



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS**

**Algoritmo de microscopía de superresolución basado en la
Media Desplazada**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

ESLEY TORRES GARCÍA

**Director de Tesis:
Dr. Juan Manuel Rendón Mancha
Centro de Investigación en Ciencias, UAEM**

**Co-Director de Tesis:
Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas
Instituto de Biotecnología, UNAM**

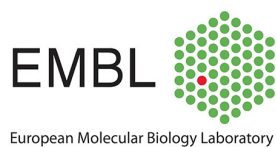
CUERNAVACA, MORELOS

2023

Esta tesis fue desarrollada en:



con la colaboración de las siguientes instituciones:



y el financiamiento de:



Y por blando que sea un objeto,
puede ser algún día el eje en que descansa la rueda del universo.

Walt Whitman

Tiene el leopardo un abrigo
en su monte seco y pardo,
yo tengo más que el leopardo
porque tengo un buen amigo.

Jose Martí

AGRADECIMIENTOS Y ALGO MÁS : A todas las personas que han contribuido a la realización de este documento y todo el proyecto de investigación asociado:

Sinceramente son muchas las personas que han aportado su conocimiento para la realización de este trabajo. Les estoy muy agradecido a los integrantes del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) de la Universidad Autónoma de México (UNAM). En especial a mi cotutor el Dr. Adán Guerrero, no sólo por introducirme en el apasionante mundo de la Microscopía de Superresolución, sino también por cambiar mi concepción de lo que conocía como investigación. Es un listado enorme y no quisiera pasar nadie por alto, me disculpo si se me escapa algún nombre de los autores del artículo generado con esta investigación:

Raúl Pinto Cámara, Alejandro Linares, Damián Martínez, Víctor Abonza, Eduardo Brito Alarcón, Carlos Calcines Cruz, Gustavo Valdés Galindo, David Torres, Martina Jabłoński, Héctor H. Torres Martínez, José Luis Martínez, Haydee Olinca Hernández, José Pablo Ocelotl Oviedo, Yasel Garcés, Marco Barchi, Rocco D'Antuono, Ana Boskovic, Joseph G. Dubrovsky, Alberto Darszon, Mariano G. Buffone, Roberto Rodríguez Morales, Juan Manuel Rendon Mancha, Christopher D. Wood, Armando Hernández García, Diego Krapf, Álvaro Hernan Crevenna y nuevamente Adán Guerrero.

Agradecimientos a mi mamá, hermana y Viltrudis por estar al pendiente y darme ánimo para seguir adelante. A mi novia Angie, por soportarme y corregirme siempre que ha sido necesario, y por creer en mí a pesar de mis caprichos.

Cada artículo y documento leído, ya sea a profundidad o superficialmente, ha influido en mi preparación como profesional. Cada seminario o debate que he tenido con mis compañeros me ha llevado a dar un pasito más a adentrarme en el inmenso mundo de las ciencias biológicas. A todos ellos les estoy eternamente agradecido.

Pero también he aprendido que las personas tienen un límite hasta el que están dispuestos a sacrificar de su tiempo para contribuir con mi investigación. He aprendido que hay decisiones que son determinantes y después de dar el paso ya no hay vuelta atrás. He aprendido que hay muchas personas que verdaderamente creen en mi trabajo, pero la persona que más que tiene que creer en lo que hago soy yo mismo.

Sin duda mi tránsito en el doctorado no sólo ha sido una escuela científica, sino también una escuela para la vida.

¡Muchas gracias a todos!

Esley

Resumen

La difracción de la luz es un fenómeno que afecta a las imágenes vistas a través de microscopios independientemente de su arquitectura. Sumando a esto el proceso de digitalización y el ruido intrínseco de la cámara, se obtiene una imagen con baja resolución. La Media Desplazada es un método utilizado en la búsqueda de las modas de densidad en espacios discretos. En este trabajo de tesis se propone un algoritmo basado en la teoría de la Media Desplazada, denominado por “MSSR”, diseñado para mitigar el efecto provocado por la difracción y así mejorar la resolución de la imagen. Este método tiene la particularidad de que puede mejorar la resolución con el procesamiento de una sola imagen, a diferencia de sus algoritmos similares (SRRF, MUSICAL, ESI) que necesitan al menos decenas de imágenes. Además, tiene la capacidad de mejorar la relación señal-ruido, lo que hace que sea factible para el análisis realizado en imágenes de fluorescencia colectadas en experimentos biológicos. MSSR funciona con imágenes de fluoróforos de baja y alta densidad, no está limitado por la arquitectura del detector (CCD-EM, sCMOS o sistemas de escaneo láser fotomultiplicadores) y es aplicable tanto a imágenes individuales como a secuencias de imágenes temporales. En resumen, MSSR es una herramienta poderosa, flexible y genérica para aplicaciones de imágenes de células vivas y multidimensionales.

Abstract

The diffraction of light is a phenomenon that affects images seen through microscopes regardless of their architecture. Added to this, the digitization process and the intrinsic noise of the camera, a low resolution image is obtained. The Mean Shift is a method used in finding density modes in discrete spaces. In this thesis, an algorithm based on the Mean Shift theory is proposed, called by “MSSR”, designed to mitigate the effect caused by diffraction and thus improve the resolution of the image. This method has the particularity that it can improve the resolution with the processing of a single image, unlike its counterpart algorithms (SRRF, MUSICAL, ESI) that require at least dozens of images. In addition, it has the capacity to improve the signal-to-noise ratio, which makes it feasible for the analysis that occurs in biological experiments when collecting fluorescence images. MSSR works with low- and high-density fluorophore imaging, is not limited by detector architecture (CCD-EM, sCMOS, or photomultiplier-based laser scanning systems), and is applicable to both single image and temporal series images. In summary, MSSR is a powerful, flexible, and generic tool for multi-dimensional and living cell imaging applications.

Índice general

| | |
|--|------------|
| Índice de figuras | XI |
| Índice de tablas | XXV |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Motivación | 4 |
| 1.2. Hipótesis y objetivos | 5 |
| 1.3. Estructura de la tesis | 5 |
| 2. Marco teórico | 7 |
| 2.1. Imagen digital. Definición | 7 |
| 2.2. Dominios de la imagen digital | 12 |
| 2.2.1. Dominio de frecuencia | 12 |
| 2.2.2. Dominio de rango | 15 |
| 2.2.2.1. Transformaciones mediante núcleos | 18 |
| 2.2.3. Dominio rango-espacial | 19 |
| 2.3. Media Desplazada | 22 |
| 2.3.1. Teoría de la Media Desplazada | 23 |
| 3. Estado del arte de algoritmos MSR | 28 |
| 3.1. Difracción | 28 |
| 3.2. Algoritmos de microscopía de super-resolución | 31 |
| 3.3. Índices globales de resolución | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 4. Método propuesto: Algoritmo MSSR | 35 |
| 4.1. Modelo de MS en imágenes | 35 |
| 4.2. Mímimo de la Media Desplazada. Teorema | 37 |
| 4.3. Fundamentos de MSSR | 42 |
| 4.3.1. Análisis espacial | 43 |
| 4.3.2. Análisis Temporal | 52 |
| 5. Resultados Experimentales | 55 |
| 5.1. MSSR y el procesamiento de una sola de imagen | 55 |
| 5.1.1. MSSR supera el límite de difracción de la luz | 55 |
| 5.1.2. MSSR aumenta aún más la resolución de imágenes ya procesadas por otros algoritmos MSR | 56 |
| 5.2. Resultado de MSSR con análisis temporal | 59 |
| 5.3. Resolución nanoscópica dependiente de ruido | 61 |
| 5.4. Resolución nanoscópica con imágenes de fluorescencia | 65 |
| 5.4.1. Organización nanoscópica de maquinarias de replicación viral | 66 |
| 5.4.2. Imágenes de superresolución de células vivas | 68 |
| 5.4.3. SPT es mejorado por MSSR | 71 |
| 5.4.4. Colocalización dinámica con resolución nanoscópica | 74 |
| 5.4.5. Nanoscopía volumétrica de muestras profundas | 75 |
| 6. Conclusiones | 78 |
| 7. Logros alcanzados y trabajo futuro | 80 |
| 7.1. Nuevas contribuciones teóricas | 80 |
| 7.2. Nuevas contribuciones a la microscopía | 80 |
| 7.3. Publicaciones y eventos asociados con esta tesis | 82 |
| 7.4. Trabajo futuro | 82 |
| Bibliografía | 85 |
| Apéndices | 97 |

| | |
|---|------------|
| Apéndice A. Condiciones experimentales | 98 |
| Apéndice B. Interpolación de imágenes | 110 |
| Apéndice C. Minimización de malla | 114 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| 1.1. Escalas de estructuras de organismos y estructuras biológicas y límite de difracción. | 2 |
| 1.2. PSF para distintos valores de λ . Primera columna: PSF normalizada. Segunda columna: PSF umbralizada al 2.5 % de la intensidad máxima para mostrar los anillos concéntricos respecto al disco central. | 2 |
| 1.3. Etapas en la captación de imágenes a través de microscopios. La imagen original es convolucionada con la PSF del microscopio obteniéndose una imagen borrosa. El ruido asociado a los píxeles de la cámara y la digitalización deterioran considerablemente la calidad de la imagen, dando como resultado una imagen pixelada. | 3 |
| 1.4. Obtención de imagen MSR a partir de secuencia de imágenes. La secuencia de imágenes captadas se procesan haciendo uso de un algoritmo MSSR, dando como resultado una imagen con mayor detalle que las imágenes que le dieron origen. | 4 |
| 2.1. Representación matricial de una imagen digital I de tamaño $m \times n$. Cada elemento o píxel de la imagen en la posición (i, j) tiene asociado un único valor $f(i, j)$ | 9 |
| 2.2. Distintas representaciones de una imagen usando diferentes valores de profundidad de bits. Izquierda: 16 bits, centro: 8 bits y derecha: 1 bit. | 9 |
| 2.3. Ejemplo de imágenes para diferentes tonalidades en niveles de gris y a color. A la derecha de cada imagen se muestra una ampliación de la región marcada. a) Imagen en niveles de gris. b) Imagen a color. | 10 |
| 2.4. Imagen a diferentes resoluciones espaciales. A medida que disminuye la cantidad de píxeles por unidad de área se va perdiendo la capacidad de representar mejor los detalles de la imagen. | 11 |

| | |
|---|----|
| 2.5. Ejemplo del uso de barras de escala, para la representación de la resolución espacial en imágenes de proteínas fluorescentes. Las barras de escala están ubicadas en la esquina inferior derecha con la dimensión arriba. a) Imagen de microscopía limitada por difracción obtenida con un microscopio convencional. b) Imagen ampliada de la región enmarcada en a). c) Imagen de la región representada en b) después de ser procesada con el algoritmo de super-resolución PALM. Notar que las barras de escala en los paneles b) y c) están asociadas a la misma región y presentan igual dimensión, lo que se puede apreciar que con el método PALM se alcanza un mayor nivel de detalle. | 12 |
| 2.6. Descomposición de una señal periódica en funciones elementales sinusoidales. a) La señal periódica se muestra en color negro. b) Descomposición de la señal mostrada en a) en tres frecuencias sinusoidales. Notar que cada frecuencia tiene una amplitud que la caracteriza. . . . | 13 |
| 2.7. Transformada de Fourier de imágenes con diferentes características espaciales. a) Imagen con muchas regiones homogéneas. b) Imagen con ruido. c) Imagen con patrón regular (cuadros). | 15 |
| 2.8. Ejemplos de transformaciones geométricas en una imagen digital. a) Promedio de secuencia de imágenes sintéticas con emisores esparcidos de forma aleatoria en estructuras tubulares. b) Logaritmo aplicado a una imagen digital en que no se podía apreciar bien los 4 círculos que componen la escena de estudio. | 16 |
| 2.9. Operaciones en el dominio espacial de acuerdo a la cantidad de píxeles empleados. Las operaciones puntuales solo tienen en cuenta el valor de un solo píxel y el valor de este píxel solo afecta al valor del píxel de la imagen resultante en la misma posición. Las operaciones locales operan en vecindad del píxel, los cuales van a determinar el valor del píxel en la imagen resultante. Con las operaciones globales, los píxeles de la imagen resultante van a estar afectados por la presencia de todos los píxeles de la imagen. | 17 |
| 2.10. Ejemplos de transformaciones geométricas en una imagen digital. a) Imagen original. b) Rotación de la imagen en a) con un ángulo de 30° grados. c) Amplificación de la imagen en a) en un 25%. | 18 |

| | |
|--|----|
| 2.11. Vecindades de pixeles con distinta distribución espacial. Las tres imágenes presentan la misma cantidad de pixeles en negro, blanco y gris, donde el pixel gris está situado en el centro de las imágenes. a) Vecindad del pixel gris con pixeles blancos concentrados en el centro de la imagen. b) Vecindad del pixel gris con pixeles blancos dispersos en la imagen. c) Vecindad del pixel gris con pixeles blancos concentrados en el borde de la imagen. | 20 |
| 2.12. Vecindad en el dominio rango-espacial. A la izquierda se muestran los puntos, vecindad de rango y vecindad espacial, los centros de las vecindades han sido resaltados en color rojo. A la derecha se muestra un gráfico de la distribución que siguen los puntos en la vecindad rango-espacial. | 21 |
| 2.13. Gráficos de densidad para los diferentes dominios empleando el núcleo de Epanechnikov para la distribución de puntos $\{4, 4, 3, 9, 4, 5, 6, 5, 1, 9, 3\}$. a) Densidad de rango. b) Densidad espacial. c) Densidad rango-espacial. | 21 |
| 2.14. Comparación de las distribuciones de puntos originales y ponderados empleando el kernel de Epanechnikov. a) datos originales. b) datos ponderados. | 22 |
| 2.15. Función de densidad \hat{f} a partir del uso de núcleos gaussianos k . Cada núcleo centrado en los puntos azules y_n contribuye de forma aditiva para generar la función de densidad \hat{f} . Mientras más concentrados se encuentren los puntos mayor va a ser la contribución a la función de densidad. | 24 |
| 2.16. Representación del vector MS usado para buscar el punto de mayor densidad y_{i+1} , empleando una vecindad centrada en el punto y_i | 27 |
| 3.1. a) Patrón de difracción producido por un haz de luz que atraviesa una abertura circular. b) Elementos de patrón de difracción: disco central, anillos y distancia del centro del disco a su primer mínimo de intensidad. | 29 |

3.2. Criterios de Rayleigh y Sparrow para dos emisores simulados con distribución de Bessel y gaussiana. Notar que el patrón generado por la distribución gaussiana no genera protuberancias en las colas de los gráficos, a diferencia de la de Bessel. Las distribuciones que satisfacen el criterio de Rayleigh (primera columna) crean un valle entre los dos máximos de intensidad; el valor del *dip* asociado es menor que la altura máxima resultante. Las distribuciones que satisfacen el criterio de Sparrow (segunda columna) no crean valle entre las posiciones de los dos emisores, generando una región mayormente plana en la parte central; el valor del *dip* asociado coincide con la altura máxima de la distribución resultante. 31

4.1. Distribución espacial de puntos simétricos que se cancelan entre sí por adición en la vecindad espacial de centro x_0 . El punto rojo en x_0 es el centro de la vecindad, los puntos azules en x_n y x'_n se distribuyen espacialmente de forma simétrica respecto a x_0 . Δx_n y $\Delta x'_n$ son las distancias de x_n y x'_n a partir de x_0 respectivamente. Notar que la suma de los desplazamientos es cero: $\Delta x_1 + \Delta x'_1 = 0$, $\Delta x_2 + \Delta x'_2 = 0$ 39

4.2. Distribución espacial de puntos simétricos que se cancelan entre sí por las operaciones de producto y adición alrededor del centro de una vecindad espacial. El punto rojo en x_0 es el centro de la vecindad, los puntos azules en x_n y x'_n se distribuyen espacialmente de forma simétrica respecto a x_0 . Δx_n y $\Delta x'_n$ son las distancias de x_n y x'_n a partir de x_0 respectivamente. Notar que la suma del producto de las distancias por coordenadas es cero: $\Delta x_1 \Delta x'_2 + \Delta x'_1 \Delta x_2 = 0$ 41

4.3. Diagrama de flujo del algoritmo MSSR. Tanto la imagen LD como la secuencia LD, requieren un análisis espacial, con el cual se calcula MSSR de un orden dado. El análisis temporal solo se aplica a secuencias de imágenes. 42

- 4.4. Diferentes valores de SM , de acuerdo con diferentes ubicaciones de la vecindad de radio 2σ en una distribución gaussiana. La línea roja, la línea azul gruesa, el punto negro y la línea negra corresponden a la distribución gaussiana, el intervalo gaussiano, la media muestral (SM) del intervalo y el centro del intervalo, respectivamente. En todos los gráficos, la línea negra se intercepta con SM y la curva gaussiana. En el gráfico superior izquierdo, el intervalo es simétrico y centrado en cero, la media muestral asociada a esta región está debajo de la curva. Un caso similar se muestra en el gráfico superior derecho, donde el centro del intervalo se ha desplazado ligeramente hacia la derecha y la media de la muestra está más cerca que en el gráfico anterior. El gráfico inferior izquierdo muestra el intervalo centrado en σ y la media de la muestra coincide con la curva. El gráfico inferior derecho muestra el centro del intervalo en 3σ (un punto ubicado más allá de σ), tenga en cuenta que la media de la muestra está por encima de la curva. 44
- 4.5. Comportamiento de $MSSR$ con la variación de h_r, h_s, h_r adaptativo. a) Comparación de una distribución gaussiana y $MSSR$ usando un h_r fijo igual a la intensidad máxima de la distribución y variando h_s , en este caso las distintas distribuciones de $MSSR$ son prácticamente indistinguibles. b) Comparación de una distribución gaussiana y $MSSR$ usando un h_s fijo igual a la intensidad máxima de la distribución y variando h_r . Los valores más bajos de h_r generan artefactos en la cola de la distribución $MSSR$. c) Comparación de una distribución gaussiana y $MSSR$ utilizando un h_r adaptativo. d) Selección de $h_s = 2,5\sigma$ con el fin de utilizar la mayoría de las intensidades de la región central y evitar intensidades consideradas como ruido en la cola de la distribución de Bessel. 45
- 4.6. Puntos principales de la distribución gaussiana y su correspondiente resultado MS . En el gráfico superior, el punto rojo es al mismo tiempo, el punto de intensidad máxima y el punto de densidad local máxima para la distribución gaussiana. En el gráfico inferior, el punto rojo es un punto local mínimo para MS . Por otro lado, los puntos azules marcan donde MS es igual a cero en σ que coinciden con los puntos de inflexión gaussianos. 46
- 4.7. La MS se aplica a la distribución de fluorescencia inicial (izquierda), en este caso, distribución gaussiana, dando como resultado un gráfico de MS (centro). La aplicación de más transformaciones algebraicas proporciona la distribución $MSSR^0$ (derecha). 47

| | |
|---|----|
| <p>4.8. <i>MSSR</i> aplicado a distribuciones de Gauss y Bessel. Primera fila: haz gaussiano y su resultado <i>MSSR</i> correspondiente. Segunda fila: haz de Bessel y su correspondiente resultado <i>MSSR</i>. Por columna de izquierda a derecha: tipo de haz de luz, resultado <i>MSSR</i> y superposición de las imágenes anteriores. Todas las imágenes se han ajustado al mismo nivel de gris al 0.4 % de la intensidad máxima, para mostrar los anillos de Bessel.</p> | 47 |
| <p>4.9. Límites de Sparrow y Rayleigh (azul, distribución DL) y la correspondiente transformación $MSSR^0$ (marrón) para dos fuentes puntuales. Los puntos rojos representan la ubicación de cada emisor. El dip está indicado por una línea negra vertical. b) Valor de dip calculado para dos emisores gaussianos ubicados a distintas distancias en función de σ (trazo azul) donde también se representa el resultado correspondiente a $MSSR^0$ (trazo rojo). Los límites de Rayleigh y Sparrow están marcados por líneas de puntos largos y cortos, respectivamente. . . .</p> | 48 |
| <p>4.10. Desviación estándar de la distribución gaussiana ajustada a la distribución de Bessel y su resultado correspondiente de $MSSR^0$ para diferentes valores de longitud de onda. a) Gaussiana ajustada (línea azul discontinua) a la distribución de Bessel (línea negra continua) del emisor simulado con una longitud de onda de 488 nm. b) Gaussiana ajustada (línea roja discontinua) a $MSSR^0$ (línea negra continua) de la distribución de Bessel obtenida en a). c) Gráfico de la desviación estándar de la distribución gaussiana (σ) ajustada a la distribución de Bessel (línea azul) y el resultado correspondiente de $MSSR^0$ (línea roja).</p> | 49 |
| <p>4.11. Representación gráfica del cálculo de $MSSR^n$ de una distribución gaussiana. a) Pasos del procedimiento <i>MSSR</i>: pasos analíticos necesarios para <i>MSSR</i> de orden cero (a-e) y para órdenes superiores (f-i). La <i>MS</i> se aplica a la distribución de fluorescencia inicial (a) dando como resultado un gráfico <i>MS</i> (b). El negativo de <i>MS</i> se calcula para establecer el mínimo de <i>MS</i> en un máximo (c). Los valores negativos se establecen en cero (d). Los valores son normalizados en (e). La diferencia entre la imagen de entrada y $MSSR^0$ crea un valle ubicado entre los puntos máximos en $\pm\sigma$ (f). Se calcula el complemento (g) y la ponderación de la intensidad con el resultado de $MSSR^0$ (h). Normalización dando el <i>MSSR</i> del orden 1 ($MSSR^1$) (i).</p> | 50 |

| | |
|--|----|
| <p>4.12. Representación del cálculo de $MSSR$ para órdenes superiores aplicado a un emisor simulado mediante una distribución gaussiana. La primera iteración de $MSSR$ ($MSSR^1$) se obtiene restando el $MSSR^0$ de la imagen original, lo que da como resultado una región similar a una dona centrada en la posición del emisor. El $MSSR^1$ se calcula después de aplicar determinadas transformaciones algebraicas (consultar la figura 4.11 para obtener una descripción más detallada de los pasos en el cálculo del proceso de $MSSR^n$). La segunda iteración abarca la resta de $MSSR^1$ de $MSSR^0$ y las mismas transformaciones algebraicas que se usaron para la generación de $MSSR^1$. El proceso se repite actualizando imágenes $MSSR$ consecutivas que generan imágenes $MSSR$ de órdenes superiores.</p> | 51 |
| <p>4.13. Límite teórico de resolución alcanzable por $MSSR^n$. Dip calculado para dos emisores gaussianos en función de la distancia entre los emisores (expresada como factor de la desviación estándar σ). Las líneas de colores representan la caída del orden $MSSR$, de 0 a 3, calculada a una distancia σ dada entre emisores. Las imágenes de la derecha son la representación bidimensional del procesamiento $MSSR^n$, para dos emisores individuales separados a distancias de 1.5σ y 1.6σ. Tenga en cuenta que, para 1.5σ, los emisores no están resueltos hasta el tercer orden de $MSSR$.</p> | 52 |
| <p>4.14. El análisis de un solo cuadro de $MSSR$ de un orden n dado se aplica a cada cuadro de una secuencia, convirtiéndose en una secuencia $sf - MSSR^n$. A continuación, una función temporal (PTF) convierte la secuencia de $MSSR$ en una única imagen $t - MSSR^n$ de super-resolución.</p> | 53 |
| <p>5.1. Demostración experimental del aumento de resolución alcanzable con $MSSR$ de órdenes superiores, utilizando el sistema nanoruler GATTASIM 140B. La distribución de dispersión de los emisores se reduce en las regiones cercanas a sus centros, a medida que aumenta el orden de $MSSR$. Dos emisores cercanos ubicados a 140 nm de distancia, son resueltos usando $MSSR^1$, $MSSR^2$ y $MSSR^3$ (lado derecho). Las imágenes SIM recopiladas de la misma escena se muestran como un control positivo. Barra de escala: 100 nm.</p> | 56 |

- 5.2. *MSSR* aplicado a imágenes de superresolución mejora su resolución. a) Proyección promedio de la secuencia limitada por difracción (DL-AVG), con las respectivas regiones ampliadas enmarcadas con rectángulos azul y verde. b) Comparación de los resultados de *ESI*, *SRRF* and *MUSICAL* solo y después del procesamiento con *MSSR*⁰ (*ESI* + *MSSR*⁰, *SRRF* + *MSSR*⁰, *MUSICAL* + *MSSR*⁰), a una secuencia *DL* de 500 cuadros (imágenes microtúbulos de tubulina). Las respectivas regiones enmarcadas por los rectángulos se muestran en la fila de abajo. Barras de escala: 1 μm para panel a) y primera fila panel b), 200nm para segunda fila panel b) correspondiente a las regiones ampliadas. 57
- 5.3. Comparación del aumento en la resolución espacial de *MUSICAL* con y sin posprocesamiento con *MSSR*⁰ (*MUSICAL* + *MSSR*⁰), sobre una secuencia de 361 imágenes limitadas por difracción de fluoróforos simulados, unidos a una matriz sintética de nanotúbulos (proyección promedio que se muestra a la izquierda). b) Los gráficos muestran los perfiles de intensidad a lo largo de las líneas representadas en cada uno de los recuadros de las imágenes de la fila superior; los trazos negros, azules y rojos corresponden a las imágenes DL-AVG, *MUSICAL* y *MUSICAL* + *MSSR*⁰, respectivamente. Barras de escala: 500nm, regiones ampliadas = 100nm. 58
- 5.4. Cromátidas hermanas de cromosomas mitóticos de ratón visualizados por TIRFM (izquierda), SIM (centro) y SIM + *MSSR*⁰ (derecha). Barra de escala: 200 nm. 59
- 5.5. Sistema de nanoreglas *CRISPR/Cas*, que consiste en un ADN de doble hebra de 1537 pb (*dsDNA*) con cuatro sitios de unión para *dCas12a*, separados regularmente en longitudes de 297 pb (100 nm) sobre la cadena *dsDNA*. a) Representación gráfica del sistema de nanoreglas *CRISPR – PAINT*. b) Nanoreglas *CRISPR – PAINT* visualizadas por microscopía de fuerza atómica. 59

- 5.6. El análisis temporal de $MSSR$ proporciona un aumento adicional en la resolución hasta aproximadamente 40 nm. a) Izquierda: secuencia de imágenes LD de un sistema nanoruler CRISPR-PAINT. Derecha: región ampliada del primer cuadro de la secuencia, junto con la proyección media (Promedio LD) de una pila de 100 imágenes, antes y después del procesamiento de $MSSR$. b) Varias PTF aplicadas a la secuencia de imágenes $MSSR^3$ (t - $MSSR^3$). Los emisores fluorescentes están ubicados a 100 nm entre sí, según lo establecido por el sistema nanoruler CRISPR-PAINT. Se calcularon cuatro tipos de PTF : TPM , Var , $Mean$ y $SOFI_4$. c) Distancias euclidianas entre emisores cercanos calculadas automáticamente a partir de imágenes $t - MSSR^3 Var$, siguiendo un modelo de cadena de gusano (se utilizan 16 regiones de interés, $1.5 \mu m^2$ cada una). 60
- 5.7. Comparación de resultados de $MSSR$ de nanoregias de 40 nm con otros algoritmos de superresolución. a) Comparación de los resultados obtenidos con cada uno de los análisis de PTF disponibles con $MSSR$ (ver tabla S3), para un sistema nanoruler GATTA-PAINT disponible comercialmente. La columna Var muestra distancias entre emisores resueltas en el rango de 30 a 75 nm. Por filas, se utilizaron sondas fluorescentes Atto 488 (verde), Atto 550 (naranja) y Atto 655 (magenta). b) Las mismas nanoregias mostradas en a) pero analizados con ESI, SRRF o MUSICAL. 61
- 5.8. $sf - MSSR^1$ y $t - MSSR^1 - TPM$ de 100 imágenes proporcionan una reconstrucción consistente en una amplia gama de SNR . La estructura esperada es un anillo fluorescente uniforme, ubicado en el centro de la imagen con un fondo oscuro sin fluorescencia. En la primera fila (imágenes LD, microscopía de campo amplio (WF, WideField, por sus siglas en inglés)), se muestran cuadros de la secuencia de 100 imágenes en la correspondiente relación de SNR . La segunda fila representa el resultado de $sf - MSSR^1$ la secuencia de imágenes de la primera fila. La tercera fila es la imagen de $MSSR$ espacio-temporal correspondiente al análisis realizado a 100 imágenes con TPM ($t - MSSR^1 TPM$). 62
- 5.9. Dependencia de RSP y RSE respecto a las magnitudes: cantidad de cuadros utilizados en el análisis temporal y SNR . Los índices globales de resolución RSP (izquierda) y RSE (derecha) se estabilizan para un número reducido de fotogramas (aproximadamente 25) por un valor de SNR bajo. Cuando SNR es mayor que 8, estos índices globales tienden a estabilizarse usando solo 5 cuadros. 63

5.10. Comparación de imágenes MSR de la muestra de litografía láser generada por *SRRF*, *MUSICAL*, *ESI* y *MSSR*. La característica esperada es un anillo fluorescente uniforme ubicado en el centro de la imagen con un fondo oscuro sin fluorescencia. La fila de imágenes limitadas por difracción (*WF*), indica el promedio temporal de 100 cuadros calculados para tres pilas temporales con señal-ruido (*SNR*) distinta. Las siguientes 4 filas muestran las imágenes *SRM* correspondientes usando *SRRF*, *MUSICAL*, *ESI* and *MSSR*¹. También se indica el resultado de *MSSR* de un solo cuadro (*sf - MSSR*¹). Barra de escala: 1 μm 64

5.11. *RSP* y *RSE* calculados para las reconstrucciones de superresolución proporcionadas por otros tres procedimientos analíticos de *SRM*, *sf - MSSR*¹ y *MSSR*¹ *TPM* (100 cuadros). a) *RSP* mide una correlación global entre la reconstrucción y la referencia, de modo que los valores más cercanos a 1 indican una reconstrucción confiable. c) *RSE* mide la diferencia absoluta de la imagen reconstruida y su referencia. Los valores más bajos de *RSE* en una *SNR* particular significan menos error global en la reconstrucción. Barra de escala: 1 μm 65

