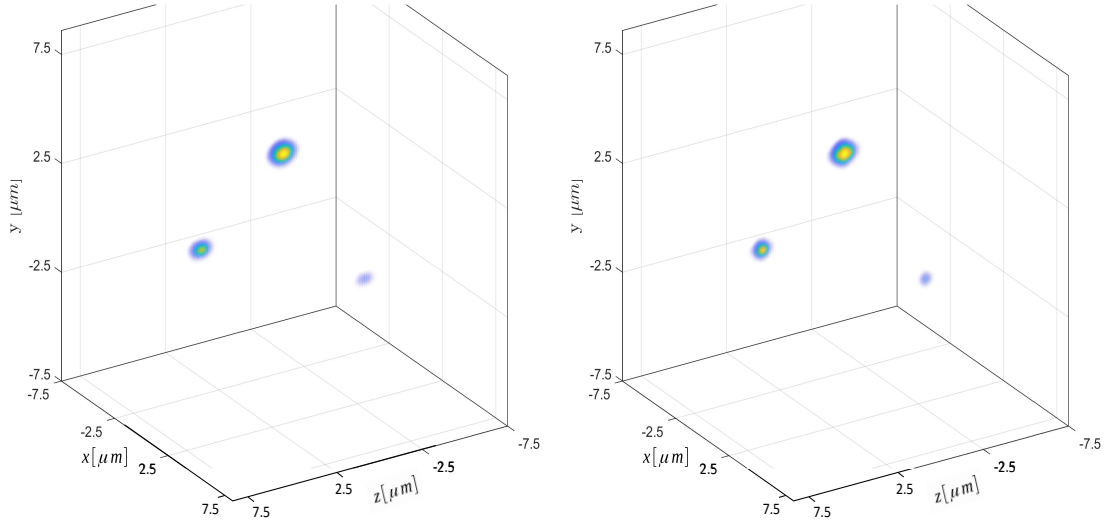

Figura 34. Imagen 3D de las esferas 1, 2 y 3 después del proceso de deconvolución para un sistema de hoja de luz con hoja Gaussiana (Izquierda) y Bessel (Derecha). Las imágenes muestran la mitad de las esferas.

4.3.1. Comparación en la Deconvolución 3D entre iluminación con hoja Gaussiana y Bessel

La figura 35 muestra el corte en el plano central yz (en $x = 0$) de las imágenes de la figura 34 y se compara con la imagen de las esferas sin convolucionar. Si se compara esta imagen con la figura 32 de la sección anterior, la cual muestra el imágenes de la esferas convolucionadas con hojas Gaussianas y Bessel, se puede apreciar el mejoramiento en la imagen. De hecho, cabe enfatizar aquí que, el la práctica, las imágenes adquiridas bajo un microscopía de hoja de luz se aprecian como en esa figura 32; es decir, comúnmente no se realiza un proceso de deconvolución. Eso se decide así dado que varias estructuras de la imagen están por encima del límite de resolución y, como ya se explicó arriba, el efecto de la

deformación no es muy evidente en la resolución lateral, siendo evidente sólo en la resolución axial, sobre todo cuando la hoja de luz es más grande que el objeto. Por lo tanto, con la figura 35 queda demostrado aquí que es posible mejorar la resolución de las imágenes 3D si se realiza un proceso de deconvolución 3D siendo mejor para el caso de hojas de luz Bessel. Este resultado concuerda con resultados experimentales y de simulación realizados por (Luna-Palacios et al., 2022; Luna-Palacios, 2022).

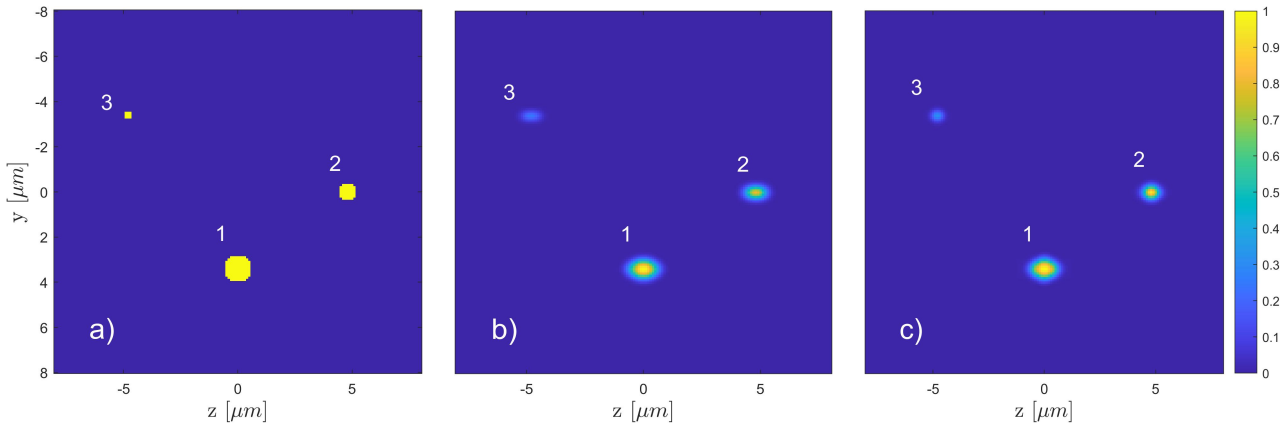

Figura 35. Comparativa corte 2D de las esferas originales (a) sin deconvolucionar y deconvolucionada para el caso de iluminación con de hoja Gaussiana (b) y el caso de hoja de luz Bessel (c).

En la figura 36 se grafican los diferentes perfiles de cada esfera a lo largo de los tres ejes principales x, y, y z, después de la deconvolución 3D. La columna izquierda corresponde al sistema con hoja de luz Gaussiana y la columna derecha para la hoja de luz Bessel. Las trazas de las esferas 1, 2 y 3, se muestran en la primera, segunda y tercera hilera, respectivamente. Se sigue la misma nomenclatura para la figura 33; esto es, cada figura muestra cuatro trazas correspondientes a: $i)$ el perfil de intensidad de las esferas sin distorsión (línea negra punteada) y $ii)$ los perfiles de intensidad de las esferas deconvolucionadas a lo largo de x (línea con punto azul), y (línea con cuadrado rojo) y z (línea con punto verde). La Tabla 7 resume los difrentes valores de anchos FWHM para cada perfil de la figura 36.

Vale la pena en este momento resaltar que, hablar de una completa reconstrucción de las esferas deformadas a las originales es una idealización. En la práctica, la deconvolución no reconstruye por completo al objeto. Idealmente las trazas de las esferas deconvolucionadas deberían tener la misma forma cuadrada que originalmente se tenía y poseer un ancho igual (no mayor) al de la esfera original.