5.12. Distribución relativa de proteínas virales en viroplasmos de rotavirus (*VP*) visualizados por análisis con *MSSR*. La proteína nsp2 se indica con color rojo para todos los paneles y se utiliza para la detección de *VP* en células infectadas y sirve como punto de referencia para comparar la distribución relativa en la *VP* de la distribución de otras proteínas virales. El título de las columnas representa la segunda proteína (indicada por el color verde) en el estudio de colocalización con nsp2, correspondiente a las proteínas nsp5, nsp4, vp4 y vp7 en su forma monomérica y trimérica (vp7-mon y vp7-tri, respectivamente) ordenados de izquierda a derecha. Filas de arriba hacia abajo: imágenes de difracción limitadas de los *PV*; *MSSR*, imágenes de superresolución reconstruidas por *MSSR* utilizando el análisis temporal de 100 imágenes con difracción limitada por *VP*; *sf - MSSR*, imágenes de superresolución reconstruidas por *MSSR* utilizando una única imagen limitada por difracción por *VP*. a-e) Diagramas del modelo propuesto para la distribución de proteínas virales. 67

| | |
|---|----|
| 5.13. Análisis de <i>MSSR</i> de un solo cuadro para imágenes de espermatozoides de ratón para el estudio de la reacción acrosomal. a) Utilizando el análisis <i>MSSR</i> de fotograma único, es posible visualizar el curso de la exocitosis acrosómica espontánea. b) Mayor aumento de la membrana de los espermatozoides que experimenta eventos de fenestración. c) Esquemas de la exocitosis acrosómica. Al principio, solo se puede ver la membrana plasmática a través del tinte FM4-64 (izquierda). A medida que se desarrolla la exocitosis acrosómica, la membrana plasmática y la membrana acrosómica externa se pierden en el proceso. Como resultado, FM4-64 (presente en el medio de registro) ahora tiñe la membrana acrosómica interna (derecha). | 69 |
| 5.14. Análisis temporal de <i>MSSR</i> secuencia de para imágenes de espermatozoides de ratón para el estudio de la reacción acrosomal. a) Utilizando el análisis <i>MSSR</i> de 100 cuadros, es posible visualizar el curso de la exocitosis acrosómica espontánea. b) Mayor aumento de la fenestración de la membrana de los espermatozoides. | 70 |
| 5.15. <i>MSSR</i> resultados de imágenes LD individuales en diferentes densidades de fluoróforos y <i>SNR</i> . Imágenes LD y resultados de <i>MSSR</i> (amp = 1, PSF = 3, orden = 1) de vesículas difusas del "Desafío de seguimiento de partículas individuales", generadas para tres <i>SNR</i> diferentes: 2, 4, 7 y con tres niveles de densidad de partículas de subdifracción: bajo, medio, alto equivalentes a 100, 500, 1000 partículas por imagen respectivamente. | 72 |
| 5.16. Datos de imagen de desafío para el escenario de vesículas del "Desafío de seguimiento de partícula individual", generado en tres <i>SNR</i> diferentes: 2,4,7 y en tres niveles de densidad de partículas de sub difracción: bajo, medio, alto equivalente a 100,500,1000 partículas por imagen respectivamente. Se probó la competencia de tres rastreadores marco LAP, rastreador de movimiento lineal, vecino más cercano sobre datos sin procesar (gris) o preprocesados con <i>MSSR</i> (amp = 1, psf = 3, order = 1) (negro). El seguimiento del rendimiento se evaluó con la "tracking performance evaluation tool" implementada en Icy 2.1.3.0 (http://icy.bioimageanalysis.com). | 73 |

5.17. *MSSR* elimina el ruido de las imágenes y mejora la visualización de la dinámica intermolecular en escenarios de colocalización de molécula única. a) La difusión lineal de $C - S_{10} - B$ (marcado con Alexa488, verde) en el ADN extendido con tampón está restringida por dCas12a unido de manera estable (marcado con puntos cuánticos, magenta) en una molécula de ADN (sin etiquetar). b) El estancamiento de la difusión de $C - S_{10} - B$ por dCas12a provoca la co-localización de ambas moléculas. c) Procesamiento con una y dos iteraciones *MSSR* de un quimógrafo que muestra dCas12a (inmóvil, magenta) y $C - S_{10} - B$ (deslizante, verde) en el ADN (sin marcar). d) Procesamiento con una y dos iteraciones *MSSR* de una molécula de ADN (sin marcar) con $C - S_{10} - B$ (verde) y dCas12a (magenta) unidos. 75

5.18. a) Imagen del primordio de la raíz lateral en etapa temprana adquirida con CLSM regular. b) *ROI* original tomado de a), resaltado por el cuadrado de rayas blancas. c) El mismo ROI que en b) después de ser procesado con *MSSR*. d) Imagen sobremuestreada y procesada con *MSSR* de los cromosomas de células primódicas de la raíz lateral vistos por H2B marcados con RFP. El recuadro muestra un ROI de zoom (aumentada 3 veces) resaltado por el cuadrado rojo punteado. Barra de escalas en a = $20\mu\text{m}$, b y c = $5\mu\text{m}$, d = $1\mu\text{m}$. Las imágenes en a), b) y c) se hizo mediante una proyección en el eje *Z* de diez cortes con el modo de cortes *SUM* y los *FIJI*'s *LUT* usados para los canales rojo y verde fueron "Cyan Hot" y "Magenta", respectivamente, mientras que la imagen en d) se hizo mediante una proyección *Z* de 86 cortes con el modo de intensidad MAX y el *LUT* utilizado fue "Royal" de *FIJI*. Para obtener más detalles, consultar los métodos. 76

5.19. a) Proyección de intensidad máxima de la raíz primaria de la línea transgénica *p35s: H2B-RFP*. El ROI izquierdo marcado con un cuadrado punteado rosa se muestra de b) hacia d) y la ROI derecha marcada con un cuadrado punteado rosa se muestra de e) hacia g). b) Imagen original de un núcleo de una célula epidérmica diferenciada sin pelo. c) La misma imagen de b) después de ser procesada por *MSSR*. d) Los detalles de ROI que se muestran en c). e) Imagen original de un núcleo de una célula radicular. f) La misma ROI en e) después de ser procesada por *MSSR*. g) Los detalles de ROI que se muestran en f). Barra de escalas en a = $50\mu\text{m}$, b-c y e-f = $5\mu\text{m}$. Las imágenes finales son proyecciones en *Z* de n cortes con el modo de intensidad MAX y el *LUT* "Real" de *FIJI*. Consulte los métodos para obtener más detalles. 77

| | |
|---|-----|
| A.1. Sistema nanoruler CRISPR-Cas, que consta de un ADN de doble hebra (dsDNA) de 1537 pb con cuatro sitios de unión para dCas12a, separados regularmente en longitudes de 297 pb (100 nm) sobre la cadena de dsDNA. Para validar el sistema, primero se obtuvieron imágenes del complejo proteína-ADN a través de microscopía de fuerza atómica (AFM) en condiciones secas y se midió la distancia entre cada complejo dCas12a. a) Representación gráfica del sistema nanoruler CRISPR-PAINT. b) Nanoregla CRISPR-PAINT visualizado por microscopía de fuerza atómica. | 104 |
| B.1. Interpolación de vecino más cercano. a) Imagen original de dimensión 4x4. b) Interpolación de la imagen a) al doble de su tamaño. Los pixeles nuevos toman el mismo valor que su pixel vecino más cercano. c) Imagen resultado de la interpolación, quedando con dimensión 8x8. | 111 |
| B.2. Esquema de interpolación bilineal. El valor del pixel interpolado q en la posición (x, y) va estar determinado por las áreas A_j y las intensidades de sus cuatro pixeles más cercanos. | 111 |
| B.3. Esquema de interpolación bicúbica. El valor del pixel interpolado q en la posición (x,y) va estar determinado por las funciones de peso $\alpha_{i,j}$ y los valores de sus 16 pixeles más cercanos $p_{i,j}$ | 113 |
| B.4. Resultados de interpolaciones de vecinos más cercano, bilineal y bicúbica al procesar una imagen digital. La flecha señala una región a modo de comparación entre los tres métodos. La interpolación bicúbica es la que ofrece mejores resultados. | 113 |
| C.1. Ejemplo del resultado obtenido de una secuencia de imágenes procesada con interpolación y cómo se ve afectada. a) Secuencia de imágenes interpoladas sin presencia de emisores y su proyección de varianza (donde es evidente la presencia de la malla). b) Región ampliada de las imágenes en a). c) Perfiles de línea correspondientes a los valores de pixeles a través de las líneas de puntos cian en los <i>ROIs</i> ampliados. Los primeros quince fotogramas se muestran en el gráfico superior en c). Las líneas de puntos azules en c) representan la posición de los valores máximos de la malla a lo largo del perfil de la línea. | 115 |
| C.2. Esquema de la compensación de malla. Se generan un total de cuatro imágenes adicionales como resultado del desplazamiento espacial de la información de pixeles a ambos lados de cada eje. | 116 |
| C.3. Ejemplos del resultado de la interpolación bicúbica y compensación de malla en una imagen con ruido (a) y sin ruido (b). | 117 |

C.4. Ejemplo del resultado de la interpolación bicúbica y compensación de malla en una imagen y secuencia con ruido. a) Sin compensación de malla y b) con compensación de malla. c) Los perfiles de línea de *MSSR* son los resultados de a) y b), la línea verde discontinua en las imágenes corresponde a los valores de a) y la línea azul sólida corresponde a b) respectivamente. 118

Índice de tablas

| | |
|---|-----|
| 2.1. Valores de y_r y y_s de rango y espacial | 20 |
| 2.2. núcleos and perfiles | 23 |
| 4.1. Funciones temporales de <i>MSSR</i> y sus usos recomendados. | 54 |
| A.1. Secuencia (5'-3') de la plantilla de dsDNA y los sitios de unión mediante el sistema de nanoreglas CRISPR-dCas12. El color rojo indica PAM y el rosa la secuencia de dirección de la proteína dCas12a. | 101 |

Glosario

λ : Longitud de onda. 1

NA : Apertura numérica, numerical aperture, por su siglas en inglés. 1

PSF : función de punto extendido, point spread function, por su siglas en inglés. 1

MSR : Microscopía de Super-resolución. 3

MS : Media Desplazada. 5

SIM : Microscopía de Iluminación Estructurada, Structured Illumination Microscopy, por su siglas en inglés. 32

STED : Estrechamiento por Emisiones Estimuladas, Stimulated Emission Depletion, por su siglas en inglés. 32

STORM : Microscopía de Reconstrucción Óptica Estocástica, Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, por su siglas en inglés. 32

PALM : Microscopía de localización fotoactivada, Photo Activated Localization Microscopy, por su siglas en inglés. 32

PAINT : Acumulación de Puntos para Imágenes en Topografía a Escala Nanoscópica, Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography, por su siglas en inglés. 32

SOFI : Imágenes de Fluctuación de Superresolución, Super-resolution Optical Fluctuation Imaging, por su siglas en inglés. 32

3B : Parpadeo y Foto-blanqueo Bayesiano, Bayesian Blinking and Bleaching, por su siglas en inglés. 32

SRRF : Fluctuación Radial de Superresolución, Super-Resolution Radial Fluctuation, por su siglas en inglés. 33

ESI : Imagen de Super-resolución basada en Entropía, Entropy-based Super-resolution Imaging, por su siglas en inglés. 33

MUSICAL : algoritmo de clasificación de señales múltiples, Multiple Signal Classification Algorithm, por su siglas en inglés. 33

RSP : Coeficiente de escala de resolución de Pearson, Resolution Scaled Pearson, por su siglas en inglés. 34

RSE : Error de escala de resolución, Resolution Scaled Error, por su siglas en inglés. 34

MSSR : Algoritmo de super-resolución basada en la Media Desplazada, Mean Shift Super-Resolution, por su siglas en inglés. 42

*MSSR*⁰ : *MSSR* de orden cero. 43

MSSR^{*n*} : *MSSR* de orden superior, $n > 0$. 43

FWHM : Ancho a la mitad de la altura máxima, por sus siglas en inglés. 50

PTF : Función temporal por pixeles, pixel temporal function, por sus siglas en inglés. 52

*SOFI*₂ : SOFI de order 2. 54

*SOFI*₃ : SOFI de order 3. 54

*SOFI*₄ : SOFI de order 4. 54

CLSM : Microscopía confocal de barrido láser, confocal laser-scanning microscope, por sus siglas en inglés. 76

ROI : Altura en el punto medio en el punto de ensilladura entre dos emisores. 76

SPIM : Microscopía de iluminación de plano selectivo, Selective Plane Illumination Microscopy, por su siglas en inglés. 108

Capítulo 1

Introducción

Las imágenes con buena calidad espacial se han convertido en uso habitual de cada día. Los celulares de nueva generación presentan mejor definición en sus imágenes y la demanda sigue en aumento. Por otro lado, los equipos médicos de imagenología, radares, satélites, microscopios son fabricados para que se pueda detallar y obtener mayor información de la escena en estudio. Para la construcción de estos equipos, hay que tener en cuenta sus particularidades desde el punto de vista arquitectónico como de programación y la influencia de fenómenos físicos. En el caso de los microscopios, la longitud de onda (λ) de los objetos de la muestra en estudio y la apertura numérica del microscopio (NA) determinan las características de como se ven los objetos a través de los mismos.

A finales del siglo XIX, con los trabajos de Abbe y Rayleigh [1, 2] fue establecido que la capacidad de poder distinguir objetos cercanos, vistos a través de sistemas ópticos, está limitada por el fenómeno de la difracción. De esta forma, estructuras vistas a través de sistemas basados en lentes que se encuentren a una distancia menor o en el rango de 200-250 nm (el valor depende de λ y NA) no van a poder ser diferenciadas por el ojo humano, lo cual se conoce como *límite de la difracción*. En la figura 1.1 se muestran diferentes estructuras de interés en la biología y el límite de difracción se ha marcado a 200 nm¹.

La luz que atraviesa aberturas circulares pequeñas (como las lentes de sistemas ópticos) se convoluciona con la función de punto extendido (*PSF*, point spread function, por sus siglas en inglés) y genera diferentes frentes de onda que al superponerse crean un patrón difracción circular con anillos concéntricos conocido como “patrón de Airy” [3]. El patrón de Airy se caracteriza por presentar un disco central en el cual está colectada la mayor cantidad de fotones. La intensidad luminosa disminuye a medida que se aleja del centro del mismo, de tal forma que el porcentaje de luz capturado en los anillos es despreciable en comparación con el disco central

¹Imagen tomada y modificada de <https://mappingignorance.org/2019/02/14/bionanospear-a-living-nanoprobe-with-subwavelength-resolution/diffraction-limit/>.

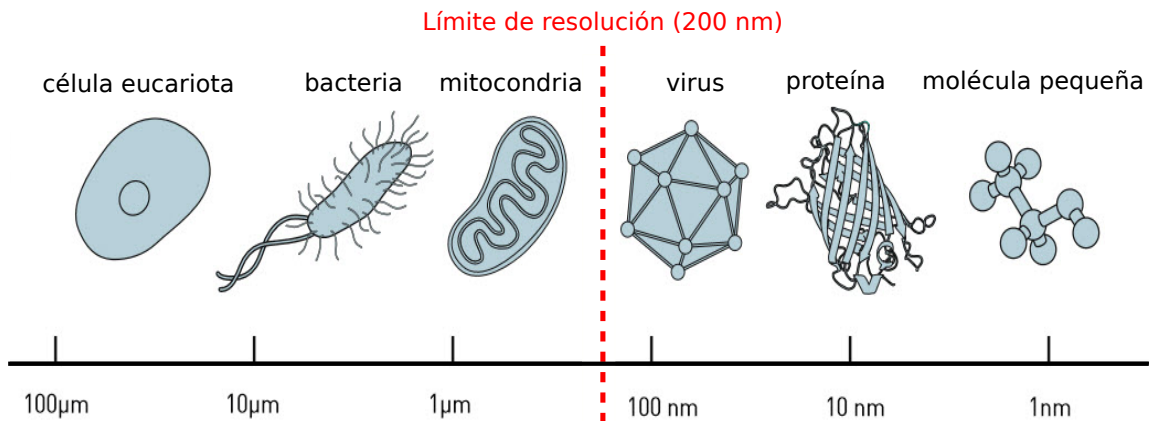


Figura 1.1: Escalas de estructuras de organismos y estructuras biológicas y límite de difracción.

(figura 1.2). Es por ello, que al observar las imágenes a través de estos equipos, tienden a verse con poca nitidez y los objetos suelen verse con mayor proporción de tamaño. Sumado a esto, al digitalizar las imágenes se pierde información dando como resultado que la imagen obtenida tenga una baja resolución en comparación con la escena observada (Figura 1.3).

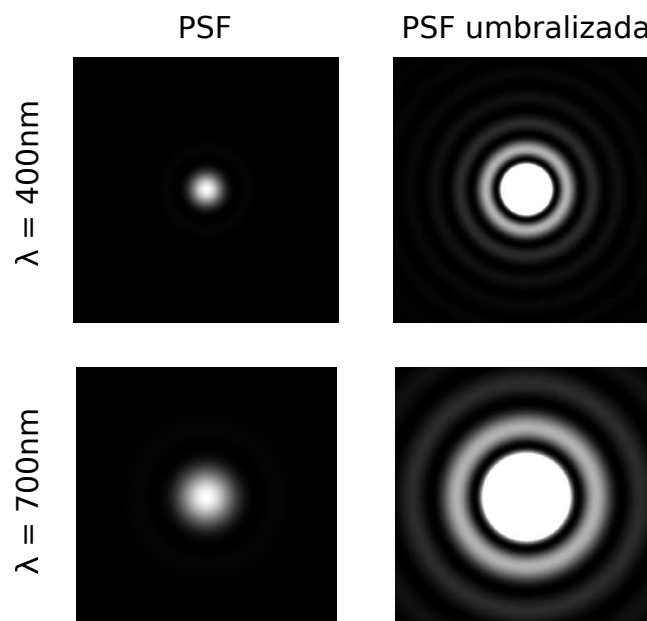


Figura 1.2: PSF para distintos valores de λ . Primera columna: PSF normalizada. Segunda columna: PSF umbralizada al 2.5% de la intensidad máxima para mostrar los anillos concéntricos respecto al disco central.

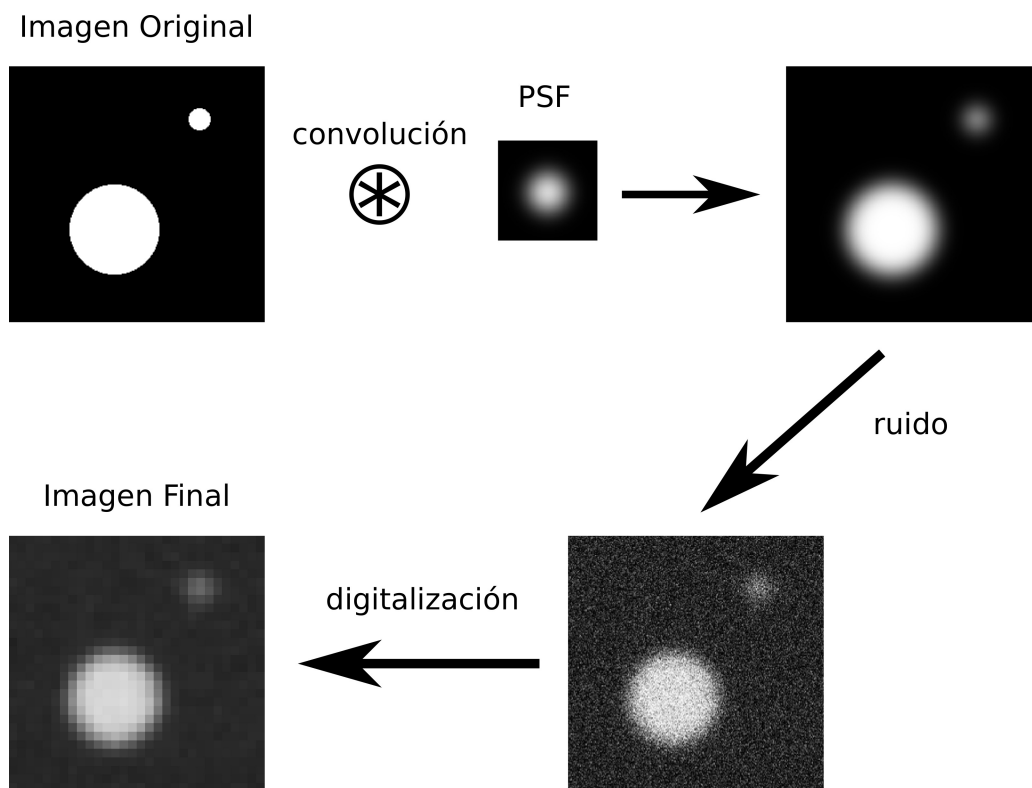


Figura 1.3: Etapas en la captación de imágenes a través de microscopios. La imagen original es convolucionada con la PSF del microscopio obteniéndose una imagen borrosa. El ruido asociado a los píxeles de la cámara y la digitalización deterioran considerablemente la calidad de la imagen, dando como resultado una imagen pixelada.

Hasta la fecha, han sido desarrollados una gran variedad de métodos que permiten mejorar la resolución de imágenes obtenidas por microscopios. La Microscopía de Super-Resolución (*MSR*) ha permitido rebasar el *límite de la difracción*, contribuyendo al estudio de estructuras de interés biológico. Este grupo de métodos que mejoran la resolución de las imágenes se pueden clasificar en dos grandes grupos: técnicas y algoritmos. Las técnicas de MSR presentan el inconveniente que requieren tecnología de punta (equipos muy costosos o especializados). Por otro lado, algunos de los algoritmos de MSR dependen en gran medida de la calidad en la preparación de la muestra y procesan largas secuencias de imágenes [4, 5], mientras que otros necesitan gran tiempo de cómputo para obtener buenos resultados [6–8]. Hay otros algoritmos que no presentan demanda de la arquitectura del microscopio y requieren solo decenas de imágenes para lograr resultados a escala nanoscópica con bajo costo computacional [9–12] (vea capítulo 3 sección 3.2) .

La obtención de imágenes de super-resolución (imágenes SR) a partir de algoritmos MSR, se logra a partir de secuencias de imágenes limitadas por difracción

(imágenes LD) con fluoróforos o emisores que parpadean de forma aleatoria, como se muestra en la Figura 1.4, las cuales son tomadas de una misma escena para distintos instantes de tiempo. Por lo general, la imagen resultante es de mayor tamaño que las imágenes que le dieron origen, de esta forma la información capturada en una región dada será mostrada con un mayor número de píxeles. El procesamiento digital efectuado para la reconstrucción es específico de cada método y los parámetros empleados dependen de las imágenes a procesar.

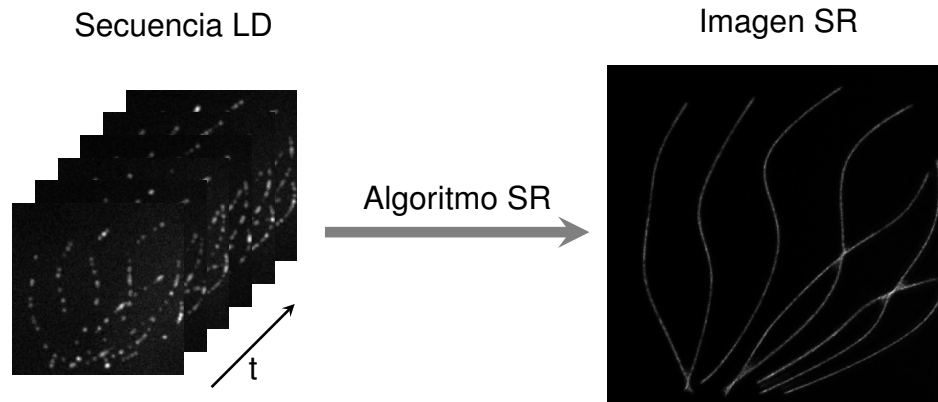


Figura 1.4: Obtención de imagen MSR a partir de secuencia de imágenes. La secuencia de imágenes captadas se procesan haciendo uso de un algoritmo MSSR, dando como resultado una imagen con mayor detalle que las imágenes que le dieron origen.

1.1. Motivación

Hoy en día, a pesar de haber gran variedad de métodos MSR, se busca la creación de algoritmos que presenten bajo costo computacional y que el procesamiento de imágenes requiera secuencias cortas. Los objetivos que se persiguen para desarrollar algoritmos con estas características son:

- fenómenos que ocurren en cortos períodos de tiempo puedan ser captados,
- el procesamiento de las imágenes se pueda efectuar en tiempo real.

Los algoritmos desarrollados hasta la actualidad permiten obtener imágenes de las escenas de estudio con buenas escalas nanoscópicas) [13, 14]. Algunos métodos dependen en gran medida de la preparación de la muestra [4, 15, 16], otros requieren de microscopios con equipamiento especializado [13, 14, 17], o simplemente requieren el uso de secuencias temporal de imágenes [9, 11, 12] para alcanzar los

resultados deseados. Sin embargo, no han sido reportados algoritmos que hagan super-resolución en una sola imagen y a la vez no dependan de la arquitectura del microscopio.

La Media Desplazada (*MS*, MeanShift, por sus siglas en inglés) [18, 19] es una herramienta empleada en el agrupamiento [20] y segmentación de imágenes muy factible en el procesamiento de datos reales [21]. Ha sido empleada en el campo de la microscopía de fluorescencia como herramienta secundaria en el agrupamiento para la detección de molécula única y estructuras [22–24] o para la corrección del desfase que experimentan la secuencia de imágenes durante el momento de su captación [25]. Sin embargo, no hay reportes de su empleo para mitigar el efecto ocasionado por la difracción mediante el uso de la *MS*.

1.2. Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis:

- El diseño de un algoritmo de super-resolución basado en la *MS* permitirá rebasar el límite de difracción mediante el procesamiento de una sola imagen.

2. Objetivo General

- Desarrollar un algoritmo de microscopía de super-resolución mediante el procesamiento de una sola imagen.

3. Objetivos Específicos

- Desarrollar algoritmo de super-resolución basado en la *MS*.
- Cuantificar el grado de resolución alcanzado por el algoritmo.
- Aplicar el algoritmo propuesto en diferentes escenarios de microscopía de fluorescencia.
- Comparar el algoritmo propuesto con otros métodos reportados en la literatura.

1.3. Estructura de la tesis

En el presente trabajo se propone un nuevo algoritmo de super-resolución (MeanShift Super-Resolution, MSSR, leer como “messer”) basado en la Media Desplazada. Con lo cual, se pretende obtener una herramienta computacional que realice

el procesamiento de imágenes limitadas por difracción y se obtenga una o varias imágenes con mejor resolución. A continuación, se hace una descripción general de la estructura y los principales temas abordados en los próximos capítulos.

En el capítulo 2, se comienza describiendo la imagen digital y las estrategias que se emplean para su procesamiento. Se detalla a fondo la teoría de la Media Desplazada.

En el capítulo 3, se muestran las limitaciones ocasionadas por la difracción en la microscopía de fluorescencia y se describen algoritmos de microscopía de super-resolución que permiten rebasar este límite.

En los capítulos 4 y 5 se describen el algoritmo *MSSR* y los resultados experimentales. Demostrando que *MSSR* rebasa el límite de difracción y además puede ser aplicado en una gran gama de condiciones de microscopía de fluorescencia.

Finalmente, en los capítulos 6 y 7 se dan las conclusiones, aportes y trabajo futuro.

Capítulo 2

Marco teórico

En este capítulo, se describe la imagen desde el punto de vista digital y el procesamiento de la misma. También se describen métodos de reescalado de imágenes y por último, se detalla acerca de la teoría y aplicaciones de la *MS*.

2.1. Imagen digital. Definición

La imagen digital, de forma genérica, se puede considerar como un elemento constitutivo de muchos procesos de representación de información. La complejidad de su reproducción, varía sustancialmente, entre otros factores, en función de si la imagen era en “blanco y negro” o “color”, dificultando y encareciendo los procesos en función de las características de la imagen. Este escaso conocimiento de las técnicas asequibles en la utilización del color impidió y frenó durante años que el mismo se utilizase regularmente en los procesos de producción de documentos. La fotografía, desde sus orígenes, contribuyó de forma definitiva y eficaz a todos los procesos de producción de documentos y especialmente de imágenes. Las técnicas analógicas de fotografía, fotomecánica y fotocomposición, que en algunos casos todavía se siguen utilizando en los procesos productivos, han sido los sistemas inspiradores de los actuales sistemas digitales de reproducción y, por supuesto, fotogramétricos.

Una fase fundamental en la producción de imágenes digitales, en aquellos casos que la fuente de información fuese analógica (cámara fotogramétrica), sería la conversión de dicha información (señal analógica) en digital mediante convertidores (cuantificadores y codificadores), como por ejemplo: escáner, digitalizadores, etcétera. La cuantificación (proceso de convertir una señal de entrada en otra de salida según una ecuación dada) tiene por objeto el muestreo de la información analógica original y, por tanto, una discretización de la misma. La codificación (proceso de asignar un número de bits o profundidad) se encargará de hacer reproducible y fácilmente

procesable dicha información discretizada, facilitando igualmente su almacenamiento o procesamiento.

Todo proceso de cuantificación lleva consigo una generalización de la información; por ello, pueden considerarse a los cuantificadores como sistemas potentes de compresión. Las imágenes digitales, son una transformación (discretización) de las imágenes originales fotográficas (analógicas) en digitales, o bien son en sí mismas digitales si proceden directamente de un barrido multiespectral (caso de la teledetección) o creadas artificialmente, ejemplo de estas últimas son las imágenes vectoriales.

Existen sustanciales diferencias en la capacidad de los ojos humanos para captar imágenes en contraposición a la adquisición artificial. Una de las principales diferencias es que el ojo humano funciona principalmente en forma comparativa y no cuantitativa como lo hacen los aparatos de adquisición de imágenes.

La formación de una imagen digital es el primer paso para cualquier sistema de preprocesamiento de imágenes, y consiste básicamente en un sistema óptico y un digitalizador, mediante el cual la imagen óptica se transforma en una señal eléctrica que permitirá el procesamiento. Las vías para obtener una imagen digital es mediante el uso de cámaras fotográficas, escáneres, etcétera.

La digitalización de imágenes, la cual lleva implícita los procesos de cuantificación y codificación, es el proceso por medio del cual se convierte una imagen en un formato interpretable por las computadoras, y es el resultado de representaciones discretas del plano continuo y/o del mundo real. Es una representación numérica mediante un enrejado o látice, particionando el espacio continuo en celdas elementales conocidas como píxeles, cuyo valor puede representar, entre otros, un nivel de gris o un valor dentro de una banda espectral perteneciente a un modelo de color. Un píxel, pese a ser una unidad de medida, es un concepto inmaterial que no tiene una medida concreta. No se asegura si un píxel mide 1 cm o 1 Km. Todo ello significa, que el píxel es sólo una unidad de división sin un tamaño real concreto. Sólo cuando se asigna una escala de dimensión a la imagen que se está trabajando, entonces se puede dar un tamaño concreto al píxel.

Una vez digitalizada la imagen, puede considerarse como cromática, es representada como una función $f : \mathbb{Z}_+^{n \times m} \rightarrow \mathbb{R}_+^{n \times m \times d}$, donde n y m son la cantidad de píxeles de alto y ancho respectivamente. El valor d caracteriza el tipo de imagen en tres grandes grupos:

- $d = 1$ representa a las imágenes en niveles de grises,
- $d = 3$ imágenes en colores y
- $d > 3$ para el caso multiespectral.

De esta manera una imagen digital puede ser convenientemente representada por

una matriz I de tamaño $n \times m$ y cada pixel queda unívocamente determinado por su intensidad o color y su posición como se puede observar en la figura 2.1.

$$I = \begin{matrix} & \begin{matrix} f(1,1) & f(1,2) & \dots & f(1,j) & \dots & f(1,m) \end{matrix} \\ \begin{matrix} f(2,1) \\ \vdots \\ f(i,1) \\ \vdots \\ f(n,1) \end{matrix} & \begin{matrix} f(2,2) \\ \vdots \\ f(i,2) \\ \vdots \\ f(n,2) \end{matrix} & \begin{matrix} \dots \\ \ddots \\ \dots \\ \ddots \\ \dots \end{matrix} & \begin{matrix} f(2,j) \\ \vdots \\ f(i,j) \\ \vdots \\ f(n,j) \end{matrix} & \begin{matrix} \dots \\ \ddots \\ \dots \\ \ddots \\ \dots \end{matrix} & \begin{matrix} f(2,m) \\ \vdots \\ f(i,m) \\ \vdots \\ f(n,m) \end{matrix} \end{matrix}$$

Figura 2.1: Representación matricial de una imagen digital I de tamaño $m \times n$. Cada elemento o pixel de la imagen en la posición (i, j) tiene asociado un único valor $f(i, j)$.