No obstante, en la figura 36 se puede observar que todas las trazas preservan un perfil de intensidad tipo Gaussiana y en la mayoría de los casos tienden a tener un ancho FWHM igual o ligeramente menor al ancho de las esferas originales. Como resultado de no recuperar una forma cuadrada, las esferas se

ven difuminadas en su intensidad pero con un diámetro que tiende a ser el diámetro original, tal y como se aprecia en la figura 35. Para visualizar el ancho FWHM de cada perfil, la tabla 6 resume los valores de anchos para cada perfil de la figura 36.

En ese contexto, analizando el caso de la esfera 1 (primera hilera de la figura 36) para esferas mayores a la resolución lateral con la ayuda de la Tabla 7, es posible notar que ambos perfiles en x y y, logran un ancho FWHM de $0.8\ \mu m$ tanto en el caso de hoja Gaussiana como de hoja Bessel; esto es, se llega a un valor similar al diámetro de la esfera original de $1\ \mu m$ (línea punteada). En contraste, para esferas con dimensión menor a la resolución del sistema, se pudiera decir que para los perfiles a lo largo del eje z no se recupera el ancho original en el caso de iluminación Gaussiana, ya que se obtienen valores de 0.8 μm para la esfera 2 y $0.6\ \mu m$ para la esfera 3 (la más pequeña). Como consecuencia la esfera sigue con la tendencia a verse más ancha axialmente pero ciertamente con tendencia hacia el límite de resolución. Independientemente de esto, el resultado más importante de esta deconvolución es que para el caso de la hoja Bessel los lóbulos laterales desaparecen.

Tabla 7. Diámetros de esferas después de la deconvolución tridimensional, medidos como FWHM.

		Hoja Gaussiana			Hoja Bessel		
	Original $[\mu m]$	x $[\mu m]$	y $[\mu m]$	z $[\mu m]$	x $[\mu m]$	y $[\mu m]$	z $[\mu m]$
Esfera 1	1.0	0.8	0.8	1.0	0.8	0.8	1.0
Esfera 2	0.6	0.6	0.6	0.8	0.6	0.6	0.6
Esfera 3	0.2	0.4	0.4	0.6	0.4	0.4	0.4

Para las esfera 2 y 3 (segunda y tercera hilera de la figura 36), para los casos Gaussiano y Bessel, los perfiles en x y y tienen un diámetro de $0.6\ \mu m$ muy cercano a la esfera original de $0.6\ \mu m$ (línea punteada). Mientras que a lo largo z el caso hoja Bessel (más que el Gaussiano) tiende a recuperar anchos más cercanos al límite de resolución axial. En otras palabras, para objetos con tamaños menores a los limites laterales o axiales del sistema, el tamaño observado será muy próximo a estos límites de resolución. Pero más importante es ver que el haz Bessel resuelve mejor que el haz Gasussiano a lo largo del eje z.

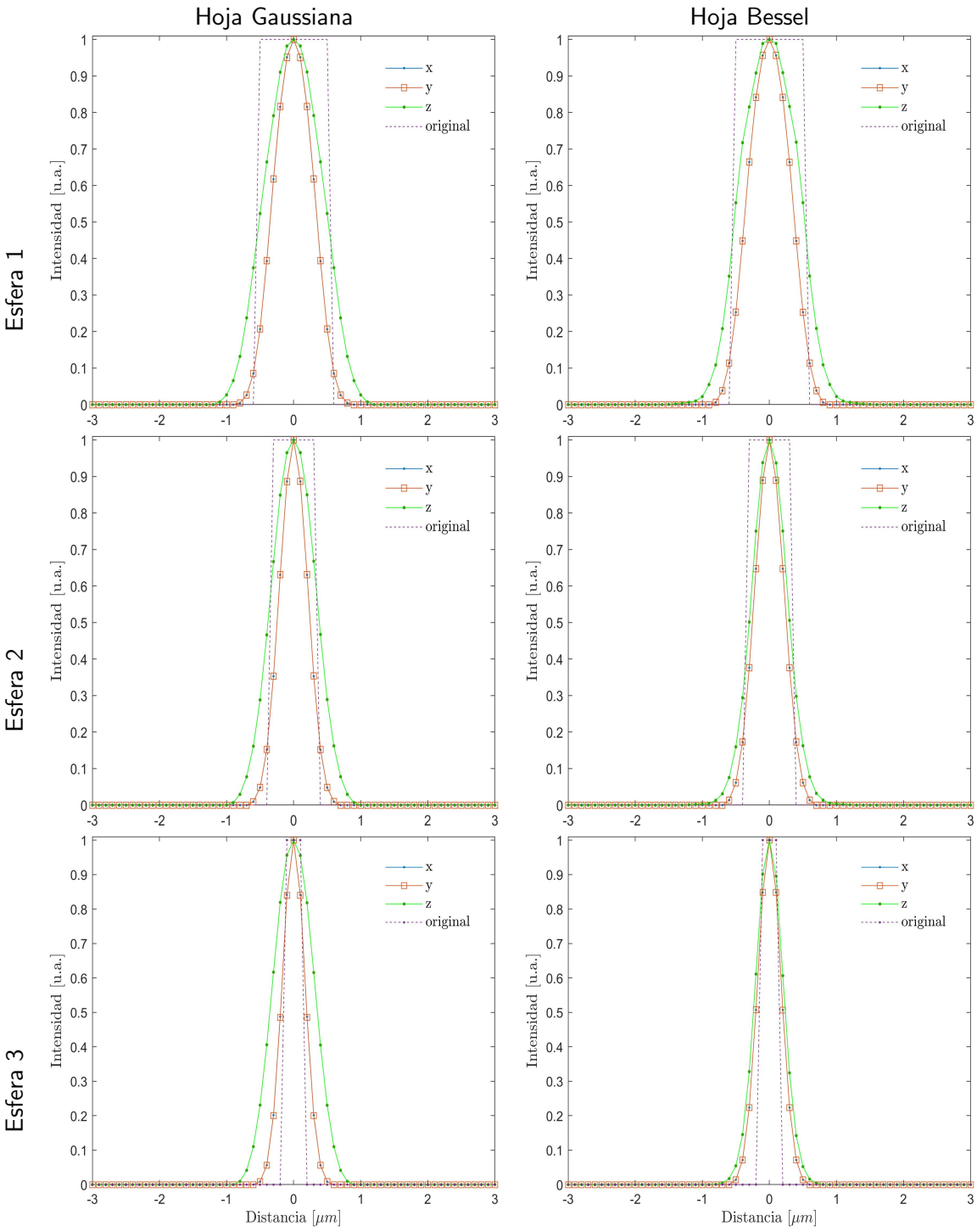

Figura 36. Perfiles de esferas deconvolucionadas paralelos a ejes x, y, z.

4.3.2. Aplicación a imágenes experimentales

Finalmente, esta sección presenta la aplicación de deconvolución tridimensional a imágenes obtenidas en el laboratorio utilizando la PSF efectiva calculada en la sección 4.1. Las imágenes corresponden a peritecios (*Sordaria macrospora*), un hongo filamentoso utilizado como organismo modelo en biología, las cuales fueron adquiridas y publicadas recientemente por el grupo de Microscopía Óptica Avanzada del CICESE (Luna-Palacios et al., 2022). Las imágenes muestran el volumen de estas muestras las cuales fueron construidas a partir de 199 planos de 512x640 pixeles en cada imagen lateral). En el muestreo lateral se tiene una escala de 1pixel $= 0.49\mu m$, mientras que la resolución axial fue de $0.2\mu m/pix$.

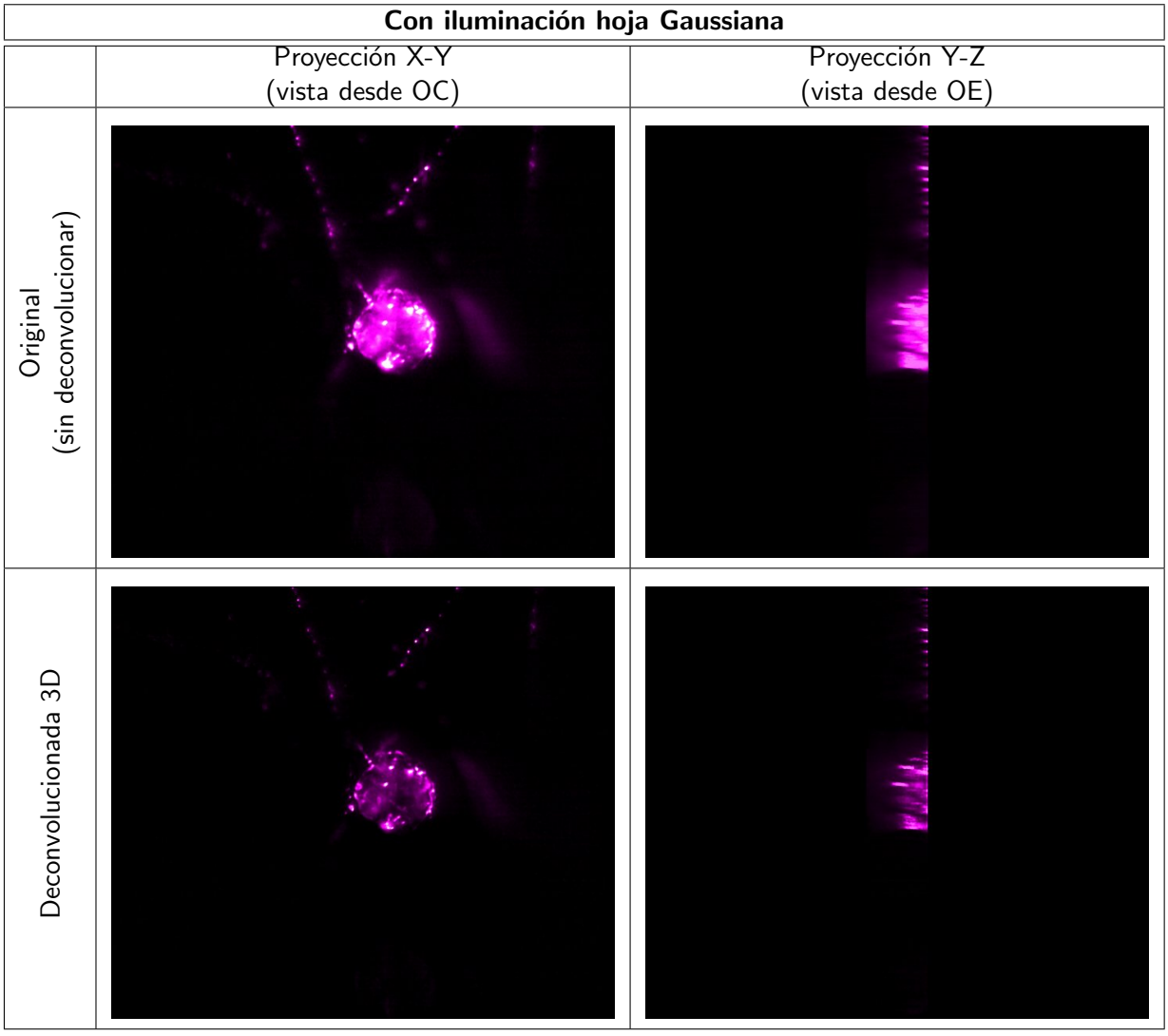

Figura 37. S. macrospora, peritecios a 7 días de crecimiento. Imágenes tomadas por Yryx Luna.

En la figura 37 se compara la proyección lateral y axial, de la imagen obtenida en el laboratorio con

microscopía de hoja de luz Gaussiana (primera hilera) con respecto a la imagen deconvolucionada (segunda hilera). Similarmente, la figura 38 muestra la respectiva comparación de la imagen obtenida en el laboratorio en con microscopía de hoja de luz Bessel (primera hilera) con respecto a la imagen deconvolucionada. En ambos casos es posible apreciar una mejor resolución y un mejor contraste en diferentes estructuras. Pero la contribución máxima en este trabajo es obtener la reconstrucción axial, la cual se muestra en la imagen derecha en de la segunda hilera en ambas figuras en donde también se aprecia una mejor calidad de imagen en cuanto a resolución y contraste como consecuencia de la deconvolución 3D.