La tonalidad de la imagen viene dada por múltiples parámetros y por esta razón es un atributo difícil de valorar. Principalmente, viene determinada por la resolución en niveles de gris o profundidad de color. La tonalidad hace referencia a la información o el número de bits, que representa cada pixel y por convenio se ha establecido que la cantidad de tonos empleados es $2^{\# \text{ de bits}}$. Por ejemplo, 1 bit representa 2 tonos (blanco y negro), 8 bits representa $2^8 = 256$ tonos, 16 bits representa $2^{16} = 65536$ tonos, etc. La figura 2.2 muestra una misma imagen a diferentes valores de resolución en niveles de gris.

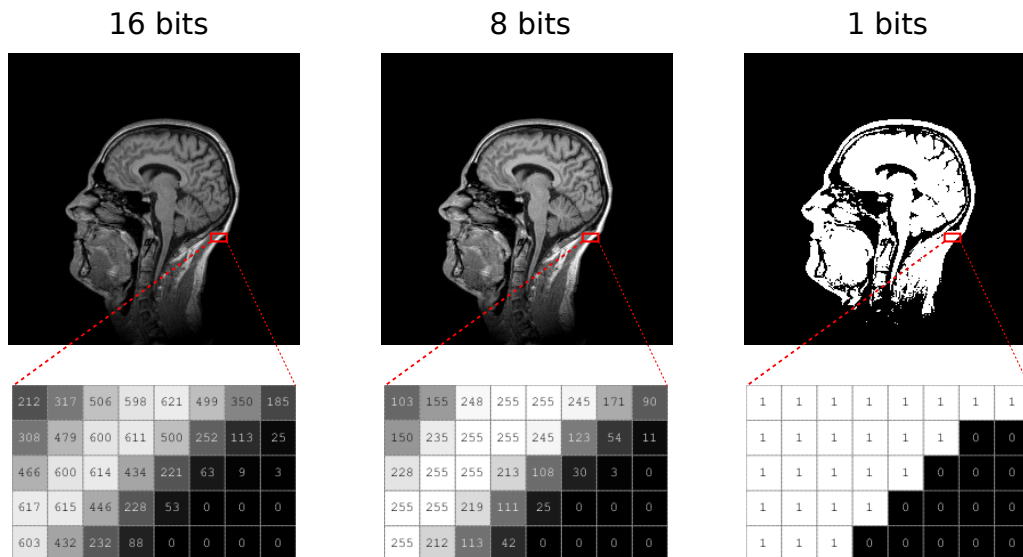


Figura 2.2: Distintas representaciones de una imagen usando diferentes valores de profundidad de bits. Izquierda: 16 bits, centro: 8 bits y derecha: 1 bit.

El número de bits estará condicionado al modo de color, es decir, al tipo de información. De tal forma que, la escala de grises se puede representar en un solo canal, mientras que para la representación del color se utilizan tres canales de 8 bits (24 bits en total), por ejemplo, el modelo RGB, apto para la visualización en pantalla, o bien, cuatro canales para el modelo CMYK, para la impresión en cuatricomía. Lógicamente, una mayor profundidad de color implica un archivo de mayor tamaño. También influirá en la tonalidad el rango dinámico, que se refiere a los niveles de luz. Con un rango dinámico bajo, las sombras perderán detalle y las áreas saturadas quedarán descoloridas. La reproducción del color será un valor complejo de medir y, en todo caso, se ha de tener presente que está muy vinculado a la finalidad.

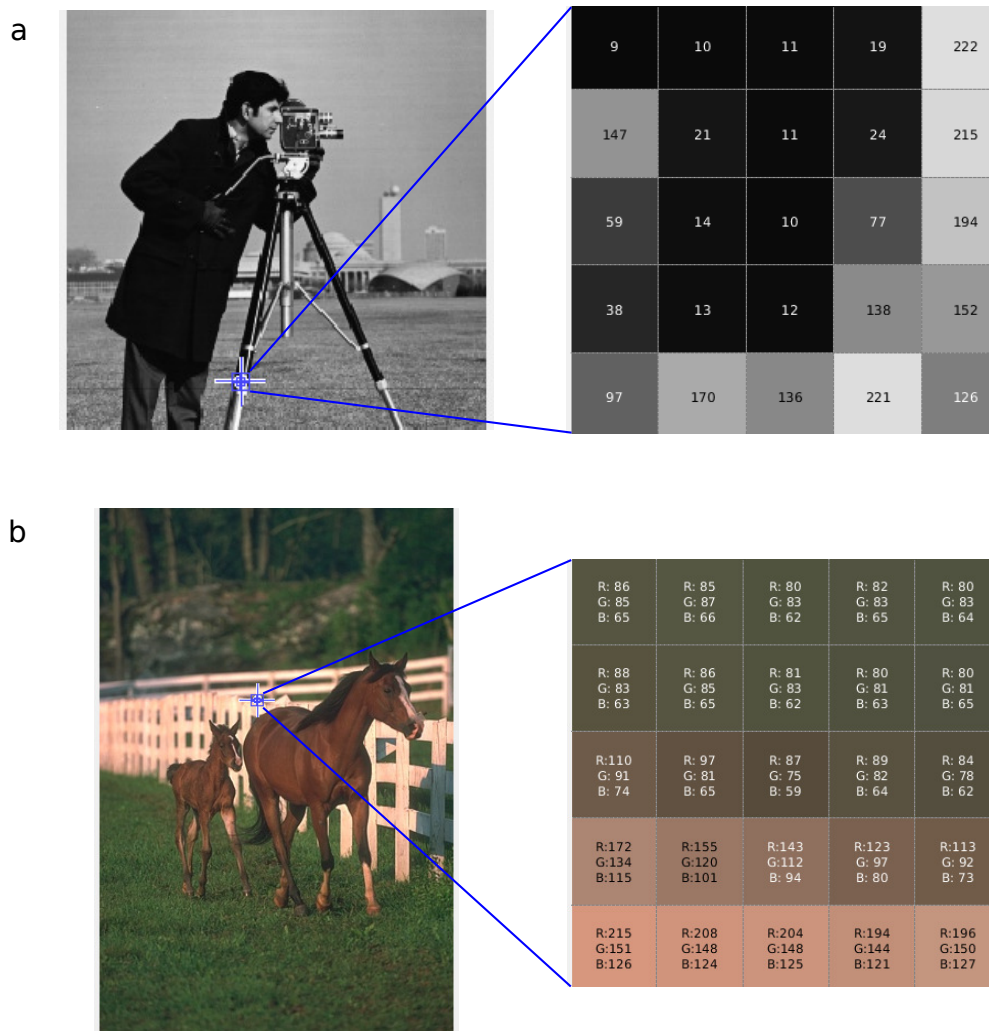


Figura 2.3: Ejemplo de imágenes para diferentes tonalidades en niveles de gris y a color. A la derecha de cada imagen se muestra una ampliación de la región marcada. a) Imagen en niveles de gris. b) Imagen a color.

Un concepto importante a tener en cuenta es la resolución espacial de una imagen digital, lo cual se refiere a la medida en los detalles que pueden ser distinguidos en la imagen, y está asociado a la densidad de píxeles por unidad de área espacial. Mayor resolución espacial va a implicar que la imagen tenga mayor detalles o calidad visual. La figura 2.4 muestra ejemplos de la imagen del payaso, representada a diferentes resoluciones espaciales: 320x200, 80x50 y 40x25 píxeles respectivamente. La región marcada por el recuadro con línea discontinua azul es común para los tres ejemplos y abarca parte de la nariz y el ojo. En la fila de abajo se muestra la región ampliada, notar que a medida que disminuye la densidad de píxeles por unidad de área, decrece la capacidad de distinguir los detalles de la imagen. En este caso, para la región de 80x80 píxeles, se pueden diferenciar con claridad el ojo y la nariz del payaso, mientras que para la región de 10x10 es imposible distinguir dichas regiones.

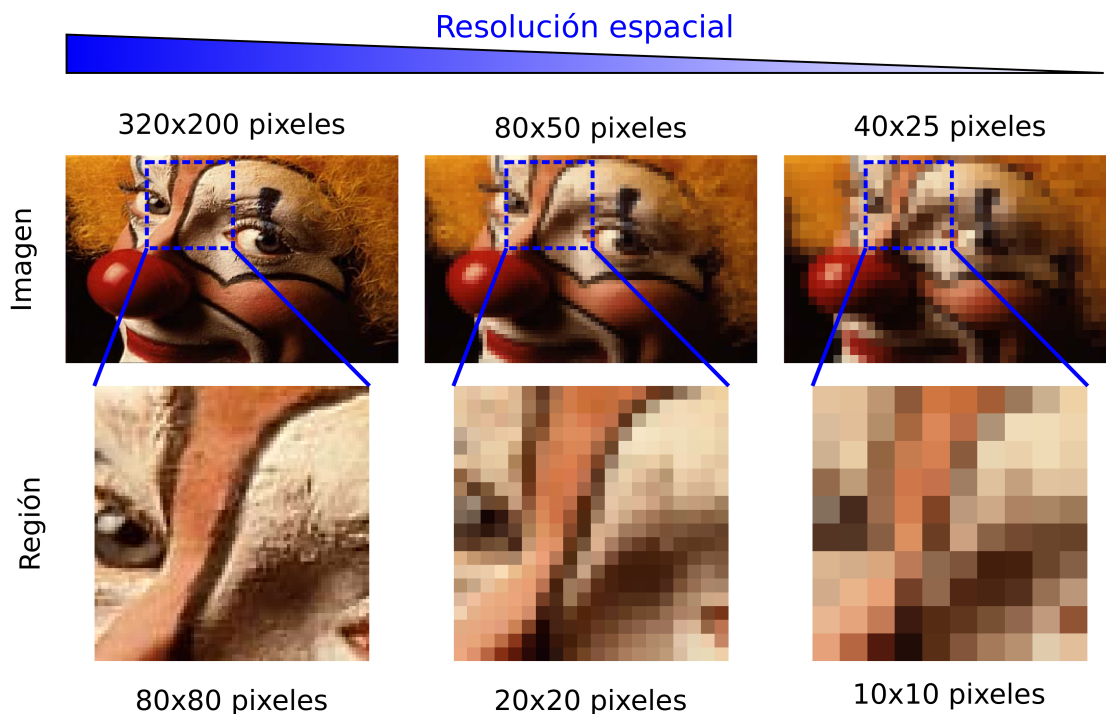


Figura 2.4: Imagen a diferentes resoluciones espaciales. A medida que disminuye la cantidad de píxeles por unidad de área se va perdiendo la capacidad de representar mejor los detalles de la imagen.

En el área de la biología, es muy frecuente expresar la medida de resolución de la imagen mediante barras de escala, ya que se conoce la equivalencia de los píxeles al tamaño real de los objetos. De esta manera se tiene una medida de las dimensiones de los objetos representados en la imagen como se muestra en la figura 2.5¹.

¹Imagen tomada y modificada de <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/introduction.html>

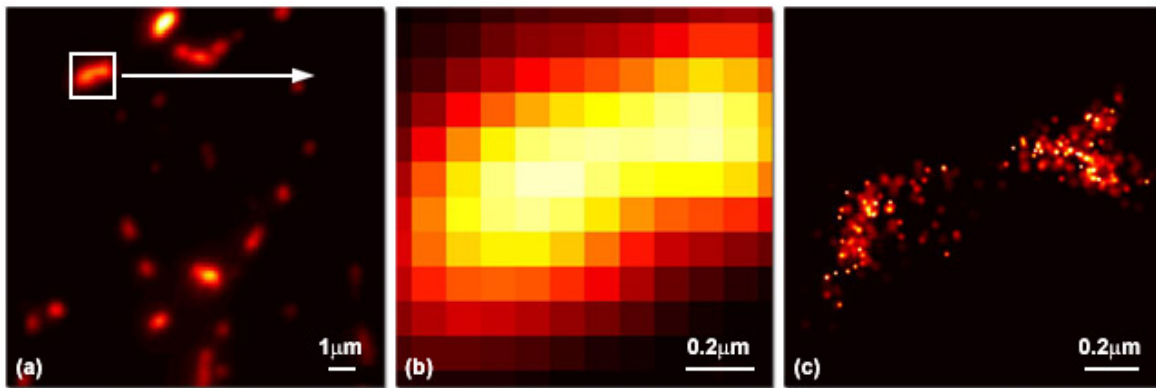


Figura 2.5: Ejemplo del uso de barras de escala, para la representación de la resolución espacial en imágenes de proteínas fluorescentes. Las barras de escala están ubicadas en la esquina inferior derecha con la dimensión arriba. a) Imagen de microscopía limitada por difracción obtenida con un microscopio convencional. b) Imagen ampliada de la región enmarcada en a). c) Imagen de la región representada en b) después de ser procesada con el algoritmo de super-resolución PALM. Notar que las barras de escala en los paneles b) y c) están asociadas a la misma región y presentan igual dimensión, lo que se puede apreciar que con el método PALM se alcanza un mayor nivel de detalle.

2.2. Dominios de la imagen digital

A partir de la mitad del siglo pasado y en lo que va de este, se han desarrollado algoritmos para procesar imágenes que operan principalmente en tres dominios: frecuencia, espacial, y rango-espacial. Con estas transformaciones se modifica la imagen con el objetivo de buscar información o mejorar la calidad de la misma. A continuación, se ofrece un resumen de cada uno de estos dominios.

2.2.1. Dominio de frecuencia

En el procesamiento digital de señales e imágenes es muy usado el análisis en el dominio de frecuencia, con el cual una función f es descompuesta de forma unívoca en funciones elementales. Cada función tiene asociada amplitud y frecuencia, como se muestra en la figura 2.6.

La transformada de Fourier, denotada por la letra F , es una herramienta muy versátil que emplea funciones de seno y coseno a diferentes frecuencias, reflejando la proporción en que contribuyen cada una de ellas. Su expresión para una función unidimensional continua f está dada por la siguiente fórmula:

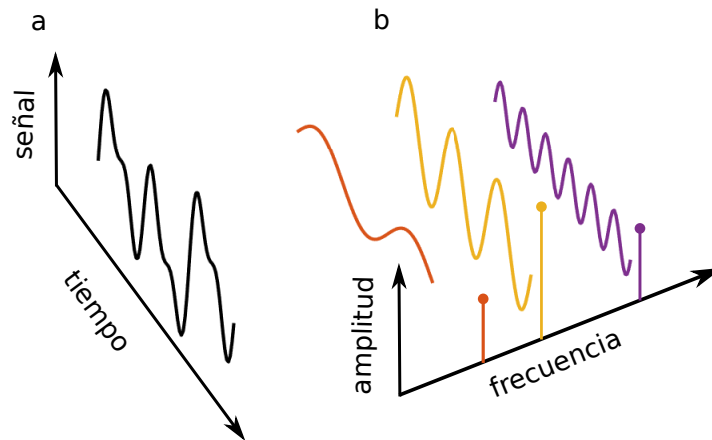


Figura 2.6: Descomposición de una señal periódica en funciones elementales sinusoidales. a) La señal periódica se muestra en color negro. b) Descomposición de la señal mostrada en a) en tres frecuencias sinusoidales. Notar que cada frecuencia tiene una amplitud que la caracteriza.

$$F(u) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x)e^{-j2\pi ux} dx,$$

donde

- x : tiempo o espacio,
- u : frecuencia,
- j : unidad imaginaria,
- $e^{jx} = \text{sen}(x) + j\text{cos}(x)$: exponencial compleja.

La transformada inversa de Fourier se expresa de manera similar:

$$F(x) = \int_{-\infty}^{\infty} F(u)e^{j2\pi ux} du,$$

En el caso de una imagen de dimensiones $M \times N$ la transformada de Fourier adquiere una expresión discreta y bidimensional dada por:

$$F(u, v) = \frac{1}{MN} \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y)e^{-j2\pi(\frac{ux}{M} + \frac{vy}{N})},$$

y su inversa:

$$f(x, y) = \sum_{u=0}^{M-1} \sum_{v=0}^{N-1} F(u, v) e^{j2\pi(\frac{ux}{M} + \frac{vy}{N})},$$

Uno de los resultados más importante es el Teorema de Convolución, el cual establece que la transformada de Fourier del producto convolución de dos funciones definidas en el dominio de señal es igual al producto de sus respectivas transformadas. Inversamente se tiene el recíproco: la transformada inversa del producto convolución de dos funciones en el dominio de frecuencia es igual al producto de las funciones en el dominio de señal. Matemáticamente hablando se tiene que:

$$f(x, y) * g(x, y) \iff F(u, v) \cdot G(u, v)$$

$$f(x, y) \cdot g(x, y) \iff F(u, v) * G(u, v)$$

Debido a que la transformada de Fourier es una función periódica, un periodo de MN es suficiente para poder representarla, guardando estrecha relación con el tamaño que es $M \times N$. El espectro de la transformada de Fourier, dado por su valor absoluto, revela información sobre la naturaleza de la imagen. Normalmente se emplea la función logaritmo del espectro para su visualización, de tal forma que:

- regiones homogéneas están asociadas a bajas frecuencias,
- bordes y ruido están asociados a altas frecuencias,
- si en la imagen se repite algún patrón da lugar a picos que se repiten a una distancia regular.

En la figura 2.7 se muestran tres imágenes y sus correspondientes transformadas de Fourier. Cada imagen presenta una característica distinta que determina la amplitud asociada a cada frecuencia. Por ejemplo, la imagen del camarógrafo (figura 2.7a) presenta regiones homogéneas, como el traje y el cielo, esto conlleva que altas amplitudes se concentren en las bajas frecuencias (centro de la figura 2.7d). La imagen del centro (figura 2.7b) está formada por estructuras circulares, pero presenta ruido en el fondo de la imagen, es por ello que en su transformada de Fourier (figura 2.7e), altas frecuencias presentan altos valores de amplitudes. Finalmente, la última imagen (figura 2.7c) presenta un patrón regular en forma de cuadros. Notar que en este caso, la transformada de Fourier (figura 2.7f) tiene un patrón regular que se que se extiende por toda la imagen y se repite con una frecuencia específica.

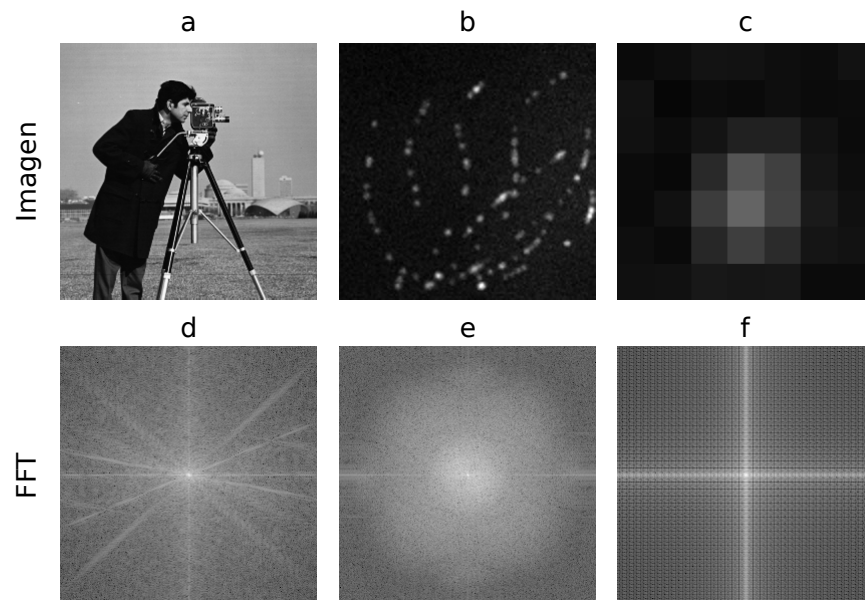


Figura 2.7: Transformada de Fourier de imágenes con diferentes características espaciales. a) Imagen con muchas regiones homogéneas. b) Imagen con ruido. c) Imagen con patrón regular (cuadros).

2.2.2. Dominio de rango

El término “dominio de rango” se refiere al conjunto de puntos que componen una imagen, y los métodos en el dominio de rango son procedimientos que operan directamente sobre los valores de los píxeles. Hay cuatro grandes grupos en que se pueden clasificar las transformaciones en el dominio de rango: puntuales, locales, globales y geométricas.

Las transformaciones puntuales o *pixel a pixel* operan sobre el valor de un pixel sin tener en cuenta los píxeles que le rodean. La intensidad de cada pixel en la imagen de original es modificado por un nuevo valor mediante operaciones matemáticas o relaciones lógicas, y el valor obtenido es ubicado en la misma posición en la imagen resultante. La operación cuando se procede con una imagen se pueden expresar como:

$$g = T(f) \quad (2.1)$$

donde f es la imagen original y g es la imagen resultado después de aplicar la transformación T . Estas técnicas se caracterizan por variar el contraste y la tonalidad de la imagen, ejemplos de estas son suma y división por escalares, logaritmo, potencia y complemento. Se puede operar también de forma puntual con varias imágenes, este grupo de técnicas se conoce como aritmética de imágenes. La forma

general se muestra en la siguiente ecuación:

$$g = T(f_1, \dots, f_n). \quad (2.2)$$

Se requiere que las imágenes tengan la misma dimensión y profundidad de bits. Ejemplos de estas técnicas son suma, resta, multiplicación y división. La composición de las operaciones aritméticas anteriores son muy empleadas en el tratamiento de imágenes, siendo el promedio y la varianza funciones muy populares. La figura 2.8 muestra dos ejemplos de aplicaciones prácticas de las funciones mencionadas anteriormente².

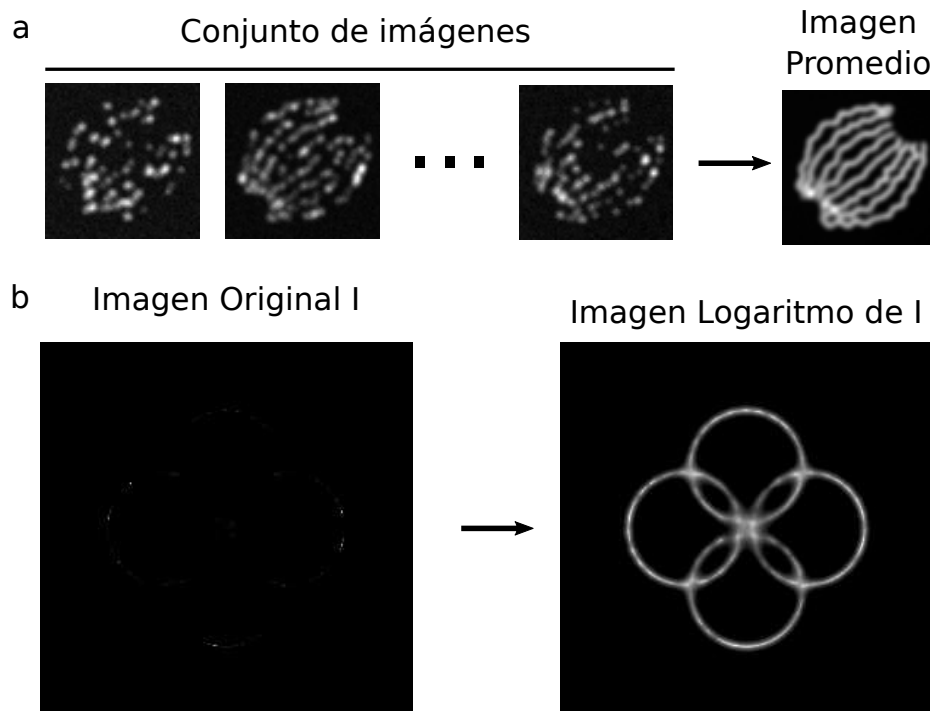


Figura 2.8: Ejemplos de transformaciones geométricas en una imagen digital. a) Promedio de secuencia de imágenes sintéticas con emisores esparcidos de forma aleatoria en estructuras tubulares. b) Logaritmo aplicado a una imagen digital en que no se podía apreciar bien los 4 círculos que componen la escena de estudio.

Las operaciones locales dependen de píxeles que se encuentren en una vecindad del píxel analizado. La vecindad de un píxel es un conjunto de píxeles (por lo general, su cantidad es mucho menor que el número total de píxel de la imagen) en las cercanías del mismo. Se procede con un núcleo o máscara que recorre toda la

²La secuencia de imágenes de la figura 2.8a fue tomada del sitio http://bigwww.epfl.ch/smlm/datasets/index.html?p=../challenge2013/datasets/Bundled_Tubes_High_Density. La imagen de la figura 2.8b fue obtenida mediante el algoritmo de super-resolución MUSICAL, al procesar la secuencia en el sitio <https://sites.google.com/site/uthkrishth/musical>.

imagen, modificando sus valores de los píxeles. Los núcleos pueden ser lineales o no lineales. Los núcleos lineales se caracterizan por tener coeficientes constantes y siempre se les puede hacer una versión en el dominio de frecuencia (ver sección 2.2.1), lo que conlleva una reducción considerable en el tiempo de cómputo. Por otro lado los núcleos no lineales son adaptativos según la vecindad a procesar.

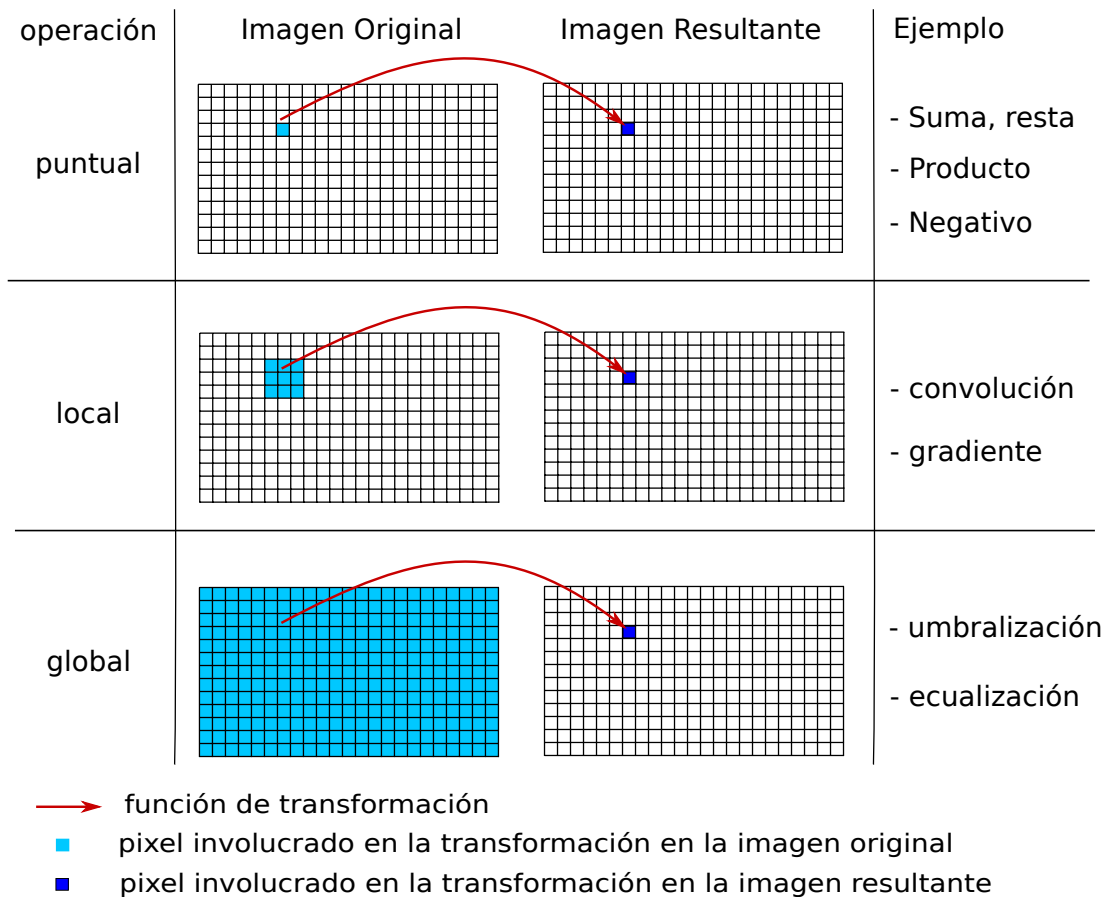


Figura 2.9: Operaciones en el dominio espacial de acuerdo a la cantidad de píxeles empleados. Las operaciones puntuales solo tienen en cuenta el valor de un solo píxel y el valor de este píxel solo afecta al valor del píxel de la imagen resultante en la misma posición. Las operaciones locales operan en vecindad del píxel, los cuales van a determinar el valor del píxel en la imagen resultante. Con las operaciones globales, los píxeles de la imagen resultante van a estar afectados por la presencia de todos los píxeles de la imagen.

Las operaciones globales no están limitadas solamente a los píxeles en una vecindad, sino que pueden ser afectados por píxeles más allá de esta, siendo los métodos basados en histogramas como la umbralización y la ecualización unas operaciones más utilizadas en el procesamiento digital de imágenes.

Las tres clasificaciones anteriores conservan el tamaño de la imagen original, sin embargo, las operaciones geométricas pueden variar el tamaño de la imagen original y también pueden distorsionar los objetos que componen la misma. En la figura 2.10, se muestra como ejemplos las transformaciones geométricas de rotación (figura 2.10b) y ampliación (figura 2.10c). Específicamente, para la operación de ampliación fue usado el método de interpolación bicúbica, el cual será explicado en la siguiente sección.

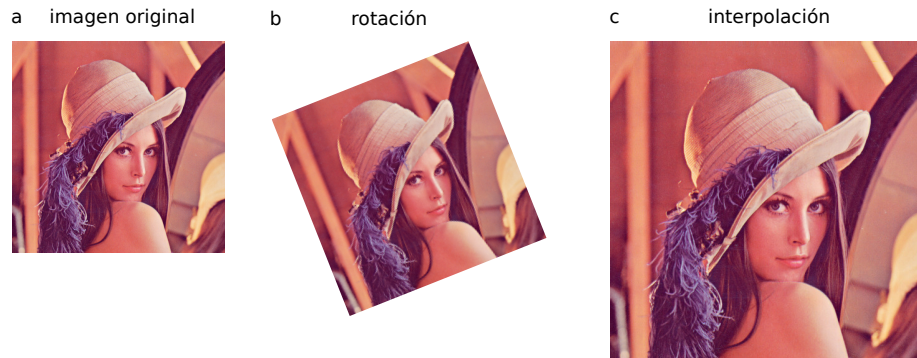


Figura 2.10: Ejemplos de transformaciones geométricas en una imagen digital. a) Imagen original. b) Rotación de la imagen en a) con un ángulo de 30° grados. c) Amplificación de la imagen en a) en un 25 %.

2.2.2.1. Transformaciones mediante núcleos

Las transformaciones mediante núcleos son un caso particular de transformación local, su expresión integral tienen la forma:

$$g(p_0) = \sum_{p \in S} K(p, p_0) \cdot h(p, p_0). \quad (2.3)$$

donde

- h : imagen a la cual se le hace la transformación,
- g : imagen resultante de aplicar la transformación,
- p_0 : pixel donde se evalúa la transformación,
- S : región donde se efectúa la transformación local,
- K : núcleo o kernel,
- p : pixel que recorre la región S .

La convolución y correlación son ejemplos de transformaciones mediante núcleos dadas por las expresiones

$$g(p_0) = \sum_{p \in S} K(p, p_0) \cdot h(p - p_0)$$

y

$$g(p_0) = \sum_{p \in S} K(p, p_0) \cdot h(p + p_0)$$

respectivamente, para las cuales h coincide con la imagen procesada y K es una matriz de coeficientes constantes.