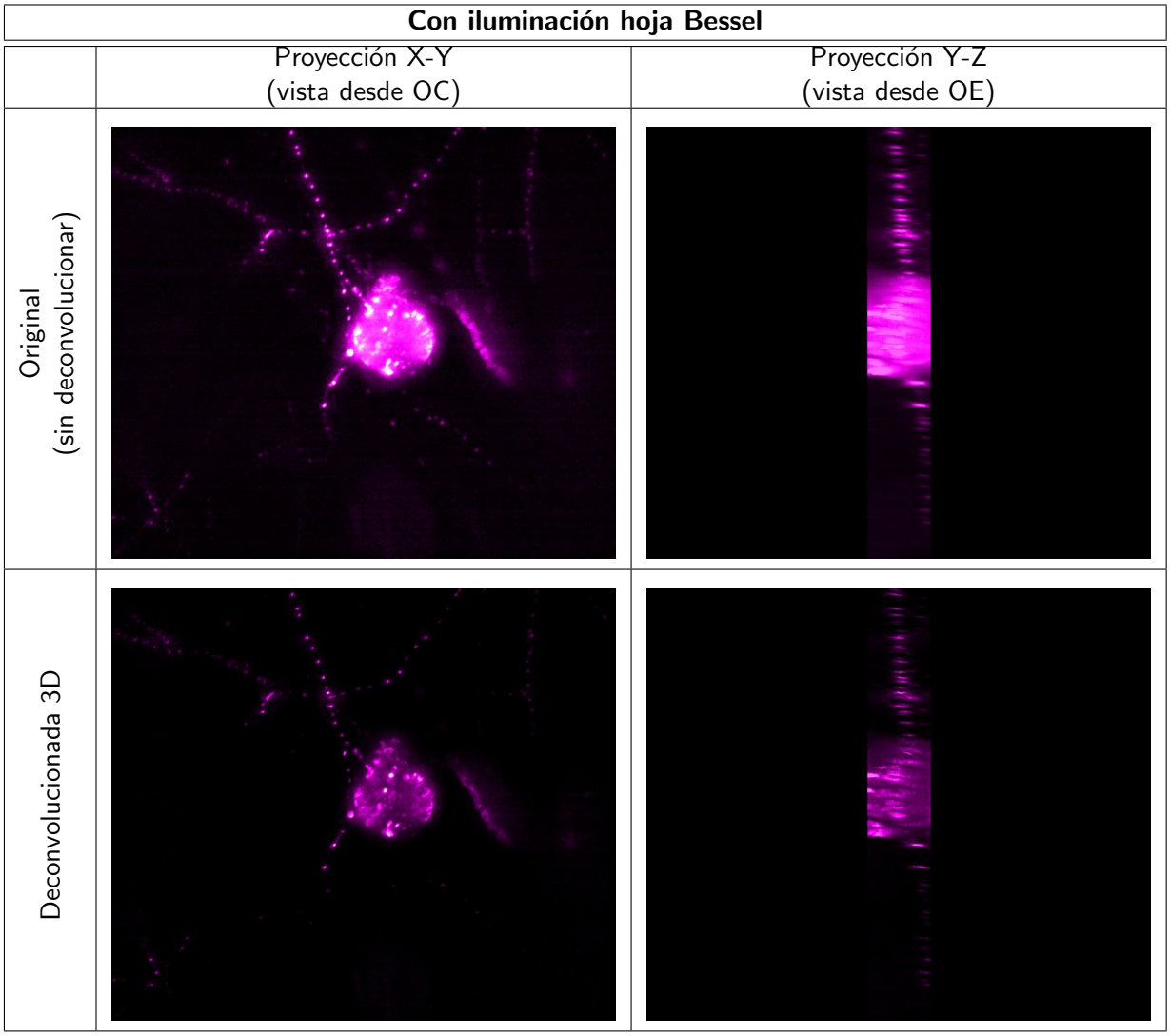

Figura 38. S. macrospora. Imágenes originales adquiridas experimentalmente por Yryx Luna. Se presenta el caso de deconvolución con PSF efectiva con hoja de luz Bessel.

Capítulo 5. Conclusiones

En este trabajo se presentó la metodología para simular numéricamente los procesos de convolución y deconvolución 3D en un sistema de microscopía de hoja de luz láser con hojas de luz Bessel y Gaussianas. Con base en las simulaciones, se realizó un análisis comparativo en espacio (x, y, z) y frecuencias espaciales (f_x, f_y, f_z) entre las funciones de punto extendido obtenidas para cada una de estas dos diferentes configuraciones de iluminación. Análisis del cual se desprenden las siguientes conclusiones:

Al ser la PSF efectiva resultado del producto de la intensidad de la hoja de luz con la PSF del objetivo de colección, existe una modulación en la PSF efectiva resultante que depende de la configuración de hoja de luz utilizada. En esta modulación se presenta únicamente a lo largo del eje-z (es decir, a lo largo de la profundidad de campo del objetivo de colección) y en forma de lóbulos (máximos de intensidad) que decaen al alejarse del plano focal. La modulación es más pronunciada cuando se utiliza una hoja de luz Bessel respecto a la de la hoja de luz Gaussiana. Como consecuencia del punto anterior, la resolución axial en un microscopio de hoja de luz puede mejorar siempre y cuando la hoja sea más delgada que la profundidad de campo del objetivo de colección. Es decir, la resolución axial en un sistema de hoja de luz está definida por ambos objetivos, el de iluminación y el de colección.

La resolución lateral en un microscopio de hoja de luz se mantiene igual a la de un sistema sin iluminación plana (sin hoja de luz). Es decir, la resolución lateral del sistema está definida por el objetivo de colección y es independiente de cualquier forma de iluminación.

El efecto de la modulación en la PSF inducida por el tipo de hoja de luz es más pronunciado cuando se utiliza una hoja de luz Bessel. Como es de esperarse, dado que se derivan de las PSF efectivas, las simulaciones resultantes de obtener las MTF para los diferentes casos (sin hoja, con hoja Gaussiana y hojas Bessel) arrojan las mismas conclusiones arriba mencionadas pero, además, hacen evidente dos cosas:

La resolución axial es mayor para sistemas con hojas de luz Bessel. El contraste obtenido con hoja de luz Bessel es inicialmente menor al obtenido con hoja Gaussiana para frecuencias bajas y mejora para frecuencias mayores.

Asimismo, se desarrolló un algoritmo para la adquisición de imágenes bajo el sistema de microscopía de hoja de luz, el cual reproduce la distorsión (elongamiento) comúnmente observada en las imágenes experimentales de microesferas fluorescentes, tanto en la vista lateral como axial. Dicho algoritmo condujo, a su vez, al entendimiento del proceso de convolución tridimensional en este tipo de sistemas

de microscopio, mediante la simulación de adquirir imágenes de tres microesferas de tamaños mayores, cercanos y menores a la resolución del sistema. De esta simulación se derivan las siguientes conclusiones:

Para esferas con tamaño mayor a la resolución lateral del sistema: La elongación lateral es mínima induciéndose sólo un ligero efecto de difuminado en los bordes de las esferas. Para esferas con tamaño cercanos o menores a la resolución lateral del sistema: La elongación lateral tenderá a mantenerse al valor de la resolución del sistema además del efecto de difuminado en los bordes de las esferas. En contraste el efecto de elongación a lo largo de la resolución axial (eje-z) será, para cualquier tamaño mayor a la resolución lateral del sistema. Esto como consecuencia de los lóbulos resultantes de la modulación de la PSF por lo que la elongación es más pronunciada para el caso de iluminación Bessel.