A diferencia de las operaciones de convolución y correlación, se está interesado en el caso que h siempre toma valor 1 para todos los píxeles involucrados y los coeficientes de K varíen de acuerdo a p y p_0 . Lo cual, restringue la expresión 2.3 a la forma:

$$g(p_0) = \sum_{p \in S} K(p, p_0). \quad (2.4)$$

2.2.3. Dominio rango-espacial

Como bien se describió anteriormente, una imagen se representa como un enrejado bidimensional de vectores d -dimensionales. El espacio del enrejado se conoce como el dominio espacial, mientras que el nivel de gris, color, o información espectral se representa en el dominio del rango. El dominio rango-espacial es producto de concatenar ambos espacios para obtener un dominio de dimensión $r = d + 2$. La ventaja de este espacio, es tener en cuenta tanto la posición como las intensidades de los píxeles, lo cual es muy convenientemente empleado para describir la densidad de vecindades de píxeles.

En la figura 2.11 se puede apreciar tres vecindades de píxeles de dimensión 13×13 , las cuales presentan el mismo histograma, pero difieren en la disposición espacial de los niveles de grises. Notar que en las tres vecindades están presentes solo tres niveles de grises: 0 (negro), 128 (gris) y 255 (blanco), cuyas respectivas frecuencias son 144, 1 y 24. Al comparar las vecindades, es notable que la distribución espacial de los niveles de píxeles debe influir notablemente en la función que caracterice la densidad de las mismas. Entonces, ¿cómo describir la densidad de los niveles de grises teniendo en cuenta tanto la distribución espacial como la de rango?

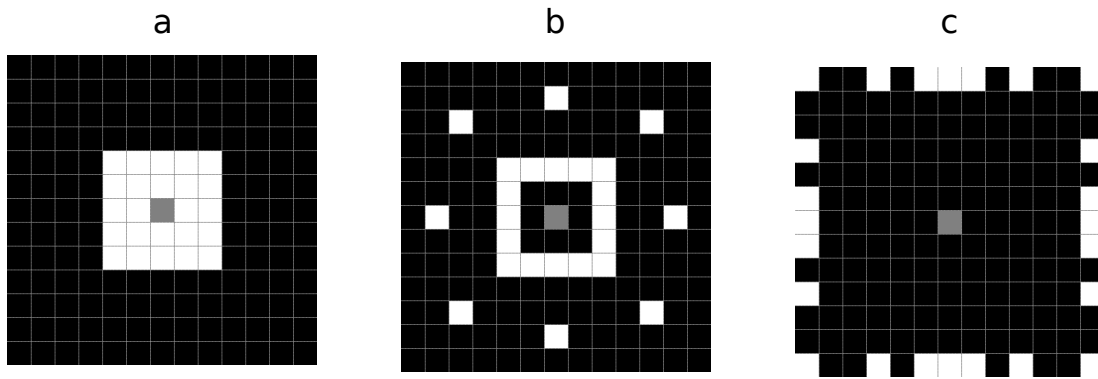


Figura 2.11: Vecindades de píxeles con distinta distribución espacial. Las tres imágenes presentan la misma cantidad de píxeles en negro, blanco y gris, donde el píxel gris está situado en el centro de las imágenes. a) Vecindad del píxel gris con píxeles blancos concentrados en el centro de la imagen. b) Vecindad del píxel gris con píxeles blancos dispersos en la imagen. c) Vecindad del píxel gris con píxeles blancos concentrados en el borde de la imagen.

Para esclarecer cómo se opera en el dominio rango-espacial, se dará una breve explicación con un ejemplo concreto de cómo hallar la densidad en una vecindad 1-dimensional mediante el empleo de núcleos diferenciales.

Sean los puntos $\{4, 4, 9, 3, 4, 5, 6, 5, 1, 9, 3\}$, se puede apreciar que hay 11 valores comprendidos en el intervalo $[1, 9]$. Cada punto tiene asociado dos propiedades: valor y posición relativa al punto central. Se tomará a 5 como el centro de la vecindad y los radios espacial y de rango como $h_s = 5$ y $h_r = 4$ respectivamente. Se hará uso del núcleo de Epanechnikov, para describir la densidad alrededor del píxel central, cuya fórmula es:

$$K_E = \begin{cases} 1 - x^2, & \text{si } |x| \\ 0, & \text{otro caso} \end{cases}$$

Las vecindad de rango y espacial están descrita por

$$V_r = \{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9\} \text{ y } V_s = \{-5, -4, -3, -2, -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5\}$$

con centros de vecindad son $c_r = 5$ y $c_s = 0$ respectivamente. Se tomaran los valores y_r en el dominio de rango tal que se encuentren a una distancia menor o igual que un radio $h_r = 5$, mientras que los en el dominio espacial y_s coinciden con la vecindad espacial V_s . De tal forma que se obtienen pares ordenados quedando de la siguiente manera:

Tabla 2.1: Valores de y_r y y_s de rango y espacial

| | | | | | | | | | | | |
|-------|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|---|
| y_r | 4 | 4 | 9 | 3 | 4 | 5 | 6 | 5 | 1 | 9 | 3 |
| y_s | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

La figura 2.12 muestra la distribución que siguen estos valores.

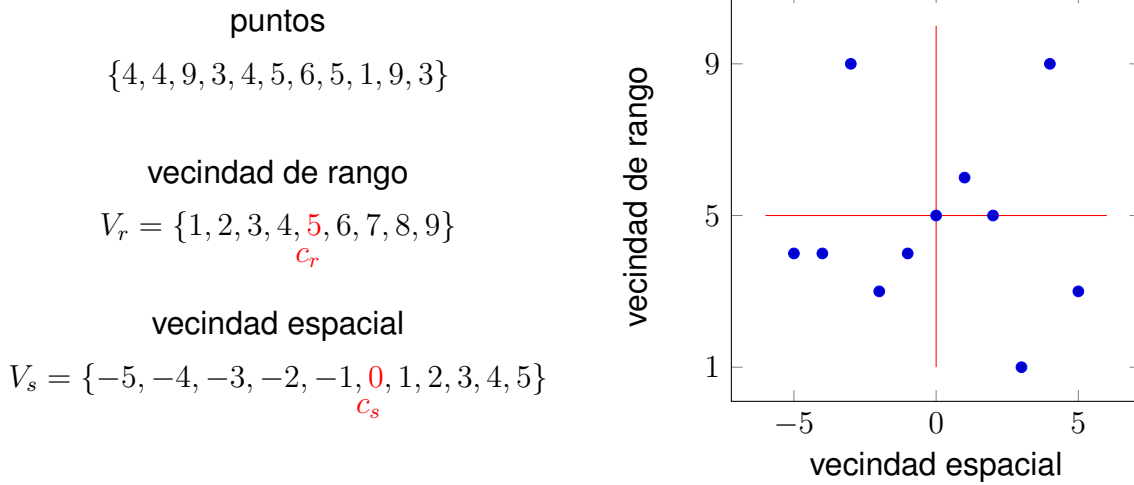


Figura 2.12: Vecindad en el dominio rango-espacial. A la izquierda se muestran los puntos, vecindad de rango y vecindad espacial, los centros de las vecindades han sido resaltados en color rojo. A la derecha se muestra un gráfico de la distribución que siguen los puntos en la vecindad rango-espacial.

Sean $x_r = (y_r - c_r)/h_r$ y $x_s = (y_s - c_s)/h_s$, la normalización de los valores de las vecindades de rango y espacial, entonces sus respectivas densidades se hallan aplicando el núcleo de Epanechnikov K_E a los vectores x_r y x_s . En la figura 2.13 se muestran los gráficos de las densidades de rango, espacial y rango-espacial empleando el núcleo de Epanechnikov.

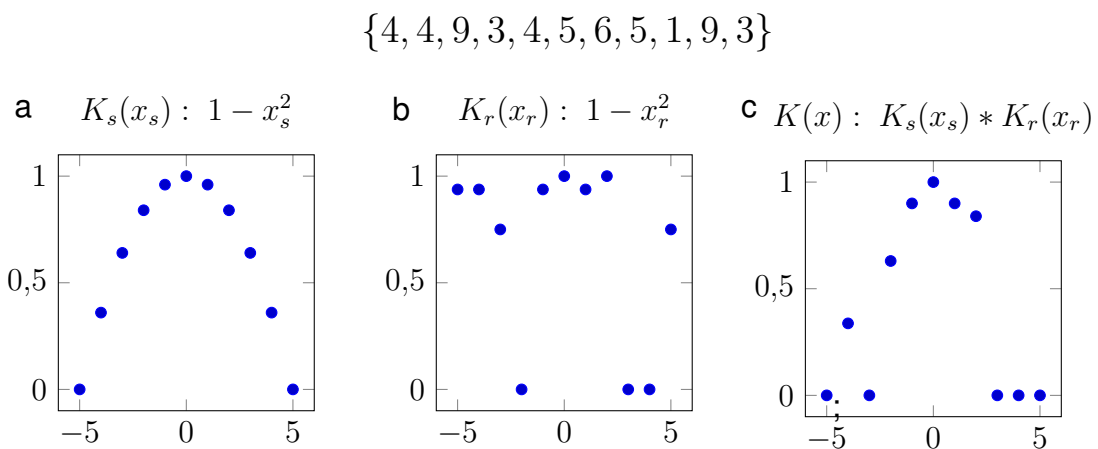


Figura 2.13: Gráficos de densidad para los diferentes dominios empleando el núcleo de Epanechnikov para la distribución de puntos $\{4, 4, 3, 9, 4, 5, 6, 5, 1, 9, 3\}$. a) Densidad de rango. b) Densidad espacial. c) Densidad rango-espacial.

En la figura 2.14 se observan los gráficos de los valores de la vecindad original y los valores ponderados con el núcleo de Epanechnikov siguiendo la filosofía rango-espacial. Notar que, a medida que se va alejando del centro de la vecindad, el peso que ejerce este valor respecto al centro es cada vez menor, tanto de rango como espacialmente.

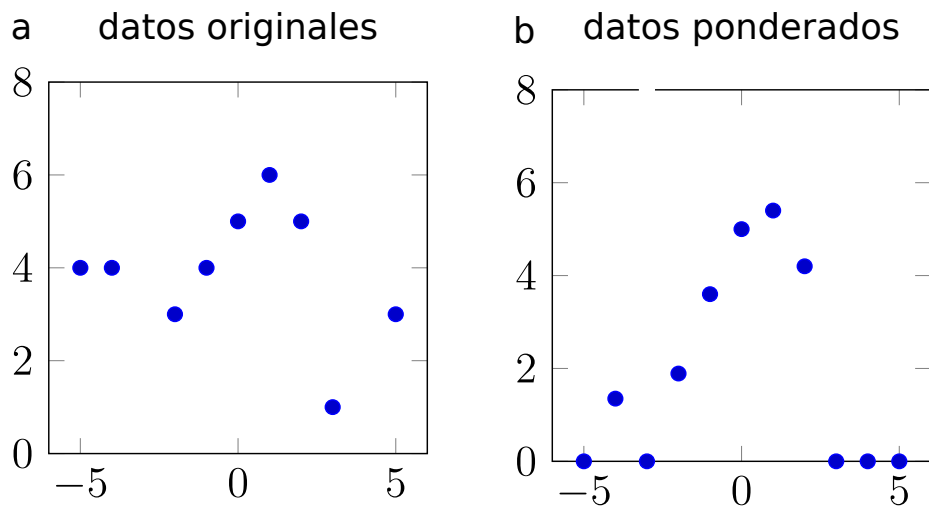


Figura 2.14: Comparación de las distribuciones de puntos originales y ponderados empleando el kernel de Epanechnikov. a) datos originales. b) datos ponderados.

2.3. Media Desplazada

La Media Desplazada (MS , MeanShift, por sus siglas en inglés) puede conceptualizarse como un procedimiento iterativo ascendente para caracterizar la densidad de datos en espacios discretos. La MS fue propuesta por Fukunaga [18] con fines estadísticos para agrupar datos, ya que el vector MS apunta hacia los puntos de densidad local. Cheng dio una generalización de la MS describiendo el concepto de *núcleo sombra* [19]. La aplicación más popular fue proporcionada por Comaniciu usándola para la segmentación de imágenes, filtrado y seguimiento de objetos [21]. Además, la MS se ha empleado para algoritmos MSR como una herramienta secundaria de agrupamiento en la localización de una sola molécula y la segmentación de grupos [26]. Ingeniosas aplicaciones han sido utilizadas para la eliminación de ruido [27] y para secuencias de imágenes sufren de desplazamiento producto del movimiento de la cámara (drift correction) [28]. Todas las aplicaciones de los casos mencionados anteriormente están respaldadas por la teoría de la MS , pero irónicamente en ningún caso, la MS es calculada explícitamente. Esto se debe a que no es necesario el cómputo de la MS para hallar las modas del espacio en que se está operando, lo cual hace que los basados en esta teoría sean de gran versatilidad.

2.3.1. Teoría de la Media Desplazada

Sea $Y = \{y_n\}_{n=1}^N$ un conjunto finito de puntos en el espacio euclideo d -dimensional \mathbb{R}^d . La distribución de puntos de Y está asociada a una función de densidad f la cual es desconocida. Como f es desconocida, se hace una estimación de la misma a una función \hat{f} . La función de densidad f que subyace sobre Y en un punto dado $y_0 \in \mathbb{R}^d$, es caracterizada mediante una función de densidad estimada \hat{f} usando un núcleo diferenciable K y un parámetro scalar $h > 0$ [18, 19, 21] dado por:

$$\hat{f}_{K,h}(y_0) = \frac{c_K}{Nh^d} \sum_{y_n \in B_h^*(y_0)} K\left(\frac{y_0 - y_n}{h}\right), \tag{2.5}$$

donde $B_h^*(y_0)$ es la vecindad reducida (excluye al centro de la vecindad) en y_0 de radio h , N es la cantidad de puntos en la vecindad, el término h^d es un factor de escala en relación con la dimensión del espacio y c_K es la constante de normalización, por lo tanto $\hat{f} \in [0, 1]$. De acuerdo a Cheng [19], una función $K : \mathbb{R}^d \rightarrow \mathbb{R}$ es un núcleo si existe una función perfil $k : [0, \infty) \rightarrow \mathbb{R}$, tal que $K(x) = k(\|x\|^2)$, donde $\|\cdot\|$ es la norma euclidea. La función perfil k satisface las siguientes condiciones:

1. no negativa y no creciente,
2. diferenciable e integrable,
3. definida a trozos.

Ejemplos de núcleo con sus respectivos perfiles se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2.2: núcleos and perfiles

| Nombre | $K(x) = k(\ x\ ^2)$ | $k(t)$ | gráfico |
|--------------|---|--|---------|
| Uniforme | $\begin{cases} 1, & \ x\ \leq 1 \\ 0, & \ x\ > 1 \end{cases}$ | $\begin{cases} 1, & 0 \leq t < 1 \\ 0, & \text{otro caso} \end{cases}$ | |
| Epanechnikov | $\begin{cases} 1 - \ x\ ^2, & \ x\ \leq 1 \\ 0, & \ x\ > 1 \end{cases}$ | $\begin{cases} 1 - t, & 0 \leq t < 1 \\ 0, & \text{otro caso} \end{cases}$ | |
| Biponderado | $\begin{cases} (1 - \ x\ ^2)^2, & \ x\ \leq 1 \\ 0, & \ x\ > 1 \end{cases}$ | $\begin{cases} (1 - t)^2, & 0 \leq t < 1 \\ 0, & \text{otro caso} \end{cases}$ | |
| Gaussiano | $e^{-\frac{1}{2}\ x\ ^2}$ | $e^{-\frac{1}{2}t}$ | |

Usando la notación de perfil, la fórmula 2.5 puede ser escrita como:

$$\hat{f}_{k,h}(y_0) = \frac{c_k}{Nh^d} \sum_{y_n \in B_h^*(y_0)} k \left(\left\| \frac{y_0 - y_n}{h} \right\|^2 \right). \quad (2.6)$$

A medida que el valor de \hat{f} decrece, la homogeneidad de $B_h^*(y_0)$ también aumenta, lo cual significa que la diferencia entre los elementos de la vecindad analizada también va a aumentar. Si $Y \cap B_h^*(y_0) = \emptyset$ significa que no hay puntos de Y en $B_h^*(y_0)$, por lo tanto $f(y_0) = 0$.

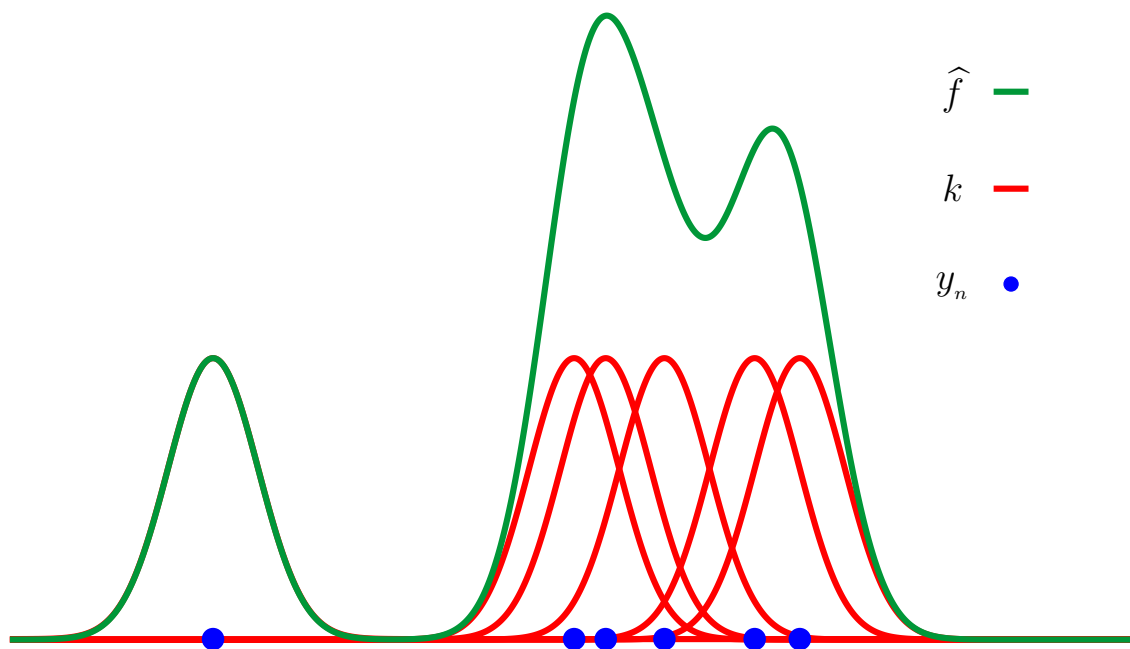


Figura 2.15: Función de densidad \hat{f} a partir del uso de núcleos gaussianos k . Cada núcleo centrado en los puntos azules y_n contribuye de forma aditiva para generar la función de densidad \hat{f} . Mientras más concentrados se encuentren los puntos mayor va a ser la contribución a la función de densidad.

La estimación del gradiente de densidad de f en y_0 [18, 21] está dado por:

$$\begin{aligned} \nabla \hat{f}_{k,h}(y_0) &= \widehat{\nabla f}_{k,h}(y_0) \\ &= \frac{2c_k}{Nh^d} \sum_{y_n \in B_h^*(y_0)} \frac{y_0 - y_n}{h^2} k' \left(\left\| \frac{y_0 - y_n}{h} \right\|^2 \right) \\ &= \frac{2c_k}{Nh^{d+2}} \sum_{y_n \in B_h^*(y_0)} (y_0 - y_n) \left[-g \left(\left\| \frac{y_0 - y_n}{h} \right\|^2 \right) \right] \\ &= \frac{2c_k}{Nh^{d+2}} \sum_n (y_n - y_0) g_n, \end{aligned} \quad (2.7)$$

donde g es un perfil que satisface:

- $g(\cdot) = -k'(\cdot)$, siendo $k'(\cdot)$ es la derivada de k ,
- $g_n = g\left(\left\|\frac{y_0 - y_n}{h}\right\|^2\right)$.

Aplicando transformaciones algebraicas a la última expresión de las igualdades dadas en la ecuación 2.8

$$\begin{aligned}
 \nabla \widehat{f}_{k,h}(y_0) &= \frac{2c_k}{Nh^{d+2}} \sum_n (y_n - y_0) g_n, \\
 &= \frac{2c_k}{Nh^{d+2}} \left(\sum_n y_n g_n - \sum_n y_0 g_n \right) \\
 &= \frac{2c_k}{Nh^{d+2}} \frac{\sum_n g_n}{\sum_n g_n} \left(\sum_n y_n g_n - y_0 \sum_n g_n \right) \\
 &= \frac{2c_k}{Nh^{d+2}} \sum_n g_n \left(\frac{\sum_n g_n y_n}{\sum_n g_n} - y_0 \frac{\sum_n g_n}{\sum_n g_n} \right),
 \end{aligned} \tag{2.8}$$

el estimador del gradiente de densidad está dado por:

$$\widehat{\nabla f}_{k,h}(y_0) = \frac{2c_k}{Nh^{d+2}} \cdot \sum_n g_n \cdot \left[\frac{\sum_n g_n y_n}{\sum_n g_n} - y_0 \right]. \tag{2.9}$$

Notar que el primer factor en la ecuación 2.9 es una constante. El segundo factor es proporcional al estimador de núcleo de densidad usando el perfil g y parámetro h :

$$\widehat{f}_{g,h}(y_0) = \frac{c_g}{Nh^d} \sum_n g_n. \tag{2.10}$$

Finalmente, el último término, dado por la expresión entre corchetes, es el vector MS con perfil g y parámetro h :

$$MS_{g,h}(y_0) = \frac{\sum_n g_n y_n}{\sum_n g_n} - y_0, \tag{2.11}$$

lo cual se refiere a la diferencia entre la media ponderada (SM , sample mean, por sus siglas en inglés) de los y_n que pertenecen a $B_h^*(y_0)$.

Notando que \widehat{f} también puede ser descrita empleando el perfil g , se llega a que:

$$\widehat{f}_{g,h}(y_0) = \frac{c_g}{Nh^d} \sum_{y_n \in B_h^*(y_0)} g\left(\left\|\frac{y_0 - y_n}{h}\right\|^2\right) = \frac{c_g}{Nh^d} \sum_n g_n. \tag{2.12}$$

Por lo tanto

$$\sum_n g_n = \hat{f}_{g,h}(y_0) \frac{Nh^d}{c_g} \quad (2.13)$$

Despejando MS en la fórmula 2.9 y sustituyendo la ecuación 2.13, se obtiene que MS siempre apunta en la misma dirección que el gradiente de densidad usando el perfil k , como se muestra en la ecuación 2.14.

$$\begin{aligned} MS_{g,h}(y_0) &= \frac{\hat{f}_{g,h}(y_0)}{\frac{2c_k}{Nh^{d+2}} \cdot \sum_n g_n} \\ &= \frac{\hat{f}_{g,h} Nh^{d+2}}{\sum_n g_n 2c_k} \\ &= \frac{\hat{f}_{g,h}}{\hat{f}_{g,h}(y_0) \frac{Nh^d}{c_g}} \frac{Nh^{d+2}}{2c_k} \\ &= \frac{\hat{f}_{g,h}}{\hat{f}_{g,h}(y_0)} \frac{Nh^{d+2}}{2c_k} \frac{c_g}{Nh^d} \\ &= \frac{h^2 c_g}{2 c_k} \frac{\widehat{\nabla} \hat{f}_{k,h}(y_0)}{\hat{f}_{g,h}(y_0)}. \end{aligned} \quad (2.14)$$

Los perfiles k y g están relacionados a través de la definición de *núcleo sombra*, también definida por Cheng [19]. Sean K y G dos núcleos con perfiles k y g respectivamente. Entonces K es núcleo sombra de G si la MS usando G se encuentra en la misma dirección del gradiente de densidad usando K . Como consecuencia directa se obtiene que k es un perfil sombra de g , y deben satisfacer la siguiente propiedad:

$$k'(t) = -c \cdot g(t), \quad (2.15)$$

donde c es una constante positiva.

$MS_{g,h}$ en y_0 es una medida de la homogeneidad de $B_h^*(y_0)$. A los puntos de mínima densidad local les corresponde grandes valores de la MS . Por esta razón, la teoría de la Media Desplazada fue pensada en sus inicios para alejarse de los puntos de mínima densidad local y converger hacia regiones de mayor densidad local. El proceso se repite de forma iterativa hasta alcanzar un punto para el cual no varía el valor de MS (moda de densidad del espacio) o estableciendo un criterio de parada en caso de ejecutarse muchas iteraciones [29–31]. El cálculo de las modas de densidad se realiza de forma directa sin tener que computar el valor de la MS , como se muestra en la siguiente expresión 2.16:

$$y_{i+1} = y_i + M_{h,G}(x) = y_i + \left[\frac{\sum_{i=1}^n x_i g\left(\left\|\frac{x-x_i}{h}\right\|^2\right)}{\sum_{i=1}^n g\left(\left\|\frac{x-x_i}{h}\right\|^2\right)} - y_i \right] = \frac{\sum_{i=1}^n x_i g\left(\left\|\frac{x-x_i}{h}\right\|^2\right)}{\sum_{i=1}^n g\left(\left\|\frac{x-x_i}{h}\right\|^2\right)}, \quad (2.16)$$

lo cual hace que sea una herramienta versátil en el procesamiento de datos.

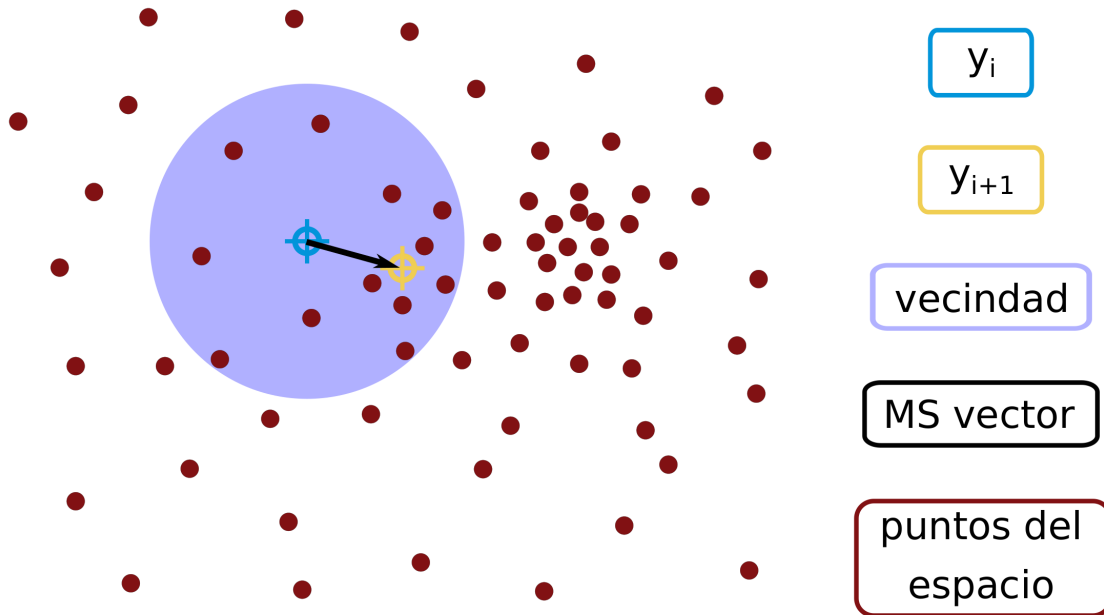


Figura 2.16: Representación del vector MS usado para buscar el punto de mayor densidad y_{i+1} , empleando una vecindad centrada en el punto y_i .

Las aplicaciones más populares de la MS son:

- agrupamiento (clustering),
- segmentación,
- detección de bordes preservando la forma de los objetos y
- seguimiento de objetos (tracking).

Capítulo 3

Estado del arte de algoritmos MSR

3.1. Difracción

En las últimas décadas, la microscopía de fluorescencia, ha tenido un notable avance en la observación y el estudio de objetos pequeños, siendo una herramienta esencial para estudiar las células vivas y comprender sus funciones fundamentales. Un microscopio óptico da una imagen ampliada de la muestra, que de otro modo no podría ser resuelta por el ojo humano. Sin embargo, el aumento alcanza una resolución limitada específica por efectos físicos causados por la difracción, definida como la distancia más pequeña necesaria para distinguir dos objetos puntuales.

La luz que se origina de un emisor puntual, no converge en un solo punto en el plano de la imagen, sino que se difumina en el espacio a un volumen de tamaño finito, producto de la convolución con la PSF generada al salir del objetivo del microscopio. De tal forma, que la extensión espacial de la PSF determina la dimensión más pequeña que se puede resolver en la imagen. Los emisores de luz cuyas dimensiones están dentro del orden de la longitud de onda de emisión, se consideran puntos de origen que se ven afectados por la difracción de la luz. Este efecto se modela mediante la convolución de la distribución de fluorescencia del emisor con la *PSF* del sistema óptico dada por la fórmula:

$$PSF_B = \left(\frac{2J_1(\nu)}{\nu} \right)^2,$$

donde J_1 es la función de Bessel de primer tipo y orden 1, $\nu = \frac{2\pi NA r}{\lambda n}$ es una distancia adimensional del eje óptico en el plano focal, NA es la apertura numérica del objetivo, r es la distancia radial, λ es la longitud de onda de emisión y n es el índice de refracción del medio utilizado en el objetivo del microscopio.

El resultado de convolucionar la *PSF* con un solo emisor forma un patrón Airy en el que aproximadamente el 86% de la luz emitida se aloja dentro del disco

central. Alrededor del disco central se disponen anillos concéntricos cuya intensidad disminuye en función de la distancia al centro. La ubicación del primer mínimo de intensidad con respecto al centro del disco se da a la distancia de

$$r = \frac{0,61\lambda}{NA}.$$

En la figura 3.1a¹ se puede apreciar un patrón de difracción generado por un haz de luz que atraviesa una abertura circular, en el cual la mayor intensidad de luz se encuentra concentrada en el disco central. La figura 3.1b muestra los elementos principales que caracterizan al patrón de difracción.

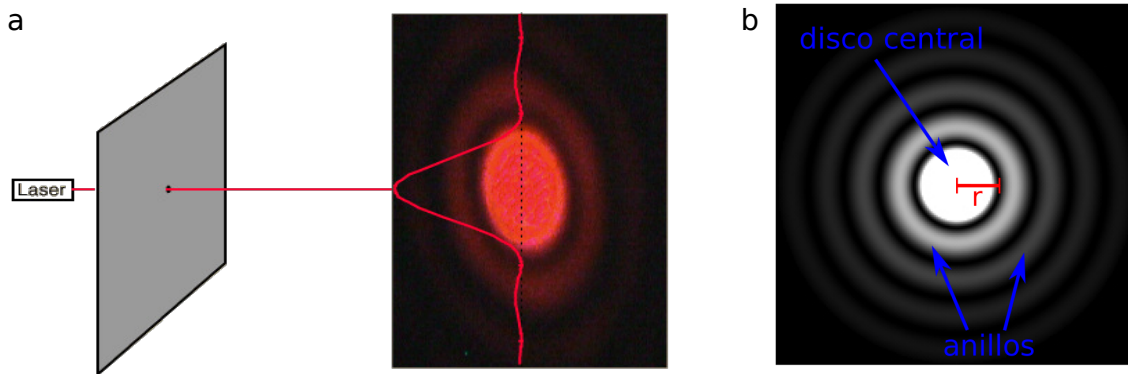


Figura 3.1: a) Patrón de difracción producido por un haz de luz que atraviesa una abertura circular. b) Elementos de patrón de difracción: disco central, anillos y distancia del centro del disco a su primer mínimo de intensidad.