Finalmente, una vez comprendido el proceso de convolución, se desarrolló un algoritmo para realizar la deconvolución tridimensional y con ello procurar reproducir el objeto real. Esta simulación se desarrolló en las mismas esferas y en imágenes adquiridas en el laboratorio. Con base a los resultados obtenidos se derivan las siguientes conclusiones:

Para imágenes de esferas se recupera parcialmente el tamaño de las esferas para ambos tipos de iluminación, Gaussiano y Bessel. Si bien el tamaño lateral es muy cercano al de las esferas originales, el tamaño axial sigue siendo elongado. Esto se atribuye a la inevitable pérdida de información de planos al utilizar una hoja que no es infinitesimalmente delgada. Cuando se comparan las imágenes experimentales ya deconvolucionadas, es posible comprobar la mejora en la resolución axial y en el contraste, predicha con las simulaciones de las esferas, cuando se adquieren con la configuración Bessel.

Literatura citada

Becker, K., Saghafi, S., Pende, M., Sabdyusheva-Litschauer, I., Hahn, C. M., Foroughipour, M., Jährling, N., y Dodt, H.-U.. 2019. Deconvolution of light sheet microscopy recordings. Scientific reports, 9(1), 1–14.

Biggs, D. S.. 2010. 3d deconvolution microscopy. Current Protocols in Cytometry, 52(1), 12–19.

Boreman, G. D.. 2001. Modulation transfer function in optical and electro-optical systems, Vol. 4. SPIE press Bellingham, Washington.

Born, M. y Wolf, E.. 2013. Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light. Elsevier.

Can-Uc, B., Montes-Frausto, J. B., Juarez-Moreno, K., Licea-Rodriguez, J., Rocha-Mendoza, I., y Hirata, G. A.. 2018. Light sheet microscopy and sral2o4 nanoparticles codoped with eu2+/dy3+ ions for cancer cell tagging. Journal of Biophotonics, 11(6), pp. e201700301.

Chao, J., Ram, S., Ward, E. S., y Ober, R. J.. 2016. Investigating the usage of point spread functions in point source and microsphere localization. En: Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXIII..SPIE, Vol. 9713, 247–266.

Cormen, T. H.. 2009. Introduction to algorithms. MIT press.

Durnin, J., Miceli Jr, J., y Eberly, J.. 1987. Diffraction-free beams. Phys. Rev. Lett, 58(15), 1499–1501.

Elisa, Z., Toon, B., De Smedt, S. C., Katrien, R., Kristiaan, N., y Kevin, B.. 2018. Technical implementations of light sheet microscopy. Microscopy Research and Technique, 81(9), 941–958.

Fresnel, A.. 1819. Mémoire sur la diffraction de la lumière. da p. 339 a p. 475: 1 tav. ft; AQ 210, p. 339.

Gao, L., Shao, L., Chen, B.-C., y Betzig, E.. 2014. 3d live fluorescence imaging of cellular dynamics using bessel beam plane illumination microscopy. Nature protocols, 9(5), 1083–1101.

Girkin, J. M. y Carvalho, M. T.. 2018. The light-sheet microscopy revolution. Journal of Optics

Goodman, J.. 1996. Introduction to Fourier Optics, 2McGraw-Hill. New york.

Hecht, E.. 2002. Optics, 5th Ed.. Pearson Education India.

Huisken, J., Swoger, J., Del Bene, F., Wittbrodt, J., y Stelzer, E. H.. 2004. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. Science, 305(5686), 1007–1009.

Huygens, C.. 1885. Traite de la lumiere: Où sont expliquées les causes de ce qui luy arrive dans la reflexion, & dans la refraction. Et particulierement dans l'etrange refraction du cristal d'Islande. chez Pierre vander Aa.

Huygens, C., Young, T., Fresnel, A. J., y Arago, F.. 1900. The wave theory of light: memoirs of Huygens, Young and Fresnel, Vol. 15. American Book Company.

Kafian, H., Lalenejad, M., Moradi-Mehr, S., Birgani, S. A., y Abdollahpour, D.. 2020. Light-sheet fluorescence microscopy with scanning non-diffracting beams. Scientific reports, 10(1), 1–12.

Keller, P. J., Schmidt, A. D., Wittbrodt, J., y Stelzer, E. H.. 2011. Digital scanned laser light-sheet fluorescence microscopy (dslm) of zebrafish and drosophila embryonic development. Cold Spring Harbor Protocols, 2011(10), pdb–prot065839.

Kino, G. S. y Corle, T. R.. 1996. Confocal scanning optical microscopy and related imaging systems. Academic Press.

Licea-Rodriguez, J., Figueroa-Melendez, A., Falaggis, K., Sánchez, M. P., Riquelme, M., y Rocha-Mendoza, I.. 2019. Multicolor fluorescence microscopy using static light sheets and a single-channel detection. Journal of biomedical optics, 24(1), 016501.

Luna-Palacios, Y. Y.. 2022. Study of multiple Bessel and Gaussian light-sheet fluorescence excitations for large field of view multicolor imaging. Doctorado en Ciencias en Óptica con orientación en Optoelectrónica. Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

Luna-Palacios, Y. Y., Licea-Rodriguez, J., Camacho-Lopez, M. D., Teichert, I., Riquelme, M., y Rocha-Mendoza, I.. 2022. Multicolor light-sheet microscopy for a large field of view imaging: A comparative study between bessel and gaussian light-sheets configurations. Journal of Biophotonics, 15(6), 202100359. doi: https://doi.org/10.1002/jbio.202100359.

Olarte, O. E., Licea-Rodriguez, J., Palero, J. A., Gualda, E. J., Artigas, D., Mayer, J., Swoger, J., Sharpe, J., Rocha-Mendoza, I., Rangel-Rojo, R., y Loza-Alvarez, P.. 2012. Image formation by linear and nonlinear digital scanned light-sheet fluorescence microscopy with gaussian and bessel beam profiles. Biomed. Opt. Express, 3(7), 1492–1505. doi: 10.1364/BOE.3.001492.

Olarte, O. E., Andilla, J., Gualda, E. J., y Loza-Alvarez, P.. 2018. Light-sheet microscopy: a tutorial. Adv. Opt. Photon., 10(1), 111–179. doi: 10.1364/AOP.10.000111.

Perrin, S. y Montgomery, P.. 2018. Fourier optics: basic concepts. arXiv arXiv:1802.07161. doi: 10.48550/ARXIV.1802.07161.

Rocha, M. D., Düring, D. N., Bethge, P., Voigt, F. F., Hildebrand, S., Helmchen, F., Pfeifer, A., Hahnloser, R. H. R., y Gahr, M.. 2019. Tissue clearing and light sheet microscopy: imaging the unsectioned adult zebra finch brain at cellular resolution. Frontiers in neuroanatomy, 13,13.

Saleh, B. E. y Teich, M. C.. 2019. Fundamentals of photonics. john Wiley & sons.

Song, I., Yoo, H., Choo, J., y Gweon, D.-G.. 2005. Measurement of point-spread function (psf) for confocal fluorescence microscopy. En: Advanced Characterization Techniques for Optics, Semiconductors, and Nanotechnologies II..SPIE, Vol. 5878, 368–376.

Čižmár, T. y Dholakia, K.. 2009. Tunable bessel light modes: engineering the axial propagation. Opt. Express, 17(18), pp. 15558–15570. doi: 10.1364/OE.17.015558.

Zhang, W., Zhang, H., Sheppard, C. J., y Jin, G.. 2020a. Analysis of numerical diffraction calculation methods: from the perspective of phase space optics and the sampling theorem. JOSA A, 37(11), 1748–1766.

Zhang, Z., Gou, D., Feng, F., Zheng, R., Du, K., Yang, H., Zhang, G., Zhang, H., Tao, L., Chen, L., et al.. 2020b. 3d hessian deconvolution of thick light-sheet z-stacks for high-contrast and high-snr volumetric imaging. Photonics Research, 8(6), 1011–1021.

Anexos

Propagación de haces con simetría rotacional

Se implementa el siguiente código en MATLAB para la simulación de propagación de un haz Gaussiano que pasa por un objetivo de microscopio.

```
%%% Condiciones para el campo de entrada
clear; %close
r1=[0:0.0001:5]'; %vector para muestreo. Todas las distancias en [mm]
lam=570*1e-6;
k=2*pi/lam;

%%%  En las filas se tiene
pxR = 0.0001;
n=0.060/pxR;
l_fila = pxR*n; %en micras
l_columna =pxR*n; %en micras
hipR=sqrt(l_fila^2+l_columna^2);
%%% Distancia (Diagonal completa de la imagen 2D)
%%%  para llenar hasta la esquina del cuadrado de la ventana final.
r2=[0:pxR:hipR/2]';
f=10; % distancia focal de la funcion de lente delgada.
pxz= 0.0001; %muestreo en milimetros para z.
n_z=.060/pxz;  % 0.060 la distancia total en Z en la cual quiero observar
%%% el campo alrededor del foco.
l_z=pxz*n_z;
z_extra=0.0; % Por si deseo un extra en distancia en mm, despues del intervalo
%%% total para z.
z= [f-l_z/2-z_extra:pxz:f+l_z/2+z_extra]';
nz=length(z)
%nr=length(r2)
%%%%% Generando haz Gaussiano DE COLECCION con abertura
%%%Una abertura circular LIMITADORA
Upupila=zeros(length(r1),1);
%imagesc(Ui)
radio_e=8.972/2;
%argumento es el diametro del la abertura
pos_temp=find(min(abs(r1-radio_e))==abs(r1-radio_e) );
Upupila(1:pos_temp)=1;
```

```
%imagesc([min(x) max(x) ],[min(y) max(y)], Upupila )
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%% CARACTERISTICAS PARA EL HAZ GAUSSIANO %%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
zG=0.00001;
W0=radio_e; %8.972/2; % Radio del haz gaussiano en su CINTURA, a propagar EN ...
    MILIMETROS
% representa el ancho de la gaussiana cuando la intensidad cae a 1/e.
% O sea,  %%%%   W0 = HW1/eM   %%%
Egauss = gaussiano1D(W0, lam, r1, zG  );
% zg0=1.5; %Distancia de Rayleigh
display("Multiplica Upupila y Ugauss")
Ui_i=Upupila.*Egauss; %Campo a propagar, Gaussiano con fase de lente y limitado ...
    por una pupila circular.
display("Guardo producto en Ui=Upupila*Ugauss")
display("Borrando Campo Upupila y Ugauss")
clear -v Upupila Egauss;
%%%%% termina generacion de campo de entrada Gaussiano con Pupila
%%%%% Agregando la fase de una lente al campo de entrada.
t_l = ThinLens1D(lam, f, r1);
Ui=Ui_i.*t_l;
clear -v Ui_i t_l;
%%%%% Calculo propagacion usando la integral de Huygens-Fresnel en cilindricas %%%%
Uc=[];  Uc = propagadorCilindricas( z, lam, r1, r2, Ui );
%%% Campo resultante fue calculado como la NORMA
%%% CUADRADA (Intensidad)
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
Energia=[];  Energia = energiaCilindricas( nz, Uc, r2, z ); %% Aqui mismo se ...
    grafica la Energia
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%% Seccion para crear el plano en 2D a partir de rotar el perfil y generar
%%%%% un campo con simetria rotacional.
lfila_pix    =  find(min(abs(l_fila/2-r2))==abs(l_fila/2-r2));
lcolumna_pix =  find(min(abs(l_columna/2-r2))==abs(l_columna/2-r2));

Uc_3D = generaCampo3DBarridoAng(lfila_pix, lcolumna_pix, nz, r2, Uc);
%%% Campo resultante 3D como NORMA CUADRADA
% imagesc(Uc_3D(:,:,2))
%%% Obtiene perfil lateral de propagacion.
%Uc_lat(:,:)=Uc_3D(:,round(size(Uc_3D,2)/2),:);
%
```

```
close all;
guardaData=strcat('./pruebadataGauss/pruebaGaussUc','CO_f',num2str(round(f)),'Ui',
num2str(length(r1)),'lam',num2str(lam*1e6),'r_e',
num2str(radio_e*1000),'um-paraEsf.mat')
% clear -v Ui r1;
  save(guardaData,'-v7.3');
%
load('./pruebadataGauss/pruebaGaussUcCO_f10Ui50001lam570r_e4486um-paraEsf.mat')
f_CO=f
% figure
% imagesc([min(z) max(z)],[-max(r2) max(r2)],sqrt(Uc_lat)   )
U_Gauss=sqrt(Uc_3D)/max(sqrt(Uc_3D), [], 'all');
z_CO=z;
```