Las consideraciones ópticas sugieren un cálculo robusto a NA por la expresión

$$NA = \frac{n_s}{n_{oil}} NA_{obj},$$

donde NA_{obj} es la apertura numérica del microscopio, n_s es el índice de refracción del medio en que está sumergida la muestra y n_{oil} es el índice de refracción del aceite entre la lente y el cubreobjetos.

La luz que emana del plano de la imagen se captura a través de una cámara, y se digitaliza como niveles de gris dentro de los pixeles representados como un enrejado bidimensional regular I . Se asume que los pixeles son cuadrados de ancho w predefinido por la cámara. De esta forma, el radio de un emisor recogido en el plano de la imagen se caracteriza por:

$$r(w) = \frac{0,61\lambda}{NA w}.$$

¹Imagen tomada y modificada de <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/phyopt/cirapp.html>.

Los pixeles ubicados dentro de esta región contienen la mayor cantidad de información sobre la ubicación del emisor. Por otro lado, los valores de los pixeles más allá de esta región determinarán el ruido de fondo de la imagen.

La PSF_B también se puede aproximar mediante una función gaussiana de la forma:

$$PSF_G = e^{-\frac{1}{2} \frac{x^2+y^2}{\sigma^2}},$$

donde x y y son coordenadas espaciales y σ es la desviación estándar de la distribución gaussiana a lo largo del plano XY .

Sean Δt el tiempo de adquisición entre cuadros de imagen y M el número de emisores. La emisión de un solo emisor parpadeante viene dada por:

$$c_m = e_m \int_0^{\Delta t} b(x) dx,$$

donde e_m es la potencia de emisión del emisor m y $b(x)$ es una función binaria de la señal recogida. Sea p un pixel con su centro ubicado en la posición x en el plano de la imagen, la contribución a p de todos M emisores va a estar dada por:

$$I(p) = \sum_{m=1}^M PSF_B(x) c_m w^2$$

o

$$I(p) = \sum_{m=1}^M PSF_G(x) c_m w^2.$$

Cuando dos emisores puntuales se encuentran a una distancia del orden de la longitud de onda de emisión λ , en ciertos casos es imposible distinguirlos. Es por ello, que se define la resolución óptica o simplemente resolución como la capacidad que tiene un sistema formador de imágenes para discernir entre dos emisores puntuales. Los criterios de Rayleigh y Sparrow dan una medida del poder de resolución que tienen los sistemas ópticos (microscopios ópticos o telescopios) los cuales van a depender de λ y NA . El criterio de Rayleigh se satisface cuando el máximo del patrón de difracción de uno de los emisores coincide con el primer mínimo del patrón de difracción del otro emisor. Como resultado se obtiene que entre los dos emisores va a haber un punto de ensilladura o valle, cuya altura va a ser aproximadamente un 80 % de la altura de la intensidad máxima de los emisores. Por otro lado, si la distancia entre los emisores es tal que no existe tal punto de ensilladura entonces se satisface el criterio de Sparrow. Debido a la importancia para el resto del documento, se introducirá el concepto de “*dip*”² como la altura en el

²El término “*dip*” significa en inglés depresión. En este trabajo se hace uso de esta palabra debido a que en español no se tiene una palabra específica para este concepto.

punto medio entre los dos emisores [32]. En la figura 3.2 se muestran los criterios de Rayleigh y Sparrow para dos emisores puntuales que han sido convolucionados por las PSFs de Bessel y gaussiana. A su vez, se muestra en cada caso el *dip* para cada una de las distribuciones resultantes.

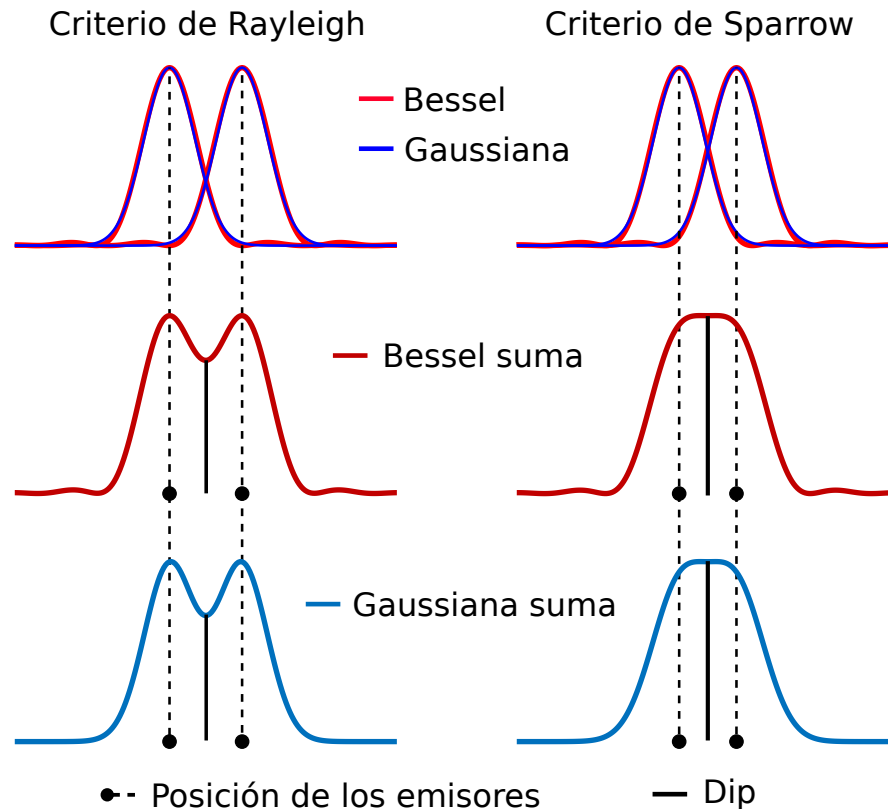


Figura 3.2: Criterios de Rayleigh y Sparrow para dos emisores simulados con distribución de Bessel y gaussiana. Notar que el patrón generado por la distribución gaussiana no genera protuberancias en las colas de los gráficos, a diferencia de la de Bessel. Las distribuciones que satisfacen el criterio de Rayleigh (primera columna) crean un valle entre los dos máximos de intensidad; el valor del *dip* asociado es menor que la altura máxima resultante. Las distribuciones que satisfacen el criterio de Sparrow (segunda columna) no crean valle entre las posiciones de los dos emisores, generando una región mayormente plana en la parte central; el valor del *dip* asociado coincide con la altura máxima de la distribución resultante.

3.2. Algoritmos de microscopía de super-resolución

La MSR abarca una colección de técnicas de nanoscopía de fluorescencia cuyos métodos logran rebasar el límite de difracción. Hay dos enfoques principales

de MSR: determinista y estocástico. Cada técnica varía desde la arquitectura del microscopio hasta sus aplicaciones computacionales. Por ejemplo, Microscopía de Iluminación Estructurada (*SIM*, Structured Illumination Microscopy) es un método determinista que usa franjas de Moiré para recuperar frecuencias espaciales de luz que de otra manera se perderían debido a la curvatura y la interferencia de la luz en movimiento. SIM recopila información espacial de la región de interés excitada a través de patrones regulares de luz y reconstruye imágenes de superresolución con aproximadamente 100-125 nm de resolución axial a partir de información capturada en el dominio de frecuencia [17, 33]. Otra técnica determinista como Estrechamiento por Emisiones Estimuladas (*STED*, Stimulated Emission Depletion), alcanza 30-80 nm de resolución axial utilizando rayos láser de excitación y de agotamiento dispuestos como matrices predefinidas de patrones de agotamiento de excitación, que limitan la emisión de fotones por debajo de la resolución espacial de la óptica del microscopio [34, 35]. La arquitectura de los sistemas STED y SIM es compleja, lo que exige personal dedicado para la construcción y el mantenimiento, lo que hace que sean muy costosos.

Técnicas estocásticas de MSR como Microscopía de Reconstrucción Óptica Estocástica (*STORM*) [4], Microscopía de localización fotoactivada (*PALM*) [15] y Acumulación de Puntos para Imágenes en Topografía a Escala Nanoscópica (*PAINT*) [16] aprovechan la dinámica de la fotofísica de los fluoróforos expuestos a través del tiempo, ya sea por transiciones de la fluorescencia a estados oscuros o mediante la unión transitoria de sondas fluorescentes a la estructura de estudio. Un requisito obligatorio para las técnicas STORM y PALM, es la identificación de emisores locales que brillan aleatoriamente durante cortos períodos de tiempo. Los puntos brillantes deben estar separados espacialmente, por lo tanto, la localización y el ajuste gaussiano de cada molécula es un algoritmo muy simple bajo estas condiciones. La posición del centro de cada molécula localizada se usa para construir un mapa con mayor detalle espacial de aproximadamente 10-50 nm de resolución. La imagen reconstruida se obtiene procesando grandes secuencias de imágenes (alrededor de 10000-60000 imágenes). Como resultado de eso, la resolución temporal a menudo se limita a los regímenes de segundos o minutos. Además, las realizaciones experimentales exitosas a menudo requieren protocolos personalizados para la preparación de muestras, que incluyen el uso de fluoróforos con propiedades fotofísicas susceptibles al parpadeo de los mismos.

En la última década, la MSR se ha desarrollado aún más mediante la invención de métodos analíticos que revelan detalles nanoscópicos mediante el uso de procedimientos puramente computacionales. El método Imagenología de Fluctuación de Superresolución (*SOFI*, Superresolution Optical Fluctuation Imaging, por sus siglas en inglés) explota las propiedades de parpadeo del fluoróforo, alcanzando regímenes de superresolución de 100-150 nm mediante el cálculo de acumulados cruzados espacio-temporales de orden superior de series de tiempo de pixeles de unos pocos miles de imágenes [9]. El método parpadeo y foto-blanqueo bayesiano (*3B*, Baye-

sian analysis of Blinking and Bleaching) crea un modelo nanoscópico de estructuras por medio de estadísticas bayesianas [6–8]. La reconstrucción de superresolución resultante se construye a partir del análisis de cientos de imágenes recopiladas en una escena estática o pseudoestática. La información nanoscópica se recopila a partir de un modelo de cadenas de Markov multifactorial que abarca las transiciones fotofísicas experimentadas por los fluoróforos unidos a la estructura que se quiere resolver. 3B proporciona información nanoscópica por debajo de 40 nm, sin embargo, sus implementaciones actuales exigen grandes esfuerzos de cálculo, debido a la necesidad de comparaciones estadísticas recursivas realizadas entre datos modelados y de origen, por lo tanto, las aplicaciones de 3B a menudo están limitadas por la disponibilidad de instalaciones especializadas en computación estadística.

La Fluctuación Radial de Superresolución (*SRRF*, Super-resolution radial fluctuations, por sus siglas en inglés) [11] es una técnica analítica de SRM muy popular en la actualidad que abarca un proceso de dos pasos. Estos pasos son el procesamiento de cada cuadro de la secuencia de imágenes, lo que se conoce como análisis espacial y condensar el resultado del paso anterior en una imagen se le conoce como análisis temporal [11]. La información local almacenada en el campo de intensidad de fluorescencia proporciona una resolución nanoscópica. Su principio se basa en la teoría de mapas de radialidad [36] que en sí misma proporciona información nanoscópica, sin embargo, también es sensible a cambios abruptos en el contraste local cuando el ruido es alto comparado con la señal. Es por ello que los autores de SRRF recomiendan que no sea utilizado para el análisis de imagen única y sugieren que solo sea aplicado a secuencias de imágenes mediante el análisis temporal. Como resultado de eso, SRRF abarca un análisis temporal destinado a reducir los artefactos de análisis de imágenes y ganar más resolución debido a un procesamiento estadístico de una secuencia corta de mapas de radialidad (alrededor de 100 imágenes). Dependiendo del diseño experimental y la arquitectura de hardware utilizada, SRRF ofrece 50-150 nm de resolución axial.

La técnica Imagen de Super-resolución basada en Entropía (*ESI*, Entropy-based Super-resolution Imaging, por sus siglas en inglés) calcula la entropía local y cruzada para estimar aún más la probabilidad de emisores a lo largo de una secuencia de imágenes [10]. ESI se caracteriza por ser eficaz en la eliminación de ruido y requiere cientos de cuadros para la reconstrucción MSR, sin embargo, la mejora de resolución lograda por ESI es escasa en comparación con SRRF. El algoritmo de clasificación de señales múltiples (*MUSICAL*, Multiple Signal Classification ALgorithm, por sus siglas en inglés) mejora la resolución mediante la descomposición de valores singulares en una secuencia de imágenes que dan como resultado imágenes singulares y sus respectivos valores singulares [12,37]. Cada valor singular caracteriza un patrón particular en la secuencia temporal captada de la escena de estudio. Se considera que la señal está asociada con valores propios grandes, mientras que el ruido y el fondo están asociados con valores propios pequeños. Un umbral predefinido divide el conjunto de imágenes propias en los espacios de rango

(señal) y espacio nulo (ruido y fondo). La proyección de la función de dispersión de puntos sobre estos espacios y su relación es una función indicadora, donde los valores grandes están relacionados con la presencia de emisores de fluorescencia y los valores pequeños con el ruido de fondo. MUSICAL ofrece resoluciones por debajo de 50 nm mediante el análisis de secuencia de imágenes, por lo tanto, es una técnica de SRM adecuada para el estudio de organelos en imágenes de células vivas.

3.3. Índices globales de resolución

El coeficiente de resolución de escala de Pearson (RSP) y el error de resolución de escala (RSE) son parámetros globales para medir la calidad de una reconstrucción [38]. RSP es una adaptación del coeficiente de correlación de Pearson para imágenes, y proporciona una medición de calidad global comparando la imagen de superresolución y la imagen de referencia (por ejemplo promedio de la secuencia de imágenes LD); su valor máximo ideal de 1 y un límite inferior de 0. RSE es el error cuadrático medio calculado entre la reconstrucción MSR y la imagen de referencia; mide las diferencias de intensidad de sus entradas, donde el caso ideal es $RSE = 0$.

Capítulo 4

Método propuesto: Algoritmo MSSR

4.1. Modelo de MS en imágenes

La caracterización de la *MS* en imágenes es definida en términos de las propiedades de los píxeles: posición e intensidad. Una imagen digital I es frecuentemente representada como vectores d -dimensionales (color o intensidad) en un arreglo m -dimensional (coordenadas o posición). La vecindad rango-espacial es una herramienta muy favorable para computar simultáneamente los valores de un núcleo de densidad mediante la posición y la intensidad de los píxeles. Teniendo esto en cuenta, es conveniente representar los píxeles mediante componentes en la forma $p = [x, y(x)]$, donde x representa la componente de coordenadas y $y(x)$ representa la componente de intensidad en x . Por tanto, la imagen I va a estar representada por $I = \{p_n\}_{n=1}^M$, donde M es el número de píxeles.

Sea $p_0 = [x_0, y(x_0)]$ un pixel dado, $\mathbf{h} = (h_s, h_r)$ el parámetro rango-espacial (un parámetro escalar por cada componente: espacial h_s y h_r rango). La vecindad rango-espacial $B_{\mathbf{h}}^*(p_0)$ está determinada por p_0 y \mathbf{h} . El perfil rango-espacial \mathbf{k} en p_0 va estar dado por el producto de los perfiles espacial y de rango mediante el uso del perfil k que es común para ambos (ver sección 2.3). Esto puede ser justificado ya que las componentes espacial y de rango son independientes una de la otra. Las siguientes ecuaciones definen la vecindad de rango espacial, el perfil y la función de densidad de probabilidad en p_0 , respectivamente:

$$B_{\mathbf{h}}^*(p_0) = \{p = [x, y] : 0 < \|x_0 - x\| \leq h_s, 0 < \|y(x_0) - y\| \leq h_r\}, \quad (4.1)$$

$$\mathbf{k}_{\mathbf{h}}(p_0, p_n) = k_s \cdot k_r = k \left(\left\| \frac{x_0 - x_n}{h_s} \right\|^2 \right) \cdot k \left(\left\| \frac{y(x_0) - y_n}{h_r} \right\|^2 \right), \quad p_n \in B_{\mathbf{h}}^*(p_0), \quad (4.2)$$

$$\hat{f}(p_0) = \frac{1}{N h_s^m h_r^d} \sum_{p_n \in V_{\mathbf{h}}^*(p_0)} \mathbf{k}_{\mathbf{h}}(p_0, p_n). \quad (4.3)$$

De la ecuación 4.2 se puede deducir el perfil que se usará para calcular el vector MS sobre un espacio de rango espacial. Se necesita definir una función que se encuentre en la dirección del gradiente de ambos espacios, circunscrita por h_s y h_r , simultáneamente. Hay que tener en cuenta que, el perfil k depende implícitamente de los componentes espacial y de rango, pero los perfiles k_s y k_r son independientes en relación a sus argumentos, como se muestra en la ecuación 4.4:

$$\mathbf{k}(t_s, t_r) = k_s(t_s) \cdot k_r(t_r). \quad (4.4)$$

Las derivadas parciales de k respecto a t_s y t_r están dadas por las siguientes expresiones:

$$\frac{\partial \mathbf{k}}{\partial t_s} = -k_r \cdot k'_s = -k_r \cdot g_s \quad \text{y} \quad \frac{\partial \mathbf{k}}{\partial t_r} = -k_s \cdot k'_r = -k_s \cdot g_r,$$

donde $g_s = k'_s$ and $g_r = k'_r$. En ambas ecuaciones, el primer factor es una constante negativa con respecto a la variable de derivación. Definiendo

$$\mathbf{g} = g_s \cdot g_r = k'_s \cdot k'_r, \quad (4.5)$$

la condición dada en la ecuación 2.15 (capítulo 3, sección 2.3.1) es satisfecha por \mathbf{g} para ambas componentes g_s y g_r . El resultado de la ecuación 4.5 nos lleva de forma directa a la siguiente definición:

Proposición 1. Sean g_s y g_r dos perfiles con sus respectivos perfiles sombra k_s and k_r . Entonces $\mathbf{k} = k_s \cdot k_r$ es un perfil sombra de $\mathbf{g} = g_s \cdot g_r$.

La generalización de la definición anterior a un producto de n perfiles es directa, siempre que los perfiles sean funciones de argumentos independientes.

Mirando hacia atrás en la notación utilizada en la ecuación 4.2, nos lleva a que la ecuación 4.5 puede ser escrita como:

$$\mathbf{g}_h(p_0, p_n) = g_s \cdot g_r = g \left(\left\| \frac{y(x_0) - y_n}{h_r} \right\|^2 \right) \cdot g \left(\left\| \frac{x_0 - x_n}{h_s} \right\|^2 \right), \quad p_n \in B_h^*(p_0). \quad (4.6)$$

Por tanto, el vector MS en el dominio rango-espacial es formulada como:

$$\mathbf{MS}_h(p_0) = \frac{\sum_n \mathbf{g}_h(p_0, p_n) y_n}{\sum_n \mathbf{g}_h(p_0, p_n)} - y(x_0). \quad (4.7)$$

Notar que $\mathbf{MS}_h(p_0)$ sólo se utiliza para calcular la intensidad en p_0 en el rango espacial, el cual alberga la intensidad de la fluorescencia en las coordenadas de p_0 .

El primer término en la fórmula 4.7 será denotado por SM_h , se refiere a la media muestral (media local ponderada) en el dominio rango-espacial:

$$SM_h(p_0) = \frac{\sum_n g_h(p_0, p_n) y_n}{\sum_n g_h(p_0, p_n)} = \sum_n q_n y_n. \quad (4.8)$$

donde

$$q_n = \frac{g_h(p_0, p_n)}{\sum_n g_h(p_0, p_n)}. \quad (4.9)$$

son coeficientes asociados a cada y_n . Notar que, independientemente del tamaño de k_n , todos los q_n se encuentran en el intervalo $(0, 1]$ y $\sum_n q_n = 1$. Por esta razón

$SM_h(p_0)$ es una combinación lineal convexa de todos $y_n \in B_h^*$, y en consecuencia $SM_h(p_0) \in B_h$.

En caso de que el parámetro h haya sido predefinido por condiciones físicas (como el caso del microscopio, (vea capítulo 3, sección 3.1 para un un mejor entendimiento), el subíndice h se elimina. La notación para aplicar MS en cada píxel de la imagen $MS(I)$ se indica como $MS(I)$. De forma similar, se empleará la expresión $SM(I)$ para la media muestral. Las siguientes expresiones son todas equivalentes:

$$MS(I) = SM(I) - I = \sum_n q_n y_n - I.$$

En esta sección, se ha presentado MS desde el punto de vista de una imagen digital. En la próxima sección, se muestra un teorema y su corolario sobre la localización del máximo de la distribución gaussiana usando MS en presencia de un emisor descrito por una distribución gaussiana.

4.2. Mínimo de la Media Desplazada. Teorema

En esta sección, el siguiente teorema a continuación es una demostración de la correspondencia del punto de máximo de una función gaussiana d -dimensional con el punto de mínimo de su resultado al aplicarle la MS . El punto de valor máximo representa el centro de emisores y los valores gaussianos simulan las intensidades. El caso de microscopía que abarca esta investigación se limita a imágenes bidimensionales (el caso tridimensional será abordado en investigaciones futuras). Las aplicaciones de la teoría que será expuesta, va más allá del campo de la microscopía, siendo aplicable a cualquier campo de la ciencia que utilice sistemas ópticos que se vean afectados por la difracción, como por ejemplo, la astronomía.

Teorema 1. Sea G una distribución gaussiana y p_0 el punto de valor máximo, entonces $MS(p_0)$ es un mínimo local.

Demostración. La idea general de esta demostración se divide en dos pasos. El primer paso consiste en mostrar que p_0 es un punto estacionario mostrando que el gradiente de MS es siempre un vector nulo. Finalmente, se demuestra que la matriz de hessiana de MS en p_0 es definida positiva.

Sin pérdida de generalidad, se asume que G tiene media 0, varianza σ en un espacio de d -dimensional y el punto de valor máximo se encuentra en el origen de coordenadas x_0 . Una representación digital de G viene dada por $p = [x, y(x)]$, donde $x = (x_1, \dots, x_d)$ y $y = \left(e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{x_l^2}{\sigma^2}}, \dots, e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{x_l^2}{\sigma^2}} \right)$.

Dada la vecindad $B^*(p_0)$, los elementos de esta región están distribuidos simétricamente alrededor de p_0 y están representados por:

$$p_{x_n} = [x_n, y_n] = [x_0 + \Delta x_n, y(x_0 + \Delta x_n)],$$

y

$$\Delta y_n = y(x_0) - y(x_n) = y_0 - y_n,$$

donde Δx_n es el desplazamiento de la l -ésima coordenada de x . La expresión para la función gaussiana en el punto p_{x_n} para la l -ésima coordenada está dada por

$$y_n = e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(x_l + \Delta x_{nl})^2}{\sigma^2}}.$$

El gradiente de MS está dado por:

$$\nabla MS = \left(\frac{\partial MS}{\partial x_1}, \dots, \frac{\partial MS}{\partial x_l}, \dots, \frac{\partial MS}{\partial x_d} \right),$$

$$\frac{\partial MS}{\partial x_l} = \sum_n \mathbf{q}_n \frac{\partial y_n}{\partial x_l} - \frac{\partial y}{\partial x_l} = - \sum_n \mathbf{q}_n e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(x_l + \Delta x_{nl})^2}{\sigma^2}} \frac{x_l + \Delta x_{nl}}{\sigma^2} + e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{x_l^2}{\sigma^2}} \frac{x_l}{\sigma^2},$$

donde l es el índice a lo largo de cada componente espacial y d es el número total de componentes espaciales.

La evaluación de ∇MS en p_0 es equivalente a asignar $x = 0$ en cada componente, y debido a la paridad de y , los Δx_n se distribuyen simétricamente en $B^*(p_0)$. Por tanto

$$\begin{aligned} \frac{\partial MS}{\partial x_l}(p_0) &= - \sum_n \mathbf{q}_n e^{-\sum_{l=1}^d \frac{(\Delta x_{nl})^2}{\sigma^2}} \frac{\Delta x_{nl}}{\sigma^2} \\ &= - \left[\sum_{\Delta x_{nl}} \mathbf{q}_n e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(\Delta x_{nl})^2}{\sigma^2}} \frac{\Delta x_{nl}}{\sigma^2} + \sum_{\Delta x'_{nl}} \mathbf{q}_n e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(\Delta x'_{nl})^2}{\sigma^2}} \frac{\Delta x'_{nl}}{\sigma^2} \right]. \end{aligned} \quad (4.10)$$

De esta forma, por cada x_n existe un elemento simétrico x'_n tal que

$$\Delta x_n + \Delta x'_n = 0 \text{ and } \Delta y_n = \Delta y_n'. \quad (4.11)$$

Además, notar que q_n (definida en la ecuación 4.9 en la sección anterior) solo depende de Δy_n , y dada su simetría, satisfacen

$$q_n(\Delta y_n) = q_n(\Delta y_n'). \quad (4.12)$$

La figura 4.1 muestra el caso bidimensional de la relación de dos puntos x_n y x'_n distribuidos simétricamente dentro de una vecindad de centro x_0 .

Vecindad espacial

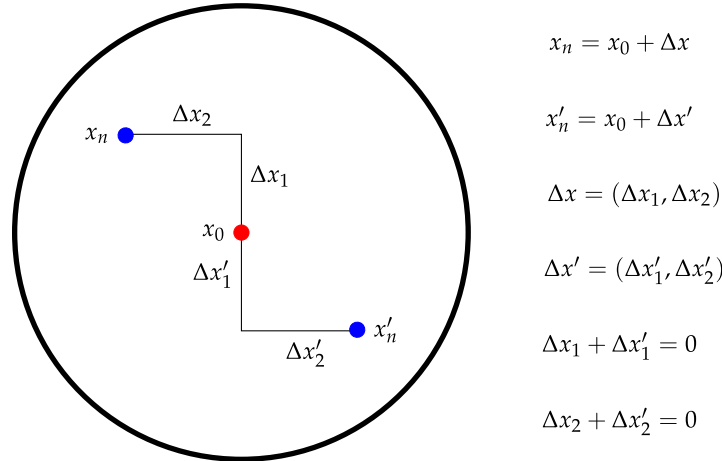


Figura 4.1: Distribución espacial de puntos simétricos que se cancelan entre sí por adición en la vecindad espacial de centro x_0 . El punto rojo en x_0 es el centro de la vecindad, los puntos azules en x_n y x'_n se distribuyen espacialmente de forma simétrica respecto a x_0 . Δx_n y $\Delta x'_n$ son las distancias de x_n y x'_n a partir de x_0 respectivamente. Notar que la suma de los desplazamientos es cero: $\Delta x_1 + \Delta x'_1 = 0$, $\Delta x_2 + \Delta x'_2 = 0$.

Consecuentemente, debido a la propiedad de simetría, se llega al siguiente resultado:

$$\frac{\partial MS}{\partial x_l}(p_0) = - \sum_{\Delta x_{n_l}} q_n \left[e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(\Delta x_{n_l})^2}{\sigma^2}} \frac{\Delta x_{n_l}}{\sigma^2} + \sum_{\Delta x'_{n_l}} q_n e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(\Delta x'_{n_l})^2}{\sigma^2}} \frac{\Delta x_{n_l}}{\sigma^2} \right] = 0 \quad (4.13)$$

Esto es válido para todas las componentes de MS_h , por lo que $\nabla MS = 0$. Por tanto, p_0 es un punto estacionario de MS .

Ahora se prueba que p_0 es un mínimo de MS_h .

La matriz hessiana de MS está dada por la siguiente expresión:

$$H(MS) = \left[\frac{\partial^2 MS}{\partial x_i \partial x_j} \right]_{i,j=1,\overline{d}},$$

donde, los elementos fuera de la diagonal de la matriz de hessiana están dados por:

$$\left(\frac{\partial^2 MS}{\partial x_i \partial x_j} \right)_{i \neq j} = \sum_n \mathbf{q}_n e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(x_{n_l} + \Delta x_{n_l})^2}{\sigma^2}} \left(-\frac{x_{n_i} + \Delta x_{n_i}}{\sigma^2} \right) \left(-\frac{x_{n_j} + \Delta x_{n_j}}{\sigma^2} \right).$$

Evaluando la ecuación anterior en p_0 , se obtiene que:

$$\left(\frac{\partial^2 MS}{\partial x_i \partial x_j} \right)_{i \neq j} (p_0) = \sum_n \mathbf{q}_n e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(\Delta x_{n_l})^2}{\sigma^2}} \frac{\Delta x_{n_i} \Delta x_{n_j}}{\sigma^4}.$$

Una vez más, dada la simetría de $B^*(p_0)$ para cada Δx_{n_i} y Δx_{n_j} existen $\Delta x'_{n_i}$ y $\Delta x'_{n_j}$ tal que $\Delta x_{n_i} \Delta x_{n_j} + \Delta x'_{n_i} \Delta x'_{n_j} = 0$ (ver figura 4.2). Por tanto,

$$\begin{aligned} \left(\frac{\partial^2 MS}{\partial x_i \partial x_j} \right)_{i \neq j} (p_0) &= \sum_{\Delta x_{n_i}, \Delta x_{n_j}} \mathbf{q}_n e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(\Delta x_{n_l})^2}{\sigma^2}} \frac{\Delta x_{n_i} \Delta x_{n_j}}{\sigma^4} + \sum_{\Delta x'_{n_i}, \Delta x'_{n_j}} \mathbf{q}_n e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(\Delta x'_{n_l})^2}{\sigma^2}} \frac{\Delta x'_{n_i} \Delta x'_{n_j}}{\sigma^4} \\ &= 0 \end{aligned}$$

Los elementos en la diagonal de la matriz de hessiana están dados por:

$$\frac{\partial^2 MS}{\partial x_i^2} = \sum_n \mathbf{q}_n e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(x_{n_l} + \Delta x_{n_l})^2}{\sigma^2}} \frac{(x_{n_i} + \Delta x_{n_i})^2 - \sigma^2}{\sigma^4} - e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(x_{n_l})^2}{\sigma^2}} \frac{x_{n_i}^2 - \sigma^2}{\sigma^4}. \quad (4.14)$$

Evaluando p_0 en la ecuación 4.14, se obtiene:

$$\begin{aligned} \frac{\partial^2 MS_h}{\partial x_i^2} (p_0) &= \sum_n \mathbf{q}_n e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(\Delta x_{n_l})^2}{\sigma^2}} \frac{(\Delta x_{n_i})^2 - \sigma^2}{\sigma^4} + \frac{1}{\sigma^2} \\ &= \sum_n \frac{\mathbf{q}_n}{\sigma^2} \left[e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(\Delta x_{n_l})^2}{\sigma^2}} \frac{(\Delta x_{n_i})^2 - \sigma^2}{\sigma^2} + 1 \right]. \end{aligned} \quad (4.15)$$

Dado que los valores de \mathbf{q}_n son siempre positivos, la fracción $\frac{\mathbf{q}_n}{\sigma^2}$ también es positiva. Por otro lado, tenga en cuenta que $\sum_{l=1}^d \frac{(\Delta x_{n_l})^2}{\sigma^2} > 0$ y $0 < |\Delta x_{n_i}| \leq \sigma$ lo cual implica que:

$$0 < e^{-\frac{1}{2} \sum_{l=1}^d \frac{(\Delta x_{n_l})^2}{\sigma^2}} < 1 \quad \text{y} \quad -1 < \frac{(\Delta x_{n_i})^2 - \sigma^2}{\sigma^2} < 0 \quad \forall n_i.$$

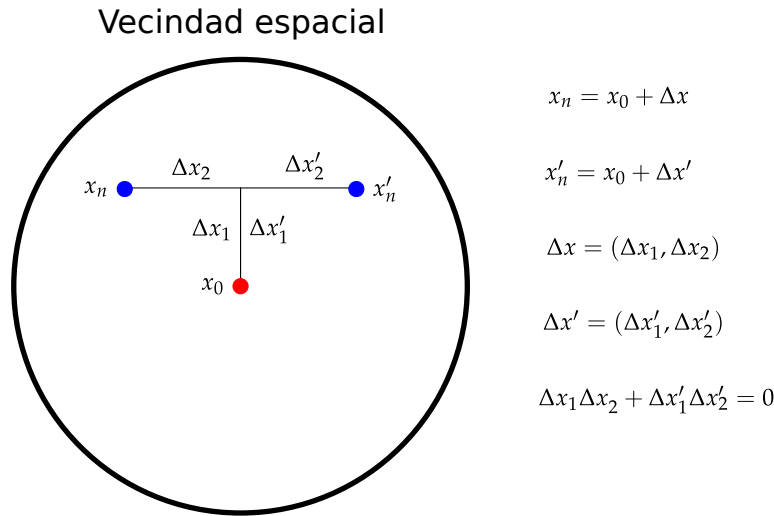


Figura 4.2: Distribución espacial de puntos simétricos que se cancelan entre sí por las operaciones de producto y adición alrededor del centro de una vecindad espacial. El punto rojo en x_0 es el centro de la vecindad, los puntos azules en x_n y x'_n se distribuyen espacialmente de forma simétrica respecto a x_0 . Δx_n y $\Delta x'_n$ son las distancias de x_n y x'_n a partir de x_0 respectivamente. Notar que la suma del producto de las distancias por coordenadas es cero: $\Delta x_1 \Delta x_2 + \Delta x'_1 \Delta x_2 = 0$.