Convolución tridimensional

En el cógido siguiente se generan esferas con voxeles de valor unitario y se genera la convolución tridimensional por el barrido de la muestra sobre la PSF efectiva seccionada.

```
%%% Se generan esferas con voxeles de valor 1.
%%% convolucion de las esferas con una PSF_efectiva que involucra una hoja
%%% de luz de haz BESSEL. Aqui se trabaja con PSF para ESferas, es decir,
%%% con dimensiones de matriz 3D en cubo de mismas dimensiones.
load('./pruebaPSF/pruebaPSFHojaBesselUcEOf18COf10Ui50001r_eCO4486um-paraEsf.mat' );
r=[flip(-r2') r2(2:end)']*1000;
% carga PSF de Coleccion
load('./pruebadataGauss/pruebaGaussUcCO_f10Ui50001lam570r_e4486um-paraEsf.mat', ...
    'Uc_3D')
% f_CO=f;
U_GaussCO=sqrt(Uc_3D)/max(sqrt(Uc_3D), [], 'all');
clear  Uc_3D;
%
hx=0.5; hy=0.5; hz=0.5;
[FW_CO p_xCO p_yCO p_zCO] = perfilesPSF(U_GaussCO, hx, hy, hz);
% posiciones de centros de esferas
R0_1= [ 0  0.0034   0;
       0 -0.0  0.0048;
       0 -0.0034 -0.0048  ];  % posiciones x0, y0, z0, de cada esfera.
  %%% La primer esfera es la de mayor tamano.
```

```
20    %%% radios de esferas.
21    rho_1= [ 0.0005;
22           0.0003;
23           0.0001 ];
24        Dim1= size(PSF, 1); Dim2= size(PSF,2); Dim3= size(PSF,3);
25   U_b1 = generaEsferas3D( R0_1 , rho_1, Dim1, Dim2, Dim3, r2 );
26  %%% Determino la posicion en px de U_b que estaria siendo iluminada, sera
27  %%% la variable que yo corro para ir "moviendo" la esfera sobre el volumen
28  %%% que puede iluminar el ancho de hoja.
29  %%% El centro sera el punto focal para la propagacion del Gaussiano o PSF.
30  c_zEsfi = f_CO - 0.008; c_zEsff = f_CO + 0.008; %% medidas en MILIMETROS
31  paso_zEsf = 0.0001;
32  z_esfC = c_zEsfi: paso_zEsf : c_zEsff;
33  length(z_esfC)
34  %%%
35  anchoUM=FW_CO(3)*(r2(2)-r2(1))*1000; % FW_CO(3); %%% seriaa el ancho que obtuve ...
        de la psf de coleccion en micras
36  [PSF_ilum, p_anchoCut, z_ilum, HWpix] =  obtebPSFilum(PSF, anchoUM,z_CO );
37  %%% COMIENZA LA CONVOLUCION
38  clear D_mean D_max C_mean C_max;
39  [D_mean D_max C_mean C_max] = barreEsferasobreHoja(c_zEsfi, c_zEsff, paso_zEsf, ...
        z_CO, HWpix, PSF_ilum, U_b1, 'plano');
40  %%% La ltima variable de la funcion tiene como opciones 'plano', '3D' o
41  %%% 'both' para calcular un metodo o dos en la convolucion. En cada uno se
42  %%% obtiene el maximo y el promedio de cada volumen convolucionado.
43  %%% La convolucion siempre se hace con la NORMA CUADRADA del campo de la
44  %%% PSF introducida en barreEsferasobreHoja que lleva a  la funcion
45  %%% convPlanoPlano.
46  guardaData=strcat('./esferasConvPSFHojaBessel.mat')
47   save(guardaData,'D_max','z_esfC','f_CO','f_EO','r2','-v7.3');
48  %%% Normalizar la matriz convolucionada al maximo en el volumen
49  D_maxN=D_max/max(D_max,[],'all');
50  %%% generando la matrix de D_max en un stack de imagenes tiff para
51  %%% cargarlas en imageJ.
52  imgEsfConv=D_maxCut/max(D_maxCut,[],'all');
53  CampoStack=[];CampoStack=imgEsfConv*2;
54  rutaStack=strcat('./convolucionEsferas11/');
55  guardaStack=strcat(rutaStack,'EsfConv_Dmax-fEO',num2str(f_EO),'mmfCO.tif')
56  imwrite(CampoStack(:,:,1),guardaStack)%,'Mode','lossless')
57  for j=2:size(CampoStack,3);
58      imwrite(CampoStack(:,:,j),guardaStack,'WriteMode','append')
```

```
59 end
```

Deconvolución tridimensional

Deconvolución tridimensional en dos pasos, usando la función de deconvolución Richardson-Lucy de MATLAB

```
1  %%% INICIA EL PROCESO DE DECONVOLUCION
2  PSF_pilummax=max(PSF_ilum,[],3);
3  PSF_pilummean=mean(PSF_ilum,3);
4  n3=size(D_maxN,3);      temp=[];
5
6  D_XYpsfmax=[];
7  %%% Deconvolucion en XY
8  t_decXY=tic
9  for jjj=1:n3;
10     temp(:,:)=D_maxN(:,:,jjj);
11     D_XYpsfmax(:,:,jjj)=deconvlucy(temp,PSF_pilummax,5);
12     temp=[];
13     fprintf('llenando plano en z: %i \n', jjj);
14 end
15 toc(t_decXY)
16
17 PSF_vax=[];
18 PSF_vax(1:size(PSF_ilum,3))=PSF_ilum(round(size(PSF_ilum,1)/2),round(size(PSF_ilum,2)/2), ...
       : );
19 n1=size(D_maxN,1); n2=size(D_maxN,2);
20 D_XYpsfmax_decZ=[];
21 %%% Inicia deconvolucion solo en Z
22 t_decZ=tic
23 for j=1:n1;
24     for jj=1:n2;
25         temp1(1:size(D_XYpsfmax,3))=D_XYpsfmax(j,jj,:);
26         D_XYpsfmax_decZ(j,jj,:)=deconvlucy(temp1,PSF_vax,5);
27         temp1=[];
28         temp2=[];
29     end
30     fprintf('llenando la fila %d \n', j);
31 end
```

```
toc(t_decZ)
%%% Guarda los datos de las esferas ya DECONVOLUCIONADAS
guardaData=strcat('./DECONV_HojaBessel.mat')
save(guardaData,'D_maxN','D_XYpsfmax_decZ','z_esfC','f_CO','f_EO','r2','-v7.3');
```

Funciones

- Propagador

```
function Uc = propagagorCilindrias( z, lam, r1, r2, Ui );
Uc=[];
nz= length(z);
nr= length(r2);
k= 2*pi/lam;
tic
ticBytes(gcp);
parfor jjj=1:nz;
    fprintf('Vector de plano generado n = %d \n', jjj)
    for j=1:nr;
        arg1=k*r2(j)*r1/z(jjj);
        M2=exp(i*k*r1.^2/(2*z(jjj)));
        Int=besselj(0,arg1).*M2.*r1.*Ui;
        I=cumtrapz(r1,Int);
        Uc(j,jjj)=(I(end))*conj(I(end))*4*pi^2/(lam*z(jjj))^2;  %%% Se esta ...
            calculando la NORMA CUADRADA
        M2=[]; arg1=[]; Int=[]; I=[];
    end
end
toc
tocBytes(gcp)
end
```

- Función de lente delgada.

```
function t_l = ThinLens1D(lam, f, r1);
k= 2*pi/lam;
    t_l=exp(-i*k/(2*f)*(r1.^2)); %Resulta una matriz de la misma dimension ...
        que r1
```

```
end
```

- Generación de campo 3D a partir de barrido angular.

```
function Uc_3D = generaCampo3DBarridoAng(lfila_pix, lcolumna_pix, nz, r2, Uc);
%
Uc_3D=zeros(2*lfila_pix-1,2*lcolumna_pix-1, nz);
x0=round(size(Uc_3D,1)/2); y0=round(size(Uc_3D,2)/2);
N=size(Uc_3D,1); M=size(Uc_3D,2);
parfor jjj=1:nz;
    fprintf('Plano generado a partir de Perfil %d \n', jjj)
    for j=1:N;
        for jj=1:M;
            r=sqrt((j-x0)^2+(jj-y0)^2);
            r=ceil(r);
            if (r≤length(r2) & r ≠ 0);
                Uc_3D(j,jj,jjj)=Uc(r,jjj);
            elseif (r==0);
                fprintf('Se esta llegando a r=0')
                Uc_3D(j,jj,jjj)=Uc(1,jjj);
            end
        end
    end
end
%
end
```

- Generación de perfil de intensidad Gaussiana unidimensional.

```
function Egauss = gaussiano1D(W0, lam, r1, zG  );
% zg0=1.5; %Distancia de Rayleigh
% W0=radio_e;%8.972/2; % Radio del haz gaussiano en su CINTURA, a propagar ...
    EN MILIMETROS
% representa el ancho de la gaussiana cuando la intensidad cae a 1/e.
% O sea,  %%%%   W0 = HW1/eM   %%%
k= 2*pi/lam;
zg0=(W0^2*pi/lam); %Distancia de Rayleigh
A0=1;
w0=sqrt(lam*zg0/pi); %Ancho del haz en la cintura
```

```
Wz=w0*sqrt(1 + (zG./zg0).^2);      % Ancho del haz a una distancia z de la
    % cintura del haz.
Rz=zG.*(1 + (zg0./zG).^2);    % Radio de curvatura del frente de onda.
% Justo en la cintura, seria radio infinito, i. e. un frente de onda plano.
Egauss=A0*(w0./Wz).*exp(-r1/Wz.^2).*exp(-i*k*zG - i*k*r1./(2*Rz) );
end
```

- Adquisición de imágenes barriendo la muestra sobre PSF efectiva

```
function [D_mean D_max C_mean C_max] = barreEsferasobreHoja(c_zEsfi, ...
    c_zEsff, paso_zEsf, z_CO, hwHM, PSF_ilum, U_b, metodo);
z_esf = c_zEsfi: paso_zEsf : c_zEsff;
nz_esf = length(z_esf);
D_mean=[];  D_max = [];
C_mean=[];  C_max = [];
tfunc = tic;
    for jjj= 1:nz_esf;
        pc_Silum= find( min( abs(z_CO-z_esf(jjj) ) ) == abs(z_CO-z_esf(jjj) ...
            ) , 1 );
        U_bilum = [];
        U_bilum = U_b(:,:, pc_Silum-hwHM : pc_Silum+hwHM);
        fprintf(" Evaluando el barrido para Stack no %d \n", jjj)
    %%% CONVOLUCION Plano a Plano, para un volumen iluminado por hoja de luz.
    switch metodo
        case 'plano'
%             [D_mean(:,:,jjj) D_max(:,:,jjj)] = convPlanoPlano(PSF_ilum, ...
    U_bilum );
            [ D_max(:,:,jjj)] = convPlanoPlano(PSF_ilum, U_bilum );
        case '3D'
            [C_mean(:,:,jjj) C_max(:,:,jjj)] = conv3D(PSF_ilum, U_bilum );
        case 'both'
            [ D_max(:,:,jjj)] = convPlanoPlano(PSF_ilum, U_bilum );
            [C_mean(:,:,jjj) C_max(:,:,jjj)] = conv3D(PSF_ilum, U_bilum );
    end
        %%% D_mean y D_max son matrices de dos dimensiones
        %%% arrojadas por convPlanoPlano. Las voy guardando en un arreglo de
        %%% 3 dimensiones donde la tercera dimension es donde corre el for.
        U_bilum = [];
    end
    toc(tfunc)
```

```
29 %
30 end
```

- Generación de esferas con voxeles de valor 1.

```
1  function [U_b] = generaEsferas3D( R0 , rho, Dim1, Dim2, Dim3, r2 );
2  U_b=zeros(Dim1, Dim2, Dim3);
3  radio_i=0;
4      for n=1:length(rho);
5          U_b = esfera3Dbis(R0(n,1), R0(n,2), R0(n,3), U_b ,rho(n) , radio_i, ...
               r2);
6      end
7  %     imagesc([-max(r2) max(r2)],[-max(r2) max(r2)],U_b( ...
       :,:,round(size(U_b,3)/2) )   )
8  %
9  end
```

```
1  function [C]= esfera3Dbis(x0, y0,z0,A,re, ri, r2)
2  max_x=max(r2);
3
4  b_t=fliplr(r2');
5  x = [-b_t(1:end-1) r2'];
6  p_re = find( abs(r2-re)== min( abs(r2-re) ) );
7  %p_re = p_re -1;
8  p_ri = find( abs(r2-ri)== min( abs(r2-ri) ) );
9  p_ri = p_ri -1;
10 %%% Le quito un pixel, porque antes de eso, considera tambien a cero como
11 %%% un pixel, Lo que es erroneo para medir distancias.
12 p_x0 = find( abs(x-x0)== min( abs(x-x0) ),1 );
13 p_y0 = find( abs(x-y0)== min( abs(x-y0) ),1 );
14 %%% Solo para el caso en que U_b sea un cubo con mismas dimensiones y el
15 %%% vector en z_CO tenga tambien el mismo paso que x & y.
16 p_z0 = find( abs(x-z0)== min( abs(x-z0) ),1 );
17 %
18 C=A; %Matriz a llenar
19 %
20 N=size(C,1); % dimension en filas.
21 M=size(C,2); % dimension en columnas
22 P=size(C,3); % dimension en z (profundidad)
```

```
for i=1:N;
    for j=1:M;
        for k=1:P;
            if(sqrt((i-p_y0)^2+(j-p_x0)^2+(k-p_z0)^2)<p_re) & ...
                (sqrt((i-p_y0)^2+(j-p_x0)^2+(k-p_z0)^2)≥p_ri);
                C(i,j,k)=1;
            end
        end
    end
end
```