Por lo tanto, la expresión

$$e^{-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^d \frac{(\Delta x_{n_i})^2}{\sigma^2}} \frac{(\Delta x_{n_i})^2 - \sigma^2}{\sigma^2}$$

pertenece a intervalo abierto $(0, 1)$ y el término entre paréntesis en la ecuación 4.15 es siempre positivo:

$$e^{-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^d \frac{(\Delta x_{n_i})^2}{\sigma^2}} \frac{(\Delta x_{n_i})^2 - \sigma^2}{\sigma^2} + 1 > 0.$$

La matriz hessiana toma la forma:

$$H(MS(p_0)) = \begin{bmatrix} a_1 & \dots & 0 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & \dots & a_d \end{bmatrix},$$

donde $a_i = \frac{\partial^2 MS}{\partial x_i^2}(p_0)$. Notar que sólo los elementos en la diagonal son positivos, por otro lado, los elementos restantes son 0. Los menores principales de $H(MS(p_0))$ son $m_l = \prod_{s=1}^l a_s > 0$ y $H(MS(p_0))$ es definida positiva. La demostración está completa. \square

4.3. Fundamentos de MSSR

MSSR (**M**ean **S**hift **S**uper-**R**esolution, leer como “messer”) se basa en la teoría de la *MS* para reducir el efecto causado por difracción y no se centra en localizar los centros de los emisores. En este sentido, *MSSR* difiere de la concepción iterativa clásica de la teoría de la *MS* para encontrar las modas (centros emisores) mediante el cálculo sucesivo de la *media muestral*. El algoritmo propuesto se basa en calcular explícitamente el valor de *MS*.

El algoritmo *MSSR* está respaldado por un análisis espacial que da como resultado una imagen *MSSR* de super-resolución y un análisis temporal que integra toda la información a partir de una secuencia de imágenes *MSSR* de súper-resolución. La combinación apropiada de ambos análisis puede revelar detalles nanoscópicos en imágenes limitadas por difracción. La figura 4.3 muestra el diagrama de flujo del algoritmo *MSSR*, cada uno de los pasos se expondrán en las siguientes secciones.

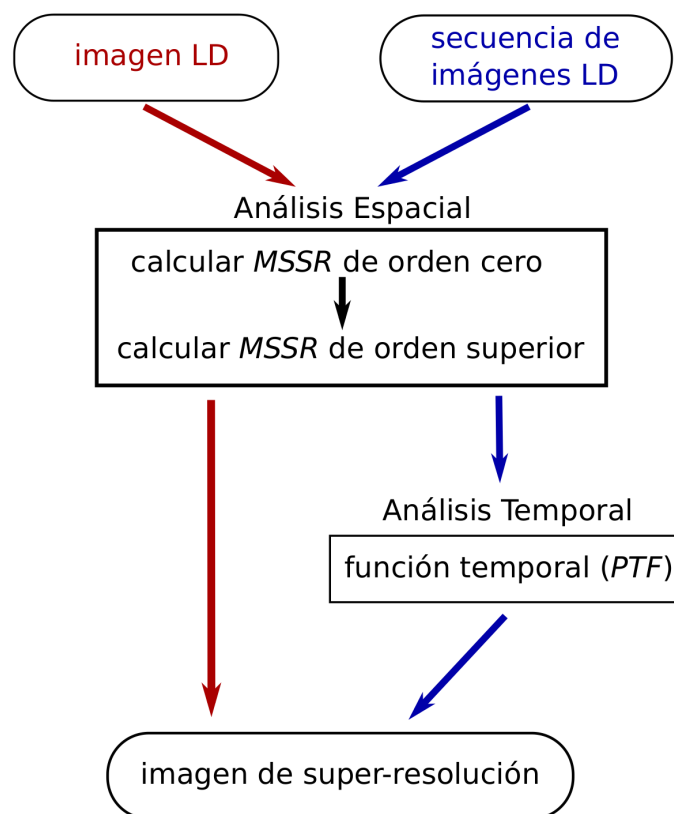


Figura 4.3: Diagrama de flujo del algoritmo MSSR. Tanto la imagen LD como la secuencia LD, requieren un análisis espacial, con el cual se calcula MSSR de un orden dado. El análisis temporal solo se aplica a secuencias de imágenes.

4.3.1. Análisis espacial

El análisis de $MSSR$ de un solo cuadro puede ser dividido en dos etapas principales: orden 0 ($MSSR^0$) y órdenes superiores ($MSSR^n$, $n > 0$). Cada etapa contribuye a mejorar la resolución de la imagen. A continuación se hace una descripción detallada de cada etapa.

MSSR de orden zero

Dada una imagen I , se calcula MS con parámetro rango-espacial $\mathbf{h} = (h_s, h_r)$ y perfil g . El núcleo se desliza a lo largo de la imagen calculando SM , restándolo con el valor del centro de la vecindad, como se muestra en la figura 4.4 para el caso de una PSF gaussiana. La comparación de $MSSR$ para diferentes valores de h_r y h_s aplicados a una distribución gaussiana sugiere el uso de un parámetro de rango adaptativo (figura 4.5 a-b). Tenga en cuenta que para h_r fijos y h_s variables, no hay casi diferencias en los resultados de MSS resultantes (figura 4.5 a). Por otro lado, al fijar h_s y variar h_r , se genera artefactos en la cola del resultado $MSSR$ (figura 4.5 b). Por esta razón, el ancho de banda del rango h_r se adapta a cada vecindario del rango tomando la diferencia máxima entre su centro y sus vecinos (figura 4.5c). En este sentido, el uso de un núcleo uniforme causará el efecto en 4.5 y un núcleo gaussiano es adecuado para lograr la distinción entre los resultados de $MSSR$ como se muestra en la figura 4.5c. La selección de h_s se basó en el hecho de que, en la distribución de Bessel, las mayores intensidades se concentran en el disco central. Al ajustar una distribución gaussiana a la distribución de Bessel, el primer mínimo es aproximadamente 2.5 veces la desviación estándar ($2,5\sigma$). Por esta razón, el parámetro espacial h_s está predefinido por PSF_p equivalente a $\frac{\lambda}{2NA}$, como se muestra en la figura 4.5.

Como fue descrito en el capítulo 2, sección 2.3, el vector MS apunta hacia el punto de máxima densidad local. De esta manera, la magnitud o longitud del vector MS es mayor en los puntos de mínima densidad local que en los puntos de máxima densidad local. Para emisores aislados, el punto de densidad máxima local coincide con el punto de mínimo MS , a su vez, se crea un punto de ensilladura para la MS . Los puntos de densidad mínima local de MS cortan la curva MS en tres regiones. La región central comprendida entre los puntos azules, contiene la posición del fluoróforo centrada en el punto de máxima densidad local, marcado con color rojo (figura 4.6). Más aún, esta región se caracteriza por que los valores de la MS son siempre negativos, lo que confirma que siempre va a haber un punto de máxima densidad local en su centro. Por otro lado, las dos regiones de la MS asociadas a las colas de la distribución gaussiana (regiones no comprendidas entre los puntos azules) siempre tienen valores positivos. Curiosamente, para puntos ubicados en las colas de la distribución gaussiana y que estén muy alejados del centro, el valor de la MS

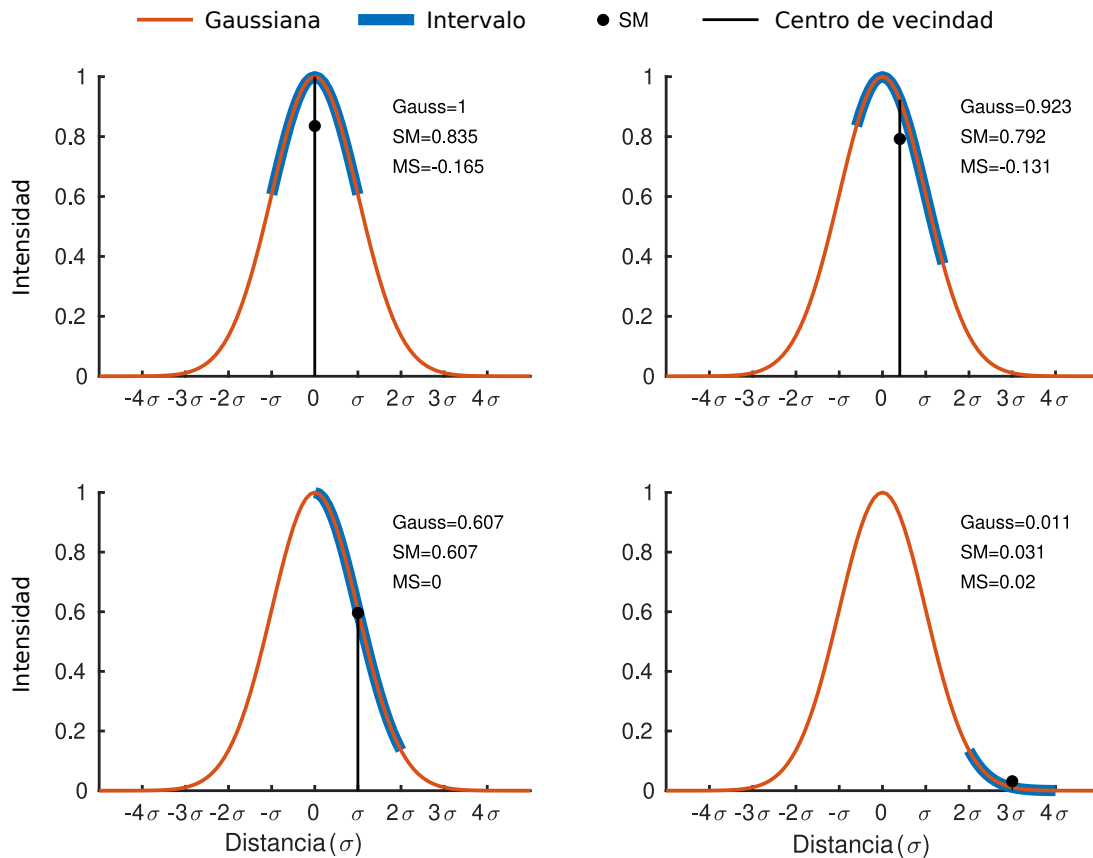


Figura 4.4: Diferentes valores de SM , de acuerdo con diferentes ubicaciones de la vecindad de radio 2σ en una distribución gaussiana. La línea roja, la línea azul gruesa, el punto negro y la línea negra corresponden a la distribución gaussiana, el intervalo gaussiano, la media muestral (SM) del intervalo y el centro del intervalo, respectivamente. En todos los gráficos, la línea negra se intercepta con SM y la curva gaussiana. En el gráfico superior izquierdo, el intervalo es simétrico y centrado en cero, la media muestral asociada a esta región está debajo de la curva. Un caso similar se muestra en el gráfico superior derecho, donde el centro del intervalo se ha desplazado ligeramente hacia la derecha y la media de la muestra está más cerca que en el gráfico anterior. El gráfico inferior izquierdo muestra el intervalo centrado en σ y la media de la muestra coincide con la curva. El gráfico inferior derecho muestra el centro del intervalo en 3σ (un punto ubicado más allá de σ), tenga en cuenta que la media de la muestra está por encima de la curva.

es prácticamente cero, lo cual se interpreta como que estas regiones presentan alta densidad local, pero sus intensidades son en la distribución gaussiana son cercanas a zero.

Cuanto más negativo sea el valor de MS , mayor será la probabilidad de presencia de fluoróforos, mientras que los valores positivos de MS indican su ausencia. Por esta

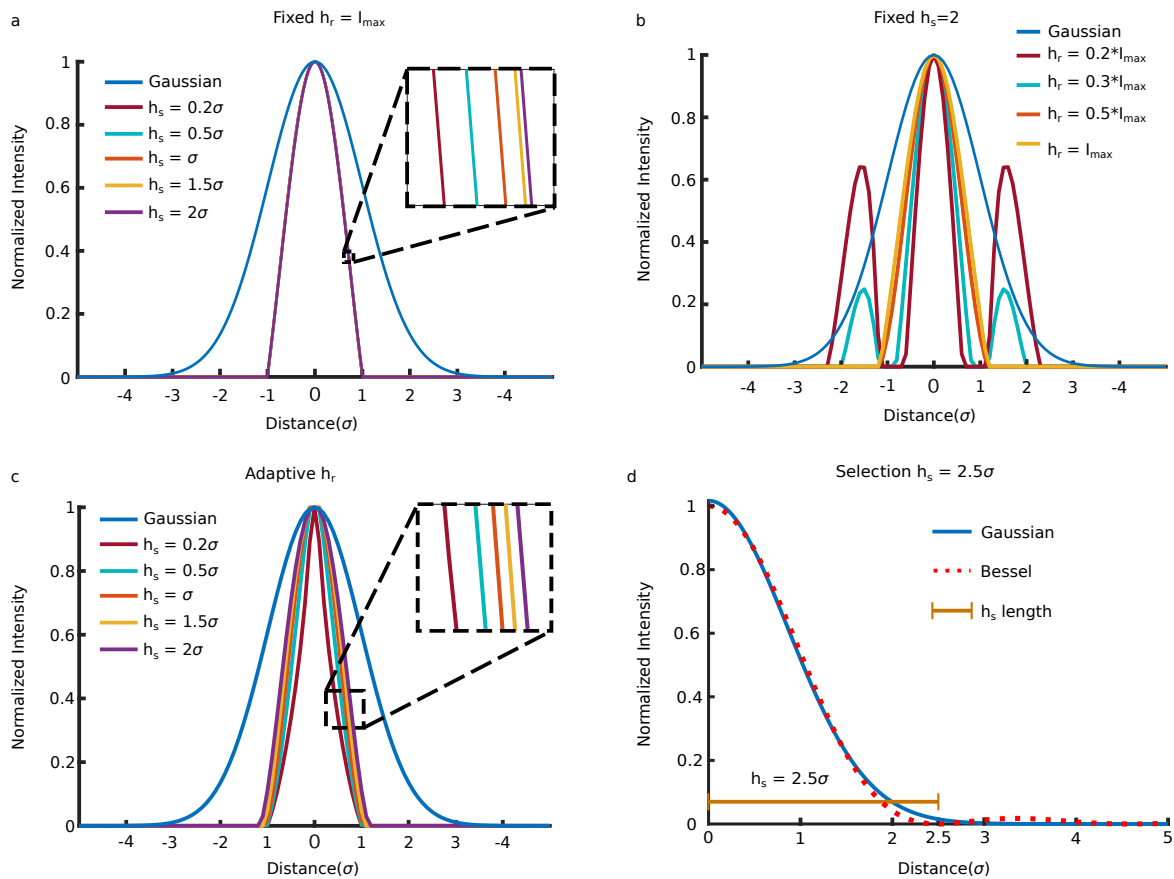


Figura 4.5: Comportamiento de $MSSR$ con la variación de h_r , h_s , h_r adaptativo. a) Comparación de una distribución gaussiana y $MSSR$ usando un h_r fijo igual a la intensidad máxima de la distribución y variando h_s , en este caso las distintas distribuciones de $MSSR$ son prácticamente indistinguibles. b) Comparación de una distribución gaussiana y $MSSR$ usando un h_s fijo igual a la intensidad máxima de la distribución y variando h_r . Los valores más bajos de h_r generan artefactos en la cola de la distribución $MSSR$. c) Comparación de una distribución gaussiana y $MSSR$ utilizando un h_r adaptativo. d) Selección de $h_s = 2,5\sigma$ con el fin de utilizar la mayoría de las intensidades de la región central y evitar intensidades consideradas como ruido en la cola de la distribución de Bessel.

razón, se toma el valor negativo de MS para reducir el efecto del PSF , obteniendo así una imagen en que las intensidades más brillantes se concentran hacia el centro de los fluoróforos.

La siguiente expresión es el negativo de MS :

$$MSSR(I) = -MS(I).$$

A los valores negativos de $MSSR$ se les reasigna el valor cero y la imagen resultante se normaliza al valor máximo de la imagen original I . Este paso se denomina $MSSR$

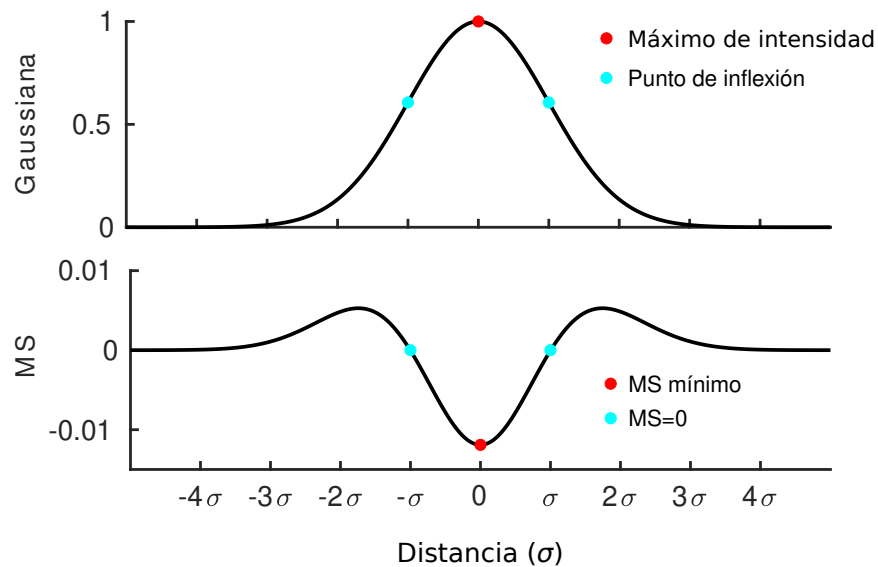


Figura 4.6: Puntos principales de la distribución gaussiana y su correspondiente resultado MS . En el gráfico superior, el punto rojo es al mismo tiempo, el punto de intensidad máxima y el punto de densidad local máxima para la distribución gaussiana. En el gráfico inferior, el punto rojo es un punto local mínimo para MS . Por otro lado, los puntos azules marcan donde MS es igual a cero en σ que coinciden con los puntos de inflexión gaussianos.

de orden cero y se denota como $MSSR^0$. Dado que $MSSR$ es el negativo de MS , una consecuencia directa del teorema 1 es el siguiente corolario:

Corolario 1. Sean G una distribución gaussiana y p_0 el punto de valor máximo de G , entonces $MSSR(p_0)$ es un máximo local.

Este corolario es un resultado importante para las aplicaciones que se realicen con MSSR, ya que nos dice que los fluoróforos se pueden localizar con alta precisión por $MSSR$. La figura 4.7 muestra cómo una distribución gaussiana es afectada por la MS y su correspondiente resultado de $MSSR^0$.

Resultados comparativos de $MSSR$ aplicados sobre una distribución Gaussiana y de Bessel se presentan en la figura 4.8. $MSSR$ reduce el radio de una distribución gaussiana aproximadamente a la mitad. La distribución de Bessel se ve afectada de manera similar, para la cual $MSSR$ reduce el radio del disco central. Además, los anillos concéntricos de la distribución de Bessel se reducen en ancho e intensidad, y como consecuencia, ya no se pueden distinguir. Por esta razón, los emisores cercanos no se verán afectados por la presencia de anillos del patrón de difracción.

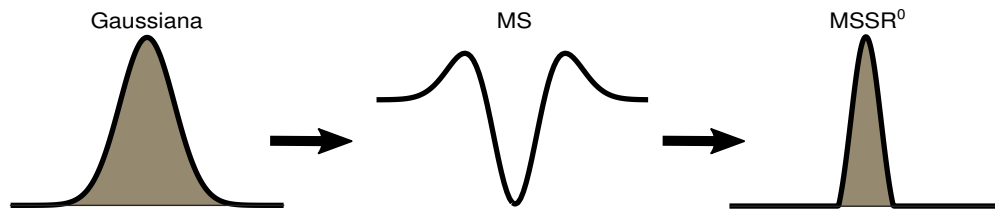


Figura 4.7: La MS se aplica a la distribución de fluorescencia inicial (izquierda), en este caso, distribución gaussiana, dando como resultado un gráfico de MS (centro). La aplicación de más transformaciones algebraicas proporciona la distribución $MSSR^0$ (derecha).

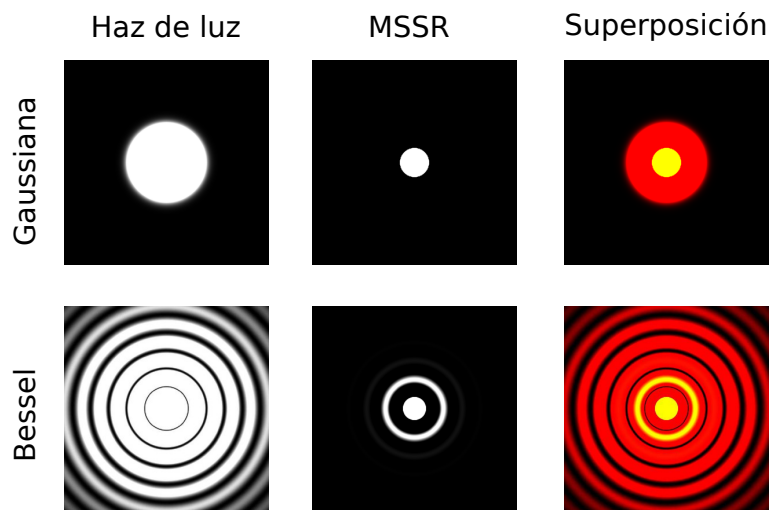


Figura 4.8: $MSSR$ aplicado a distribuciones de Gauss y Bessel. Primera fila: haz gaussiano y su resultado $MSSR$ correspondiente. Segunda fila: haz de Bessel y su correspondiente resultado $MSSR$. Por columna de izquierda a derecha: tipo de haz de luz, resultado $MSSR$ y superposición de las imágenes anteriores. Todas las imágenes se han ajustado al mismo nivel de gris al 0.4 % de la intensidad máxima, para mostrar los anillos de Bessel.

Los límites de Rayleigh y Sparrow son dos criterios que establecen límites de resolución para dos fuentes de puntos relativamente cercanos. El concepto de dip y ambos límites de resolución serán usados para caracterizar la capacidad de $MSSR$, para distinguir entre dos emisores ubicados a una distancia dada. Cuando dos emisores están ubicados cercanos al límite de difracción, la densidad alrededor del punto medio entre ellos es muy alta, especialmente para el límite de Sparrow (figura 4.9a). Las figuras 4.9a y 4.9b muestran que tanto en los límites de Sparrow como de Rayleigh, el $MSSR^0$ resultante presenta un valle en el medio de la ubicación de los emisores, es decir, la intensidad del punto medio entre ellos disminuye y se establece un nuevo límite de resolución. La caída de $MSSR^0$ casi desaparece

cuando los emisores se ubican dentro del criterio de Rayleigh, convirtiéndose en solo alrededor del 15 % de la altura máxima. Cuando los emisores están ubicados dentro del límite de Sparrow, la caída de $MSSR^0$ es aproximadamente el 70 % de la intensidad máxima, lo que demuestra que $MSSR^0$ resuelve emisores cercanos que de otro modo no se distinguirían.

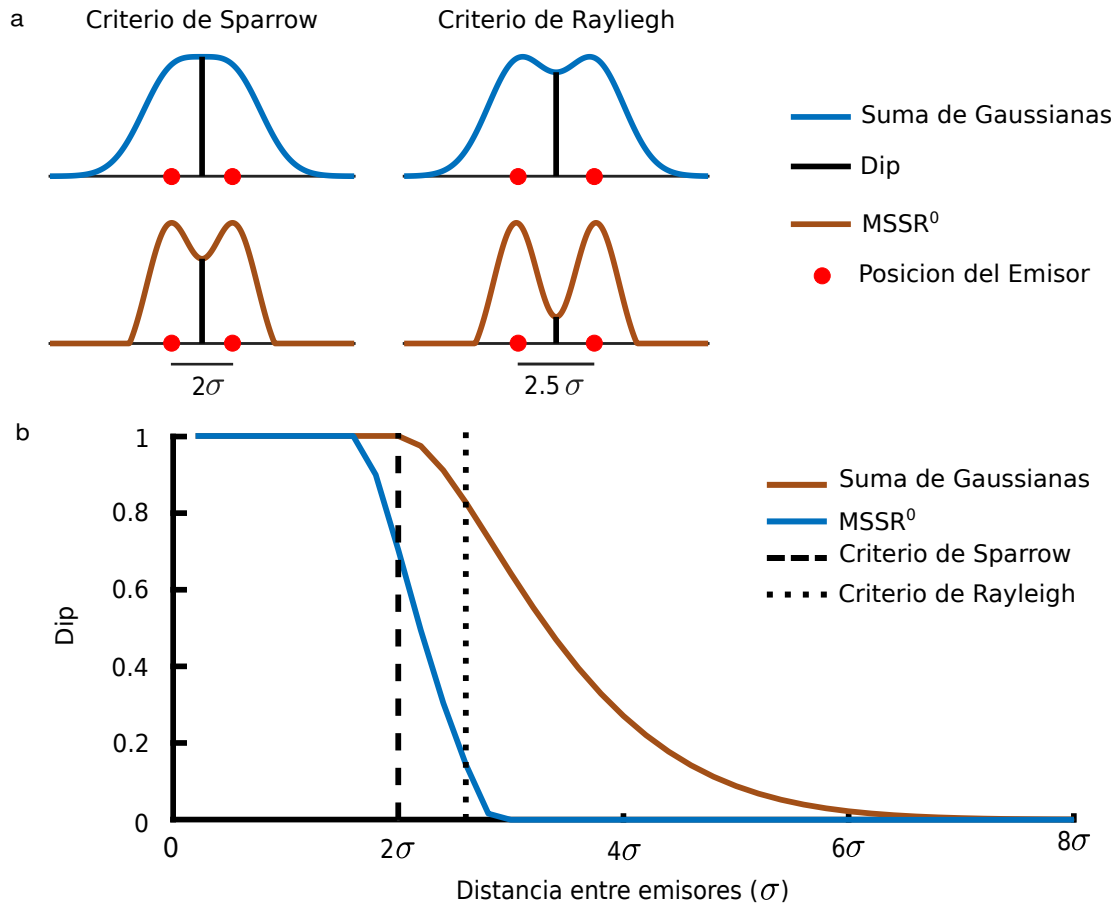


Figura 4.9: Límites de Sparrow y Rayleigh (azul, distribución DL) y la correspondiente transformación $MSSR^0$ (marrón) para dos fuentes puntuales. Los puntos rojos representan la ubicación de cada emisor. El dip está indicado por una línea negra vertical. b) Valor de dip calculado para dos emisores gaussianos ubicados a distintas distancias en función de σ (trazo azul) donde también se representa el resultado correspondiente a $MSSR^0$ (trazo rojo). Los límites de Rayleigh y Sparrow están marcados por líneas de puntos largos y cortos, respectivamente.

La figura 4.10a muestra un emisor simulado con una distribución de Bessel usando una longitud de onda de 488 nm y el resultado correspondiente de $MSSR^0$ se muestra en la Fig. Complementaria 4.10b. En ambos gráficos, se ajusta una distribución gaussiana para obtener la distribución estándar respectiva. La figura

4.10c muestra la dependencia lineal de σ y cada distribución modelada para diferentes longitudes de onda del espectro visible.

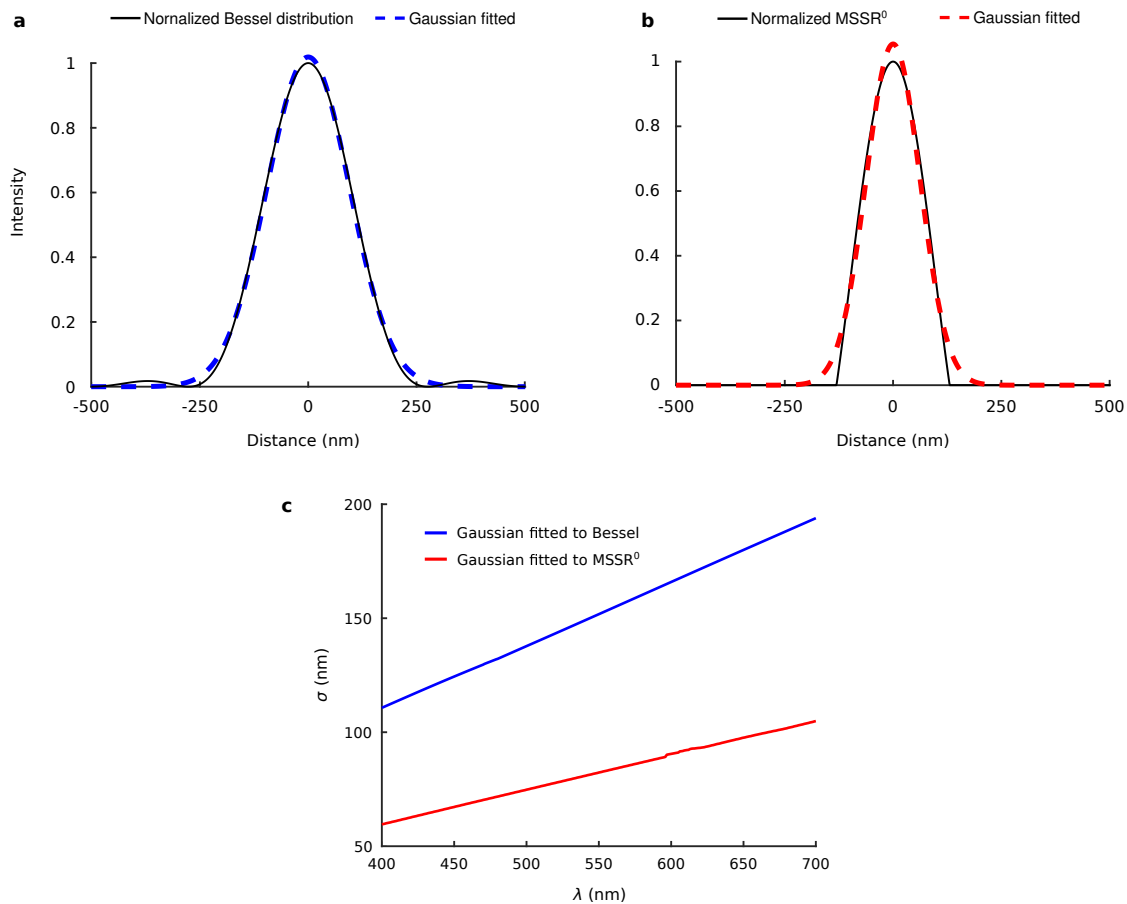


Figura 4.10: Desviación estándar de la distribución gaussiana ajustada a la distribución de Bessel y su resultado correspondiente de $MSSR^0$ para diferentes valores de longitud de onda. a) Gaussiana ajustada (línea azul discontinua) a la distribución de Bessel (línea negra continua) del emisor simulado con una longitud de onda de 488 nm. b) Gaussiana ajustada (línea roja discontinua) a $MSSR^0$ (línea negra continua) de la distribución de Bessel obtenida en a). c) Gráfico de la desviación estándar de la distribución gaussiana (σ) ajustada a la distribución de Bessel (línea azul) y el resultado correspondiente de $MSSR^0$ (línea roja).

MSSR de órdenes superiores

El segundo paso de $MSSR$ abarca una secuencia de operaciones iterativas que aumenta la resolución de la imagen. Este procedimiento se denomina $MSSR$ de órdenes superiores denotado por $MSSR^n$ con $n > 0$. Los $MSSR$ de órdenes superiores proporcionan una ganancia adicional de resolución por cada paso de

iteración. El poder de $MSSR$ para resolver estructuras aumenta con cada orden n o iteración de $MSSR$, al disminuir el ancho a la mitad de la altura máxima ($FWHM$, full width at half maxima, por sus siglas en inglés) de los emisores.

Dado que el $FWHM$ del emisor se ha reducido de la imagen original I a $MSSR$, se calcula la diferencia entre I y $MSSR$. El resultado de esta diferencia produce un punto de ensilladura en el centro del emisor, este paso es denotado por $Diff$. A continuación, se calcula y normaliza el complemento de $Diff$. Tenga en cuenta que las intensidades fuera del intervalo $[-\sigma, \sigma]$ son diferentes de cero, para situaciones no ideales puede provocar artefactos. Por esta razón, se requiere una ponderación de intensidad con la imagen $MSSR$ para eliminar los artefactos indeseables. La secuencia de pasos anteriores, se repite de forma iterativa. La figura 4.11 muestra una representación gráfica de todo el procedimiento.

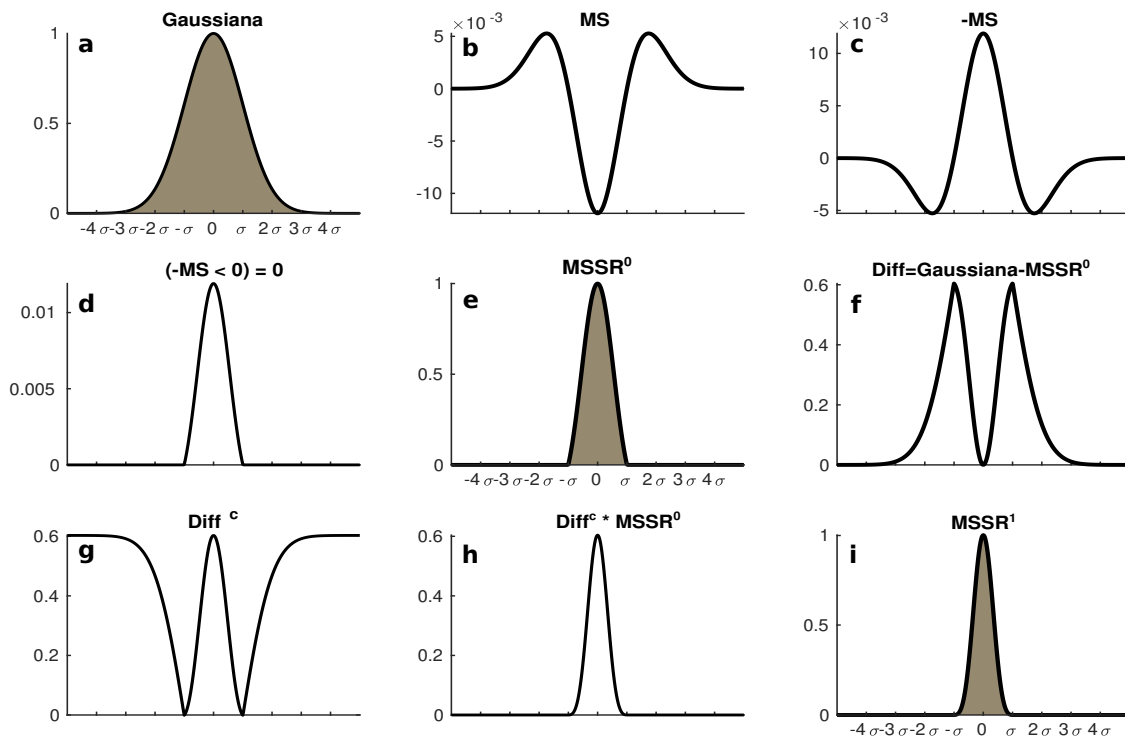


Figura 4.11: Representación gráfica del cálculo de $MSSR^n$ de una distribución gaussiana. a) Pasos del procedimiento $MSSR$: pasos analíticos necesarios para $MSSR$ de orden cero (a-e) y para órdenes superiores (f-i). La MS se aplica a la distribución de fluorescencia inicial (a) dando como resultado un gráfico MS (b). El negativo de MS se calcula para establecer el mínimo de MS en un máximo (c). Los valores negativos se establecen en cero (d). Los valores son normalizados en (e). La diferencia entre la imagen de entrada y $MSSR^0$ crea un valle ubicado entre los puntos máximos en $\pm\sigma$ (f). Se calcula el complemento (g) y la ponderación de la intensidad con el resultado de $MSSR^0$ (h). Normalización dando el $MSSR$ del orden 1 ($MSSR^1$) (i).

La figura 4.12a muestra un diagrama del proceso para un emisor bidimensional. El $FWHM$ de una distribución gaussiana disminuye a medida que aumenta el número de iteraciones de $MSSR$, (figura 4.12b-c). En la práctica, debido a que los emisores se degradan con cada iteración, el orden se establece en el rango de 0 hasta 3.

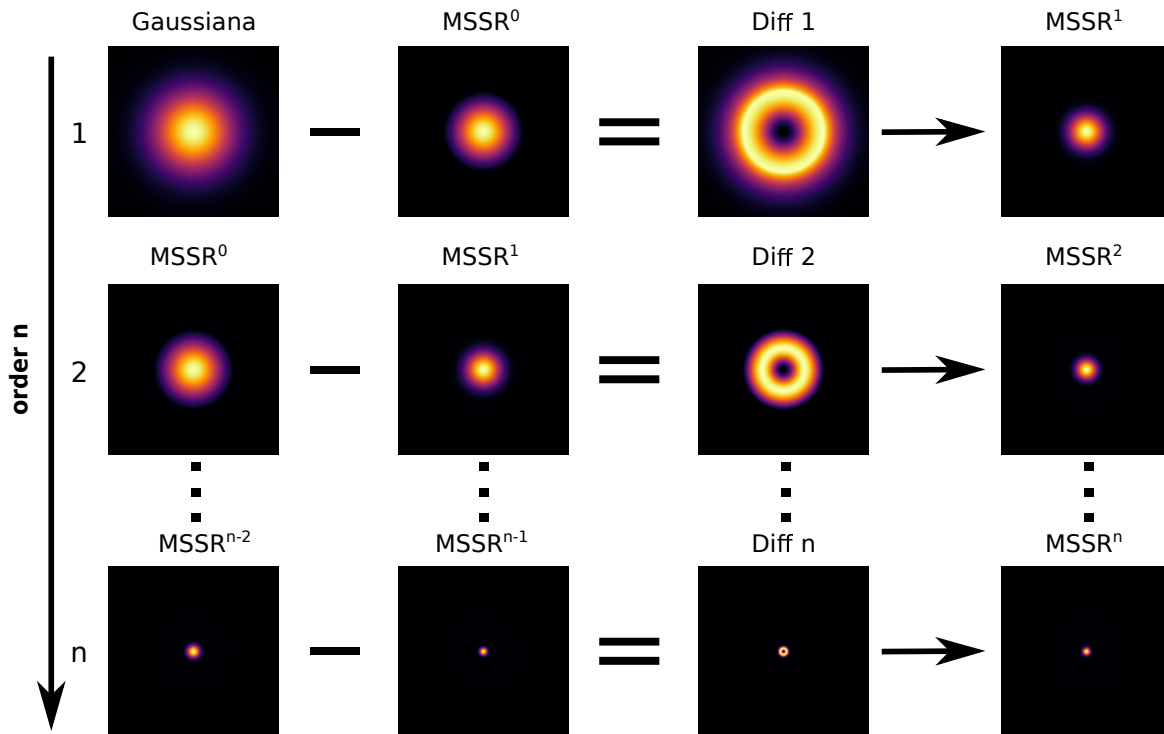


Figura 4.12: Representación del cálculo de $MSSR$ para órdenes superiores aplicado a un emisor simulado mediante una distribución gaussiana. La primera iteración de $MSSR$ ($MSSR^1$) se obtiene restando el $MSSR^0$ de la imagen original, lo que da como resultado una región similar a una dona centrada en la posición del emisor. El $MSSR^1$ se calcula después de aplicar determinadas transformaciones algebraicas (consultar la figura 4.11 para obtener una descripción más detallada de los pasos en el cálculo del proceso de $MSSR^n$). La segunda iteración abarca la resta de $MSSR^1$ de $MSSR^0$ y las mismas transformaciones algebraicas que se usaron para la generación de $MSSR^1$. El proceso se repite actualizando imágenes $MSSR$ consecutivas que generan imágenes $MSSR$ de órdenes superiores.

$MSSR$ puede distinguir dos emisores separados a 2σ , en este caso, los emisores satisfacen el criterio de Sparrow (emisores completamente no resueltos) donde el dip es el valor máximo de la distribución y no hay punto de ensilladura entre los emisores (figura 4.9a). Dado que la densidad alrededor del punto medio entre los emisores es muy alta, el valor de MS sería mayor que los pixeles pertenecientes a una vecindad centrada en este punto. Por esta razón, el $MSSR$ resultante presentaría un valle en el medio de la ubicación de los emisores. Midiendo el dip a diferentes órdenes

y distancias de emisores, se calculó que el límite de resolución teórica de $MSSR$ es 1.6σ de la PSF (figura 4.13). Se concluye que, dos emisores separados a una distancia mayor a 1.6σ , siempre se pueden distinguir usando el algoritmo $MSSR$ con solo el procesamiento de una imagen.

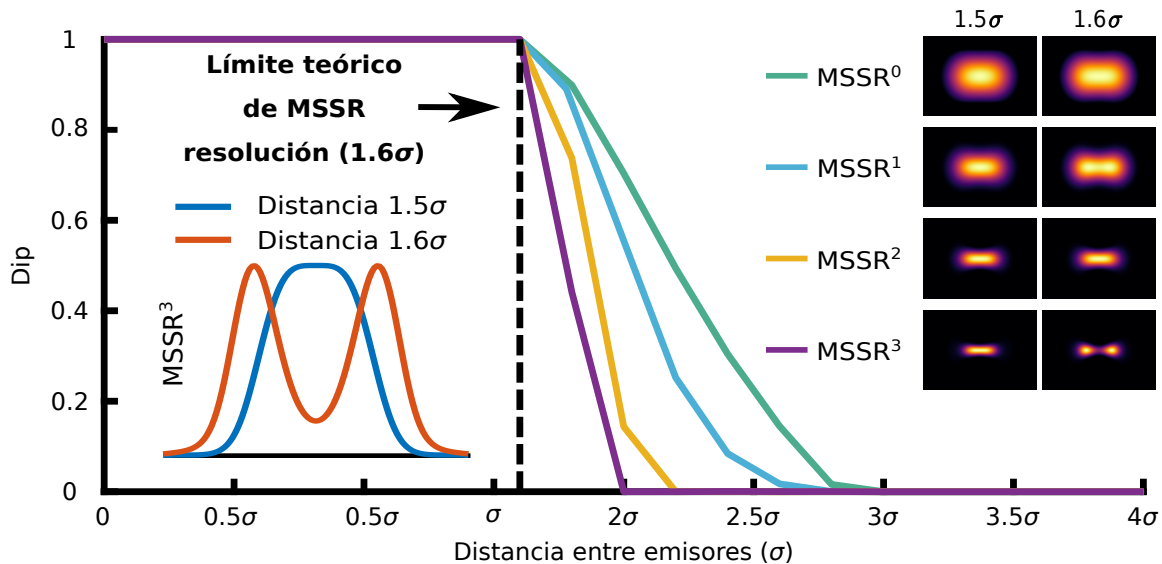


Figura 4.13: Límite teórico de resolución alcanzable por $MSSR^n$. Dip calculado para dos emisores gaussianos en función de la distancia entre los emisores (expresada como factor de la desviación estándar σ). Las líneas de colores representan la caída del orden $MSSR^n$, de 0 a 3, calculada a una distancia σ dada entre emisores. Las imágenes de la derecha son la representación bidimensional del procesamiento $MSSR^n$, para dos emisores individuales separados a distancias de 1.5σ y 1.6σ . Tenga en cuenta que, para 1.5σ , los emisores no están resueltos hasta el tercer orden de $MSSR$.

4.3.2. Análisis Temporal

Las consideraciones teóricas presentadas hasta las secciones anteriores, se aplican al aumento de resolución logrado a través del poder analítico de $MSSR$ sobre una sola imagen de fluorescencia. Se puede aplicar un análisis temporal, cuando se tiene una secuencia de imágenes LD, para obtener una mayor ganancia de resolución. El cálculo de $MSSR$ a una secuencia temporal de imágenes limitadas por difracción I de M cuadros recopilados en una escena estática o pseudoestática, genera una secuencia temporal de M imágenes de super-resolución, lo cual se denota por $MSSR(I)$. Este paso consiste en aplicar una función temporal por pixeles (PTF) a lo largo de toda la secuencia de imágenes $MSSR$, que se pueden aplicar para crear imágenes superresueltas con mayor resolución espacial y menor ruido del detector (figura 4.14).

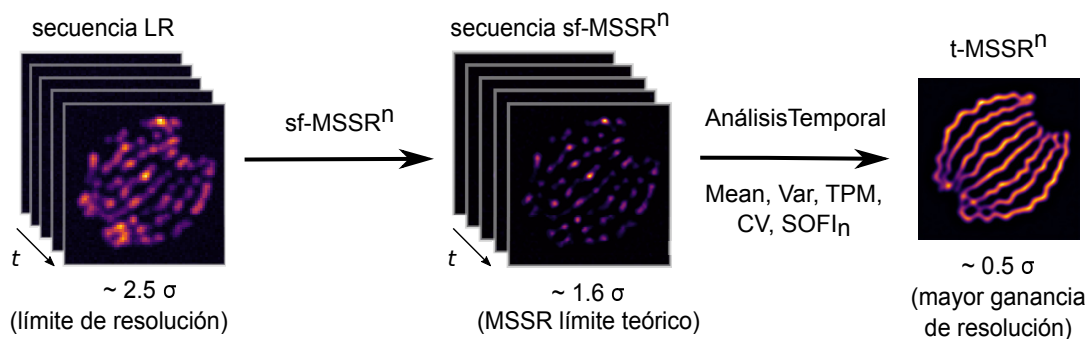


Figura 4.14: El análisis de un solo cuadro de $MSSR$ de un orden n dado se aplica a cada cuadro de una secuencia, convirtiéndose en una secuencia $sf - MSSR^n$. A continuación, una función temporal (PTF) convierte la secuencia de $MSSR$ en una única imagen $t - MSSR^n$ de super-resolución.

Cada PTF tiene una ventaja sobre las otras dependiendo de la dinámica de fluorescencia de la secuencia de imágenes a procesar. La selección de PTF depende de la característica de los emisores parpadeantes a lo largo de la secuencia (tabla 4.1). Por ejemplo, Var es útil para revelar detalles a nanoescala si existe una alta entropía temporal de píxeles, como los escenarios experimentales con altas fluctuaciones de fluorescencia. $Mean PTF$ es más adecuado para escenarios experimentales con baja dinámica temporal nanoscópica, o para escenarios con baja relación señal-ruido. Se recomienda utilizar la operación Var cuando la fluctuación de la señal es alta, es decir, cuando la señal proporcionada por los fluoróforos pasa fácilmente al estado triplete. Por otro lado, la operación $Mean$ funciona bien cuando la intensidad de la fluctuación es menor. TPM se puede utilizar en un escenario experimental intermedio de fluorescencia parpadeando entre Var y $Mean$. CV se caracteriza por tener en cuenta tanto el parpadeo de entropía como la intensidad de los emisores, esta última característica no se considera con Var . Finalmente, las funciones temporales de $SOFI$ se caracterizan por órdenes auto-acumulados de 2 a 4 [9], resolviendo las estructuras pero perdiendo continuidad en muestras de moléculas de baja densidad, por esta razón, se sugiere su uso en secuencias de imágenes con alta densidad de moléculas, especialmente para los órdenes $SOFI_3$ y $SOFI_4$. Dependiendo de la entropía temporal del conjunto de datos y del PTF utilizado, se puede lograr una mejora de la resolución de aproximadamente 0.5σ .

Para distinguir el procesamiento de imágenes LD individuales del procesamiento temporal aplicado a la misma secuencia, se ha establecido la siguiente notación:

- $sf - MSSR^n$: análisis espacial de $MSSR$ de cuadros individuales,
- $t - MSSR^n$: análisis temporal de $MSSR$ de secuencia de cuadros,

donde sf y t son las iniciales de *single frame* y *temporal* respectivamente.

| <i>PTF</i> | Nombre | Fórmula | Uso Recomendado |
|-------------------------|--------------------------|--|----------------------------------|
| <i>Mean</i> | Promedio | $\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M x_i = \bar{x}$ | Poco parpadeo de fluoróforos |
| <i>TPM</i> | Producto Medio Temporal | $\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M (x_i x_j)^2$ | Parpadeo moderado de fluoróforos |
| <i>Var</i> | Varianza | $\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M (x_i - \bar{x})^2$ | Gran parpadeo de fluoróforos |
| <i>CV</i> | Coficiente de Variación | $Var/Mean$ | Gran parpadeo de fluoróforos |
| <i>SOFI₂</i> | Acumulado de orden 2 [9] | $\langle \delta x_i \cdot \delta x_{i+1} \rangle$ | Gran parpadeo de fluoróforos |
| <i>SOFI₃</i> | Acumulado de orden 3 [9] | $\langle \delta x_i \cdot \delta x_{i+1} \cdot \delta x_{i+2} \rangle$ | Gran parpadeo de fluoróforos |
| <i>SOFI₄</i> | Acumulado de orden 4 [9] | $\langle \delta x_i \cdot \delta x_{i+1} \cdot \delta x_{i+2} \cdot \delta x_{i+3} \rangle$ $- \langle \delta x_i \cdot \delta x_{i+1} \rangle \langle \delta x_{i+2} \cdot \delta x_{i+3} \rangle$ $- \langle \delta x_i \cdot \delta x_{i+2} \rangle \langle \delta x_{i+1} \cdot \delta x_{i+3} \rangle$ $- \langle \delta x_i \cdot \delta x_{i+3} \rangle \langle \delta x_{i+1} \cdot \delta x_{i+2} \rangle$ | Gran parpadeo de fluoróforos |

M : número de cuadros de $MSSR(\mathbf{I})$,

x_k : imagen $MSSR$ en el cuadro k ,

$\langle \dots \rangle$: promedio a lo largo del tiempo,

$\delta x_k = x_k - \langle x \rangle$: intervalo de fluctuación para k cuadros.

Tabla 4.1: Funciones temporales de $MSSR$ y sus usos recomendados.

Capítulo 5

Resultados Experimentales

En el presente capítulo se presentan los resultados del algoritmo propuesto aplicado a una gran gama de experimentos de microscopía de fluorescencia. En los cuales, además se demuestra que *MSSR* va más allá de la microscopía de super-resolución.

5.1. MSSR y el procesamiento de una sola de imagen

5.1.1. MSSR supera el límite de difracción de la luz

La teoría indica que *MSSR* puede resaltar detalles nanoscópicos dentro de una sola imagen de fluorescencia. Para probar empíricamente esta hipótesis, una nanoregla comercial (GATTA-SIM140B, fluoróforo Alexa Fluor 488, figura 5.1 columna 1) fue resuelta mediante microscopía *SIM* y *MSSR* utilizando el procesamiento de un solo cuadro. Tanto *SIM* como *MSSR* generan imágenes nanoscópicas de las reglas GATTA-SIM140B con fluoróforos separados a 140 nm (figura 5.1 - columnas 2-5). Este resultado confirma que *MSSR* puede proporcionar empíricamente un aumento de resolución cerca del límite teórico esperado para un análisis de un solo cuadro.

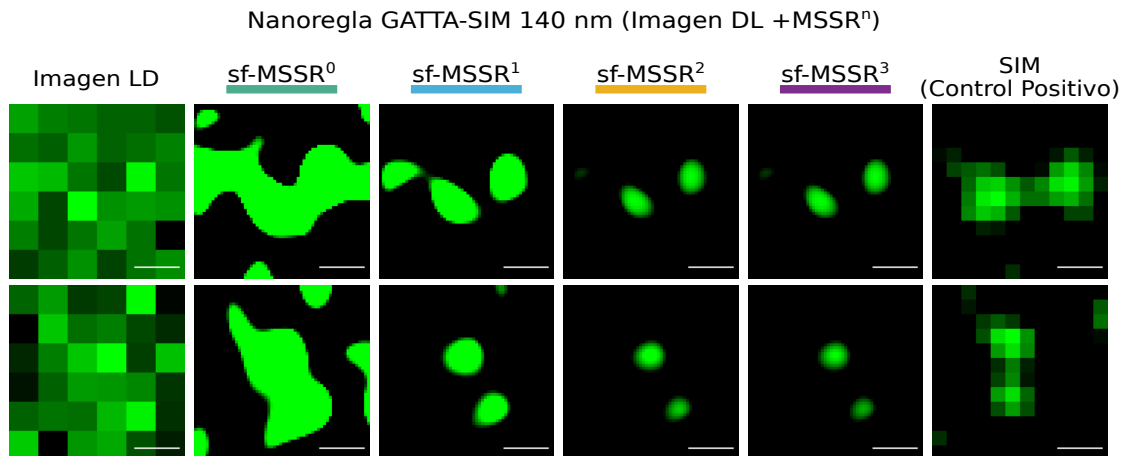


Figura 5.1: Demostración experimental del aumento de resolución alcanzable con MSSR de órdenes superiores, utilizando el sistema nanoruler GATTA-SIM 140B. La distribución de dispersión de los emisores se reduce en las regiones cercanas a sus centros, a medida que aumenta el orden de $MSSR$. Dos emisores cercanos ubicados a 140 nm de distancia, son resueltos usando $MSSR^1$, $MSSR^2$ y $MSSR^3$ (lado derecho). Las imágenes SIM recopiladas de la misma escena se muestran como un control positivo. Barra de escala: 100 nm.

5.1.2. MSSR aumenta aún más la resolución de imágenes ya procesadas por otros algoritmos MSR

$MSSR$ es compatible con otros métodos SRM y puede mejorar la calidad y el detalle nanoscópico de cualquier imagen de super-resolución. Esto se debe a la propiedad de $MSSR$ de operar con una sola imagen.

La compatibilidad de MSSR con ESI, SRRF y MUSICAL se evaluó mediante el análisis de una secuencia de 500 imágenes de microtúbulos marcados con tubulina con alta densidad de fluoróforos, previamente utilizados para probar y comparar una variedad de algoritmos SRM ¹ [12, 39]. La figura 5.2 muestra ejemplos de un aumento evidente en el contraste y la resolución proporcionados por $MSSR^0$ después de preprocesar el conjunto de datos con ESI, SRRF o MUSICAL. En el panel a) de la figura, se muestra la imagen promedio de la secuencia empleada, en el panel inferior b) se presentan los resultados de cada algoritmo y al lado su correspondiente resultado con $MSSR^0$. La selección de $MSSR^0$ se adapta de acuerdo con la relación señal-ruido (SNR) del conjunto de datos; una SNR más alta permite el uso de órdenes superiores de $MSSR$. En cualquier escenario probado, $MSSR^0$ aumentó aún más la capacidad de resolver las estructuras tubulares después de un análisis temporal con

¹Tubulin 2D High Density: secuencia de imágenes proporcionada en el sitio <http://bigwww.epfl.ch/smlm/challenge2013/>

los otros enfoques analíticos SRM (recuadros ampliados en la figura 5.2).

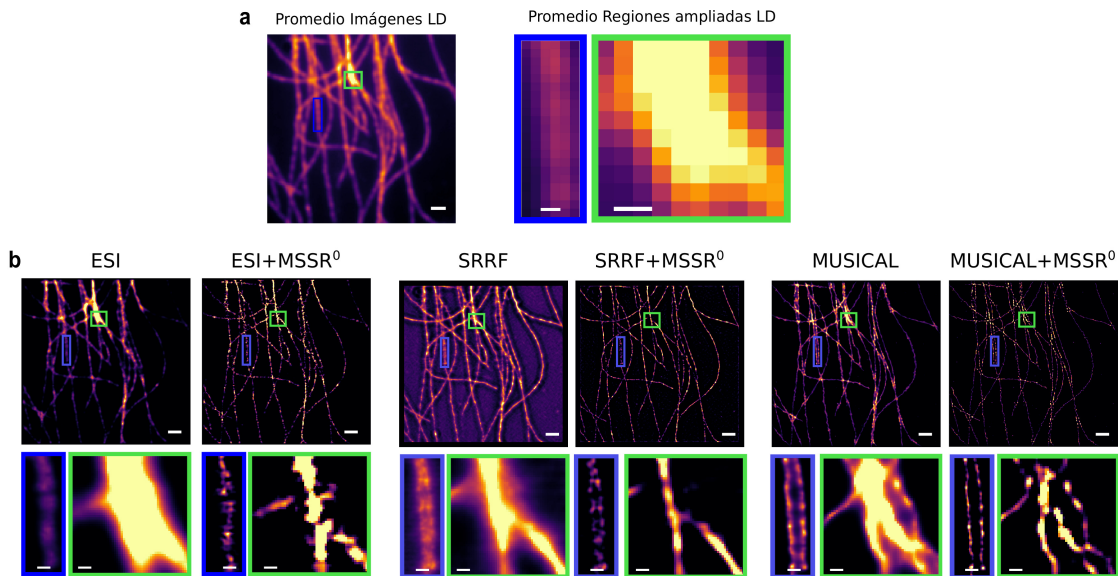


Figura 5.2: *MSSR* aplicado a imágenes de superresolución mejora su resolución. a) Proyección promedio de la secuencia limitada por difracción (DL-AVG), con las respectivas regiones ampliadas enmarcadas con rectángulos azul y verde. b) Comparación de los resultados de *ESI*, *SRRF* and *MUSICAL* solo y después del procesamiento con *MSSR*⁰ (*ESI + MSSR*⁰, *SRRF + MSSR*⁰, *MUSICAL + MSSR*⁰), a una secuencia *DL* de 500 cuadros (imágenes microtúbulos de tubulina). Las respectivas regiones enmarcadas por los rectángulos se muestran en la fila de abajo. Barras de escala: 1 μm para panel a) y primera fila panel b), 200nm para segunda fila panel b) correspondiente a las regiones ampliadas.

Se presenta otro caso en la figura 5.3a, donde se realizó un análisis temporal con *MUSICAL*. Fue empleada una secuencia de imágenes con emisores que parpadean aleatoriamente colocados a lo largo de una estructura tubular sintética², el resultado de este análisis temporal fue procesado con *MSSR*⁰. Se compararon los resultados antes y después del procesamiento con *MSSR*⁰. En ambas reconstrucciones, se examinaron tres regiones para evaluar la ganancia en resolución, mostrada como gráficos de perfil en términos de la distancia entre los picos de distribución de intensidad normalizada. Como se muestra en los perfiles de línea en la figura 5.3b, *MSSR* resolvió, además, los bordes de las estructuras sintéticas en la imagen con resolución *MUSICAL* sin cambiar la posición de los picos de distribución. Esto confirma que *MSSR* mejora la definición del objeto y proporciona más detalles nanoscópicos sin introducir artefactos de imágenes previamente superresueltas.

²Bundled Tubes High Density secuencia de imágenes proporcionada en el sitio <http://bigwww.epfl.ch/smlm/challenge2013/>

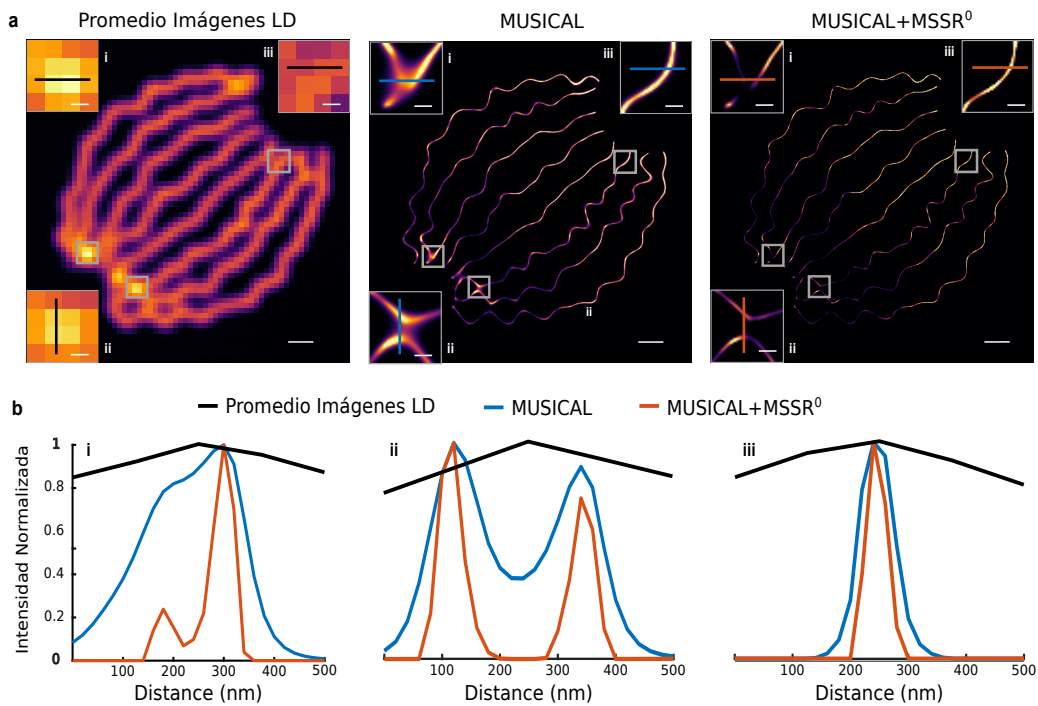


Figura 5.3: Comparación del aumento en la resolución espacial de MUSICAL con y sin posprocesamiento con $MSSR^0$ ($MUSICAL + MSSR^0$), sobre una secuencia de 361 imágenes limitadas por difracción de fluoróforos simulados, unidos a una matriz sintética de nanotúbulos (proyección promedio que se muestra a la izquierda). b) Los gráficos muestran los perfiles de intensidad a lo largo de las líneas representadas en cada uno de los recuadros de las imágenes de la fila superior; los trazos negros, azules y rojos corresponden a las imágenes DL-AVG, $MUSICAL$ y $MUSICAL + MSSR^0$, respectivamente. Barras de escala: 500nm, regiones ampliadas = 100nm.

Como $MSSR$ no se limita a la preparación física o química de la muestra, sino a la entropía local de la imagen, $MSSR$ fue aplicado a una imagen SIM superresuelta de cromátidas hermanas de cromosomas de ratón. La figura 5.4 muestra un aumento tanto del contraste como de la resolución de la imagen, observado después de procesar imágenes SIM con $MSSR^0$, que también se beneficia del sobremuestreo digital introducido por $MSSR$.

Cada uno de los métodos de SRM presentados en las figuras 5.2-5.4 opera de manera diferente y se desempeña mejor que otros bajo ciertas condiciones experimentales; se puede optar por utilizar cualquiera de ellos en función de la infraestructura disponible, la configuración óptica y las condiciones biológicas o experimentales que mejor se adapten a los objetivos de investigación específicas para el usuario. Una vez que se ha realizado cualquier análisis temporal (o se ha adquirido una imagen de MSR), se recomienda el posprocesamiento de $MSSR$ para una mejora adicional de la resolución de hasta 1,6 veces.

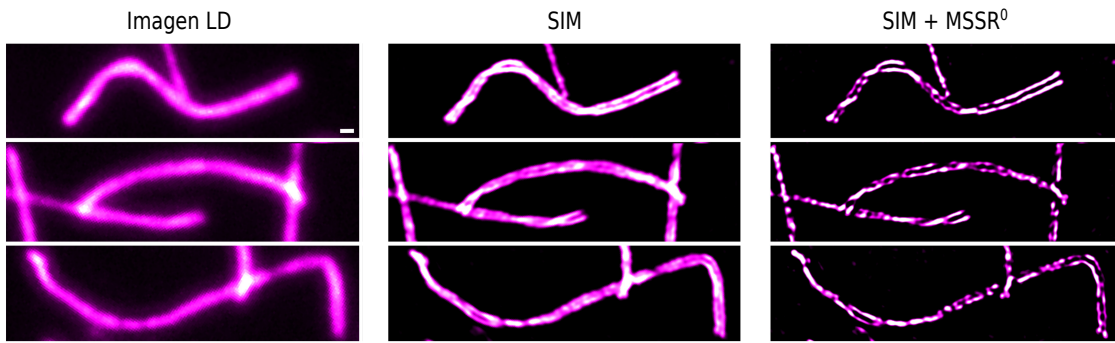


Figura 5.4: Cromátidas hermanas de cromosomas mitóticos de ratón visualizados por TIRFM (izquierda), SIM (centro) y SIM + MSSR0 (derecha). Barra de escala: 200 nm.

5.2. Resultado de MSSR con análisis temporal

Para abordar el desempeño de MSSR mediante un análisis de *PTF*, se diseñó un sistema de nanoreglas CRISPR-Cas, que consta de un ADN de doble hebra (*dsDNA*, doble strain DNA, por sus siglas en inglés) de 1.537 pb (pares de bases) con cuatro sitios de unión para dCas12a distribuidos uniformemente cada 297 pb (≈ 100 nm) sobre el dsDNA cadena (figura 5.5a). Para validar el sistema, primero se obtuvieron imágenes del complejo proteína-ADN a través de microscopía de fuerza atómica (AFM) y se midió la distancia entre cada complejo dCas12a (figura 5.6b). A continuación, se obtuvieron imágenes de las nanoreglas mediante microscopía de fluorescencia de reflexión total interna (TIRFM), con el objetivo de resolver los emisores fluorescentes cercanos ubicados a 100 nm entre sí.

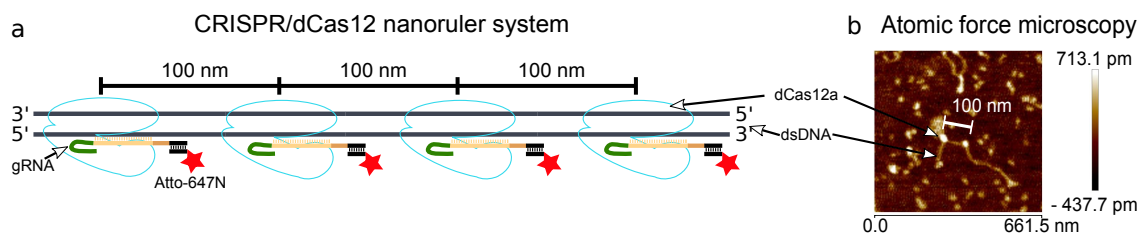


Figura 5.5: Sistema de nanoreglas *CRISPR/Cas*, que consiste en un ADN de doble hebra de 1537 pb (*dsDNA*) con cuatro sitios de unión para *dCas12a*, separados regularmente en longitudes de 297 pb (100 nm) sobre la cadena *dsDNA*. a) Representación gráfica del sistema de nanoreglas *CRISPR – PAINT*. b) Nanoreglas *CRISPR – PAINT* visualizadas por microscopía de fuerza atómica.

La figura 5.6a muestra que con el análisis *sf – MSSR*³ de una sola imagen no es suficiente para resolver nanoreglas con *MSSR*. Esta conclusión se llega a que las estructuras más pequeñas en las resultantes imágenes analizadas tienen dimensiones en el rango de 150 a 200 nm (las nanoreglas están ubicadas a 100

nm aproximadamente). Sin embargo, los análisis con funciones temporales confirman que $t - MSSR^3$ puede resolver con éxito las distancias nanoscópicas diseñadas en el sistema de nanoreglas CRISPR-Cas, por debajo del límite teórico de 1.6σ proporcionado por $sf - MSSR^3$, lo cual se puede observar en la figura 5.6b. Para determinar la distancia entre dos dCas12a a lo largo de la cadena de ADN, se obtuvo la distribución de distancias euclidianas entre los sitios de unión de dCas12a utilizando un modelo de cadena de gusano [40]. La figura 5.6c muestra que las distancias resueltas por $t - MSSR^3 Var$ en el nanoruler CRISPR-PAINT fueron 85 ± 14 nm, 152 ± 21 nm, 232 ± 37 nm, respectivamente.

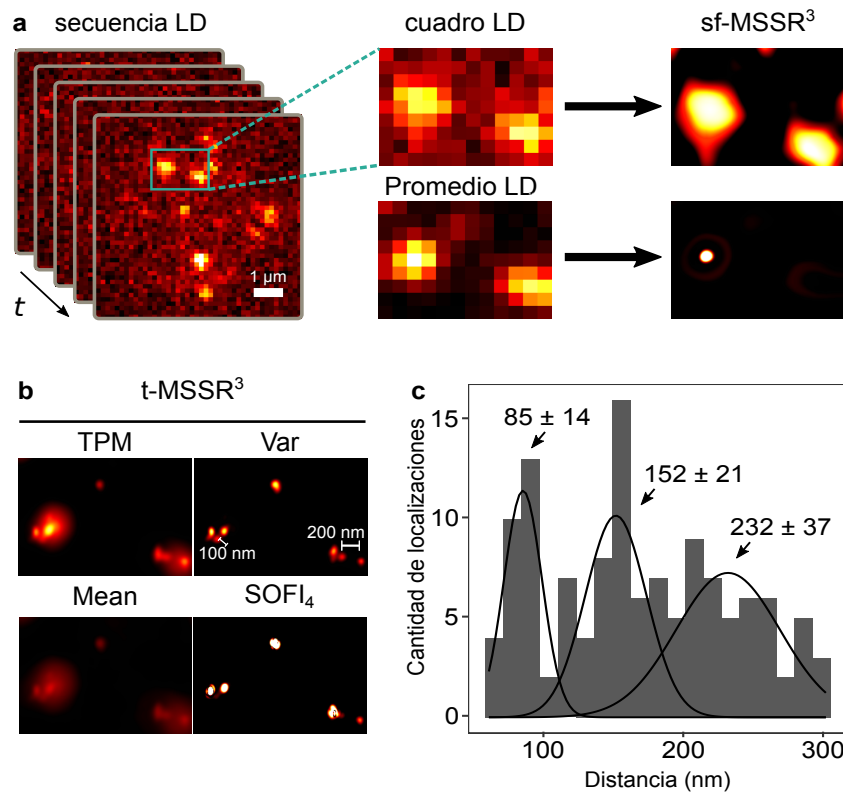


Figura 5.6: El análisis temporal de $MSSR$ proporciona un aumento adicional en la resolución hasta aproximadamente 40 nm. a) Izquierda: secuencia de imágenes LD de un sistema nanoruler CRISPR-PAINT. Derecha: región ampliada del primer cuadro de la secuencia, junto con la proyección media (Promedio LD) de una pila de 100 imágenes, antes y después del procesamiento de $MSSR$. b) Varias PTF aplicadas a la secuencia de imágenes $MSSR^3$ ($t-MSSR^3$). Los emisores fluorescentes están ubicados a 100 nm entre sí, según lo establecido por el sistema nanoruler CRISPR-PAINT. Se calcularon cuatro tipos de PTF : TPM , Var , $Mean$ y $SOFI_4$. c) Distancias euclidianas entre emisores cercanos calculadas automáticamente a partir de imágenes $t - MSSR^3 Var$, siguiendo un modelo de cadena de gusano (se utilizan 16 regiones de interés, $1.5 \mu m^2$ cada una).

Finalmente, para evaluar el límite de resolución alcanzable por $t - MSSR^n$, se desafió al algoritmo para resolver un sistema nanoruler GATTA-PAINT disponible comercialmente (PAINT 40G, PAINT 40RY). La dinámica de parpadeo, basada en la tecnología DNA-PAINT [41], está diseñada para abordar la capacidad de resolución de los métodos de *SRM* para resolver los sitios fluorescentes cercanos espaciados a 40 u 80 nm cada uno (GATTAquant). Los datos presentados en la figura 5.7a demuestran que el análisis $t - MSSR^3$ de 100 imágenes resolvió distancias nanoscópicas en el rango de 30-80 nm, validando un límite de resolución espacial experimental más bajo de aproximadamente 0.5σ (≈ 40 nm) que depende de la longitud de onda de emisión del fluoróforo (figura 4.10). Curiosamente, mientras que $t - MSSR^3$ podría resolver los emisores fluorescentes ubicados a 40 nm de distancia, SRRF, ESI y MUSICAL fallaron, lo cual es consistente con los límites de resolución establecidos de aquellos métodos que caen dentro del rango de 50-70 nm (figura 5.7b) [10–12].

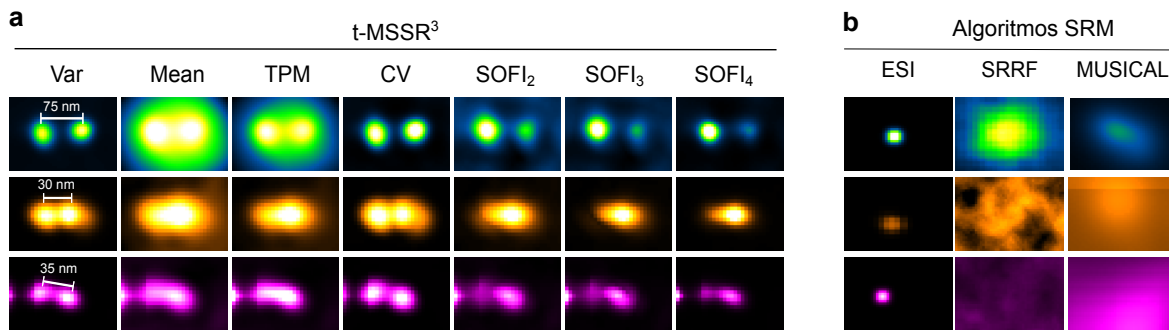


Figura 5.7: Comparación de resultados de *MSSR* de nanoreglas de 40 nm con otros algoritmos de superresolución. a) Comparación de los resultados obtenidos con cada uno de los análisis de PTF disponibles con *MSSR* (ver tabla S3), para un sistema nanoruler GATTA-PAINT disponible comercialmente. La columna *Var* muestra distancias entre emisores resueltas en el rango de 30 a 75 nm. Por filas, se utilizaron sondas fluorescentes Atto 488 (verde), Atto 550 (naranja) y Atto 655 (magenta). b) Las mismas nanoreglas mostradas en a) pero analizadas con ESI, SRRF o MUSICAL.

En conclusión, *MSSR* es una técnica de nanoscopía de fluorescencia que proporciona detalles nanoscópicos mediante el análisis de una única imagen de fluorescencia.

5.3. Resolución nanoscópica dependiente de ruido

MSSR funciona sin la necesidad de un análisis temporal, sin embargo, obtiene una mayor resolución si se realiza este paso analítico. Esta característica sorprendente

hace que *MSSR* sea único, sin embargo, el potencial de introducir artefactos debe abordarse, compararse y cuantificarse con otros algoritmos similares.

El potencial de *MSSR* para introducir artefactos relacionados con el ruido se evaluó sobre *PSFcheck* [42], una matriz de patrones nanoscópicos fluorescentes espaciados de forma regular y generados por litografía láser [43, 44]. El análisis *SRM* espacio-temporal de patrones litográficos en forma de anillo de *PSFcheck* reveló que *MSSR* introduce cualitativa y cuantitativamente menos artefactos que enfoques similares (figura 5.8). Estos artefactos, observados como estructuras nanoscópicas amorfas alrededor de la forma del anillo fluorescente o dentro de él, se encontraron comúnmente en las reconstrucciones proporcionadas por otras técnicas analíticas (nota complementaria 9, fig. S21-23), pero estaban ausentes en las imágenes de *MSSR*. Sorprendentemente, con cualquier *SNR* probado, *sf - MSSR*¹ con función temporal *TPM* proporcionó reconstrucciones de *SRM* confiables de calidad comparable a los enfoques que requieren un análisis temporal.

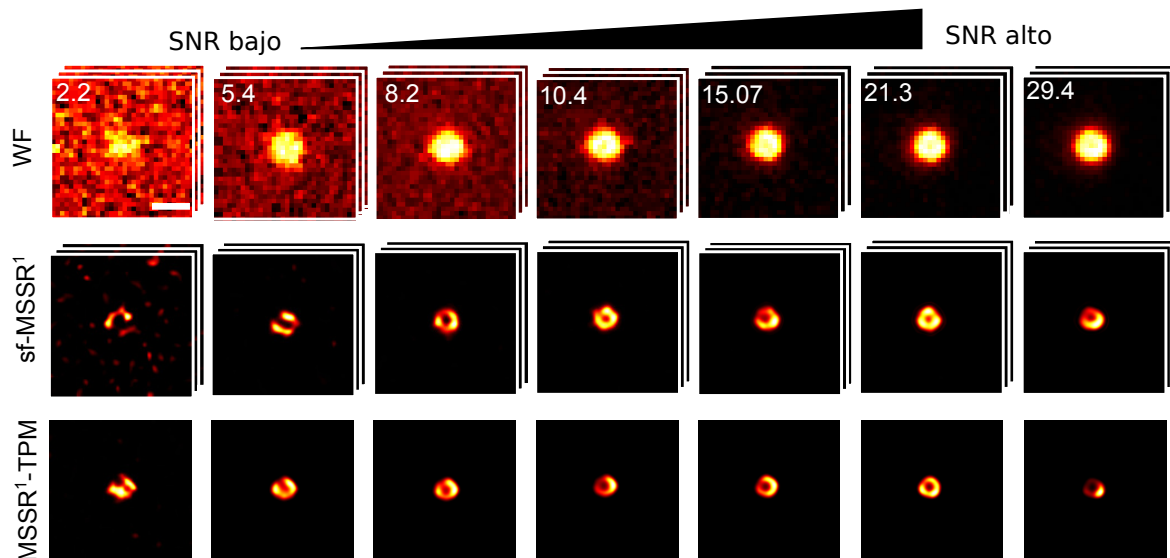


Figura 5.8: *sf - MSSR*¹ y *t - MSSR*¹ - *TPM* de 100 imágenes proporcionan una reconstrucción consistente en una amplia gama de *SNR*. La estructura esperada es un anillo fluorescente uniforme, ubicado en el centro de la imagen con un fondo oscuro sin fluorescencia. En la primera fila (imágenes *LD*, microscopía de campo amplio (WF, WideField, por sus siglas en inglés)), se muestran cuadros de la secuencia de 100 imágenes en la correspondiente relación de *SNR*. La segunda fila representa el resultado de *sf - MSSR*¹ la secuencia de imágenes de la primera fila. La tercera fila es la imagen de *MSSR* espacio-temporal correspondiente al análisis realizado a 100 imágenes con *TPM* (*t - MSSR*¹ *TPM*).

Además, se investigó el rendimiento de *MSSR* para lograr una reconstrucción satisfactoria mediante la variación del número de imágenes de entrada, utilizando un esquema de análisis temporal. Con secuencias de imágenes de altos valores

$SNR (> 2dB)$, RSP alcanza valores cercanos al máximo y RSE valores cercanos al mínimo cuando se procesa un solo cuadro. Además, cuando se calcula $MSSR$ usando datos de entrada de SNR bajos ($< 2dB$) se requiere un análisis temporal, ya que los valores de RSP y RSE se estabilizan cuando se emplea una secuencia de tan solo 20 imágenes (figura 5.9).

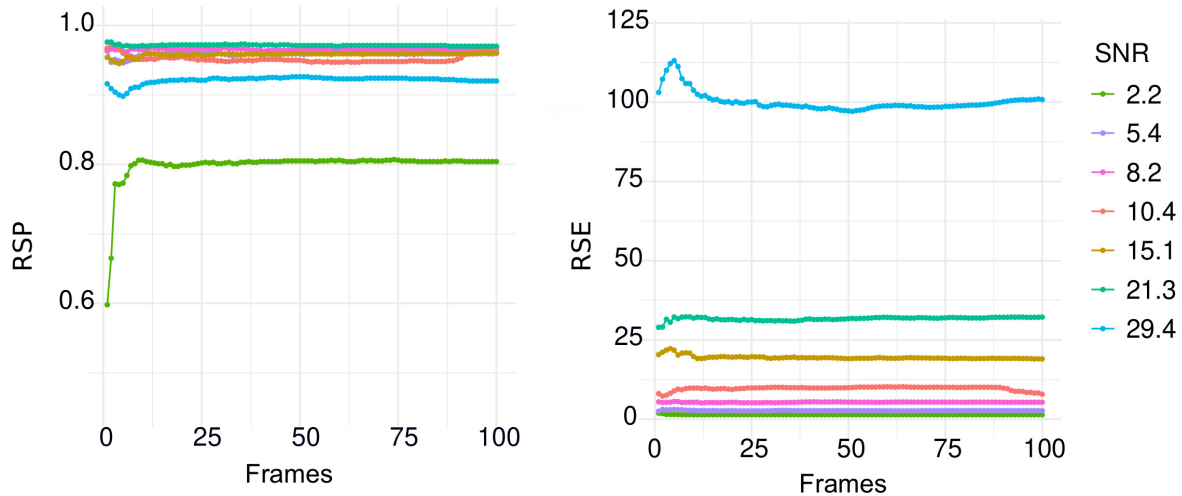


Figura 5.9: Dependencia de RSP y RSE respecto a las magnitudes: cantidad de cuadros utilizados en el análisis temporal y SNR . Los índices globales de resolución RSP (izquierda) y RSE (derecha) se estabilizan para un número reducido de fotografías (aproximadamente 25) por un valor de SNR bajo. Cuando SNR es mayor que 8, estos índices globales tienden a estabilizarse usando solo 5 cuadros.

Tanto ESI , $MUSICAL$ y $MSSR$ proporcionan reconstrucciones nanoscópicas de alto contraste, independientemente del análisis de imágenes de entrada con rendimientos de fotones bajos o altos, cubriendo una amplia gama de valores de SNR . Sorprendentemente, $MSSR$ y $SRRF$ proporcionan una reconstrucción de la escena de MSR que era más similar a los patrones litográficos esperados, mostrando estructuras “en forma de anillo” más regulares que se asemejan a las imágenes de SIM [42]. $MUSICAL$ y ESI también revelaron anillos de sub-difracción pero con una forma irregular o incompleta (resultado inesperado) (figura 5.10).

Como era de esperar, cuando la probabilidad de emisión de fotones es lo suficientemente alta como para dar como resultado altos valores de SNR , todos los algoritmos funcionan de manera similar en calidad (figura 5.11a) pero su error global difiere entre sí (figura 5.11b); no obstante, la capacidad de resolver estructuras nanométricas con una SNR baja es superior con $MSSR$ que con $SRRF$ considerando su RSP alta, RSE baja y reconstrucción visual. Curiosamente, $SRRF$ es el único método que depende en gran medida de la SNR de las imágenes (figura 5.11a, línea roja) y reporta un error más alto que cualquier otro método (figura 5.11b, línea roja). Estos resultados muestran que $MSSR$ no es sensible al ruido y es un algoritmo de

MSR confiable para datos de baja *SNR*, debido a su capacidad para generar una reconstrucción de alto contraste, mientras recupera la forma esperada en forma de anillo de la muestra.

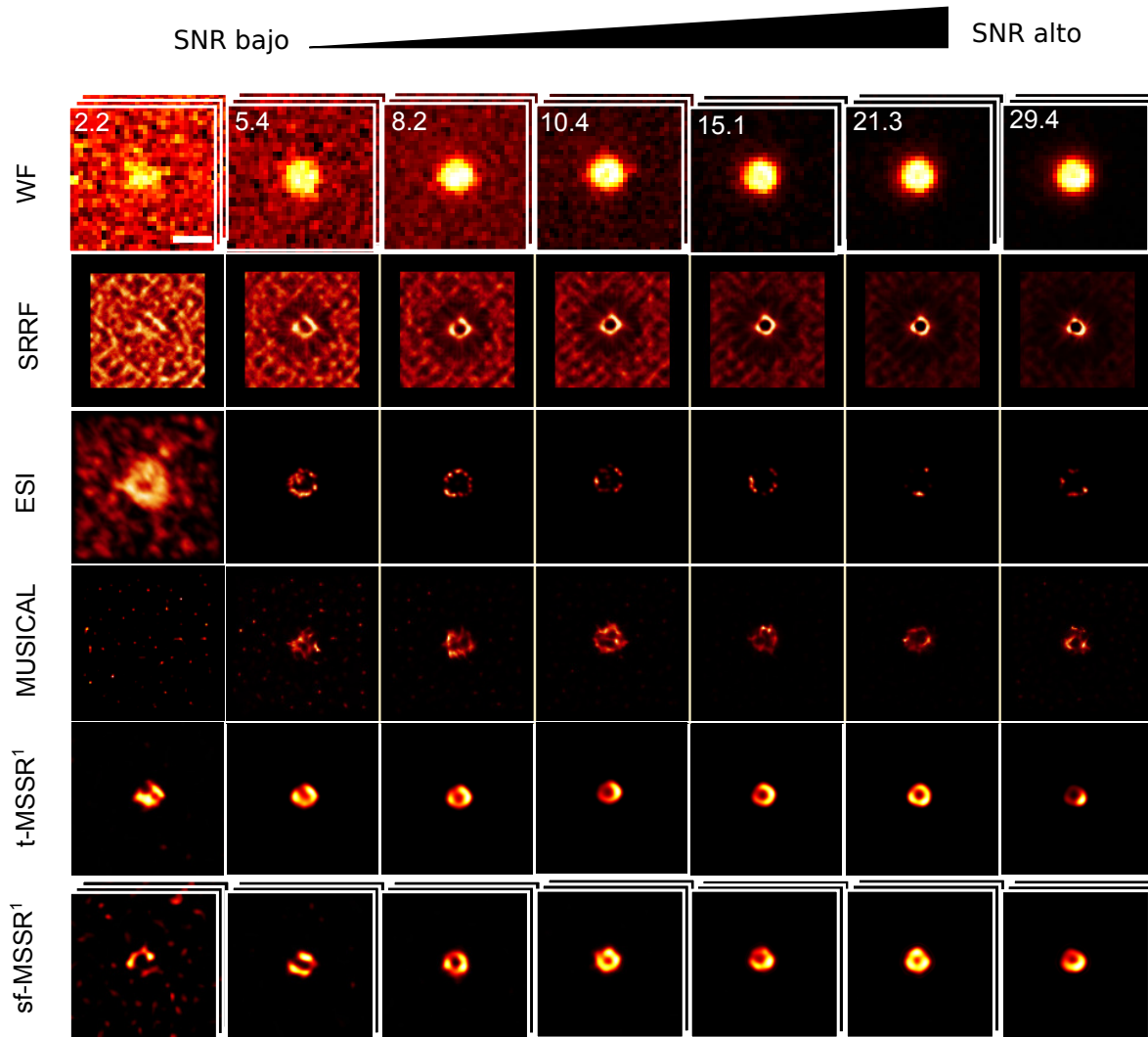


Figura 5.10: Comparación de imágenes MSR de la muestra de litografía láser generada por *SRRF*, *MUSICAL*, *ESI* y *MSSR*. La característica esperada es un anillo fluorescente uniforme ubicado en el centro de la imagen con un fondo oscuro sin fluorescencia. La fila de imágenes limitadas por difracción (*WF*), indica el promedio temporal de 100 cuadros calculados para tres pilas temporales con señal-ruido (*SNR*) distinta. Las siguientes 4 filas muestran las imágenes *SRM* correspondientes usando *SRRF*, *MUSICAL*, *ESI* and *MSSR*¹. También se indica el resultado de *MSSR* de un solo cuadro (*sf - MSSR*¹). Barra de escala: 1 μm .

Se observó otro resultado sorprendente durante el análisis espacial de *MSSR*,

donde se obtiene una secuencia de resolución mejorada. Este análisis espacial mostró que $sf - MSSR$ puede resolver la estructura subyacente sin introducir artefactos como los observados por SRRF en 100 imágenes (figura 5.10a, panel inferior). Observe que la forma del anillo fluorescente se desvía de su forma simétrica esperada, lo que podría reflejar la contribución de ruido alrededor de la señal de fluorescencia en cada imagen. Se planteó la hipótesis de que la necesidad de MSSR para incluir varios cuadros en el análisis temporal disminuye a medida que aumenta la SNR de los datos, hasta un punto en el que el MSSR de fotograma único podría revelar la estructura subyacente sin más análisis temporal.

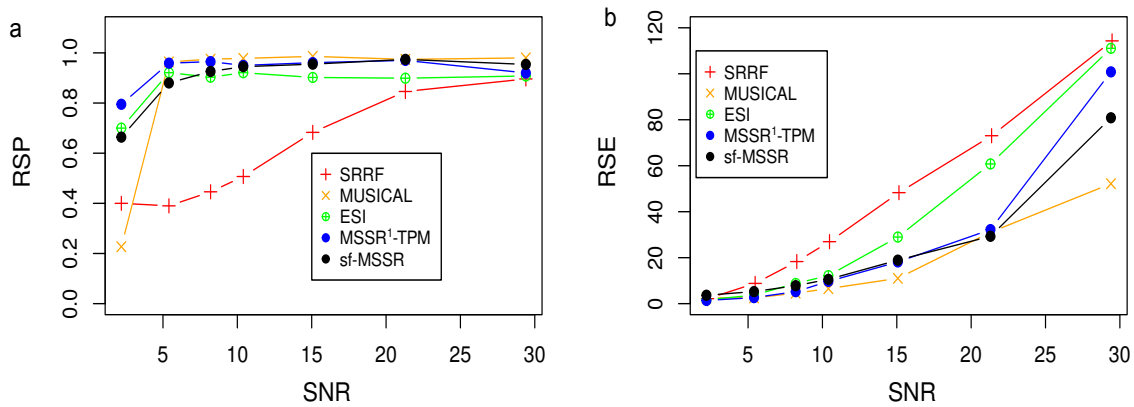


Figura 5.11: RSP y RSE calculados para las reconstrucciones de superresolución proporcionadas por otros tres procedimientos analíticos de SRM , $sf - MSSR^1$ y $MSSR^1 TPM$ (100 cuadros). a) RSP mide una correlación global entre la reconstrucción y la referencia, de modo que los valores más cercanos a 1 indican una reconstrucción confiable. c) RSE mide la diferencia absoluta de la imagen reconstruida y su referencia. Los valores más bajos de RSE en una SNR particular significan menos error global en la reconstrucción. Barra de escala: $1 \mu m$.

Estos resultados plantean la posibilidad de realizar microscopía de superresolución de células vivas de alta calidad, que solo está limitada por la resolución temporal de la cámara utilizada para la recopilación de imágenes (milisegundos o incluso microsegundos). Esto es posible debido a la capacidad de MSSR para trabajar con datos de SNR bajos, que es común en esta modalidad de microscopía.

5.4. Resolución nanoscópica con imágenes de fluorescencia

El uso generalizado de la microscopía de fluorescencia ha llevado al desarrollo de una gran variedad de protocolos de imagen y sistemas de adquisición. El principio de

MSSR se basa en el análisis de la información local de una sola imagen. Proporciona resolución nanoscópica mediante la resolución de un operador que incorpora información tanto de la distribución espacial de la fluorescencia (rango espacial que cubre la *PSF*) como del rango de intensidades locales (también conocido como nivel de valores de gris). Este menor requisito de información hace que *MSSR* sea adecuado para su uso en una amplia gama de aplicaciones de microscopía de fluorescencia.

Para ilustrar la versatilidad de *MSSR*, se probó el algoritmo para proporcionar información sobre la organización nanoscópica en sistemas biológicos, que han caracterizados previamente por otras técnicas de microscopía de superresolución. Los escenarios comunes de microscopía de fluorescencia se discuten después del procesamiento con *MSSR*, que incluyen, entre otros, imágenes de inmunofluorescencia de células fijas, microscopía de epifluorescencia (figura 5.12), imágenes de células vitales utilizando tintes permeables (figuras 5.13 y 5.14), microscopía de reflexión interna total (figuras 5.15 y 5.16) microscopía de seguimiento y colocación de partículas individuales (figura 5.17) e imágenes de células vivas de tejido usando microscopía confocal de barrido láser y microscopía de iluminación de plano selectiva (figuras 5.18 y 5.19).

5.4.1. Organización nanoscópica de maquinarias de replicación viral

La replicación viral está orquestada a escalas mesoscópicas dentro de maquinarias que perturban la arquitectura celular para asegurar la producción de progenie viral. El inicio del ensamblaje de rotavirus ocurre en los viroplasmos (*VPs*), que son coacervados proteicos formados por componentes virales y celulares que cuando se visualizan mediante microscopía electrónica se asemejan a estructuras electrodenas complejas [45].

La figura suplementaria 5.12 muestra imágenes TIRF limitadas por difracción de un rotavirus *VP*. La proteína NSP2, indicada por el color rojo, se seleccionó para asegurar la detección de *VP* en las células infectadas y sirvió como punto de referencia para comparar la distribución relativa de las otras distribuciones de proteínas virales dentro del *VP* con organización en capas concéntricas [46].

En marcado contraste con las observaciones realizadas a través de la inspección visual de las imágenes limitadas por difracción de *VP* (figura 5.12, fila superior), se demostró que las proteínas virales están en capas como anillos nanoscópicos concéntricos [46]. NSP5 y NSP2 actúan como elementos de andamio formadores de núcleos, que coexisten en las capas internas del *VP* junto con NSP4, seguidos por capas de VP1, VP2, VP6, VP4 y VP7 dispuestas de adentro hacia afuera. Estos hallazgos se lograron utilizando 3B-ODE SRM [8, 46] mediante el análisis de una secuencia de cientos de imágenes limitadas por difracción utilizando microscopía de

colocalización, imágenes TIRF y un grupo dedicado para computación en paralelo (con un tiempo medio de procesamiento de un día por micrografía de superresolución) [8, 46].

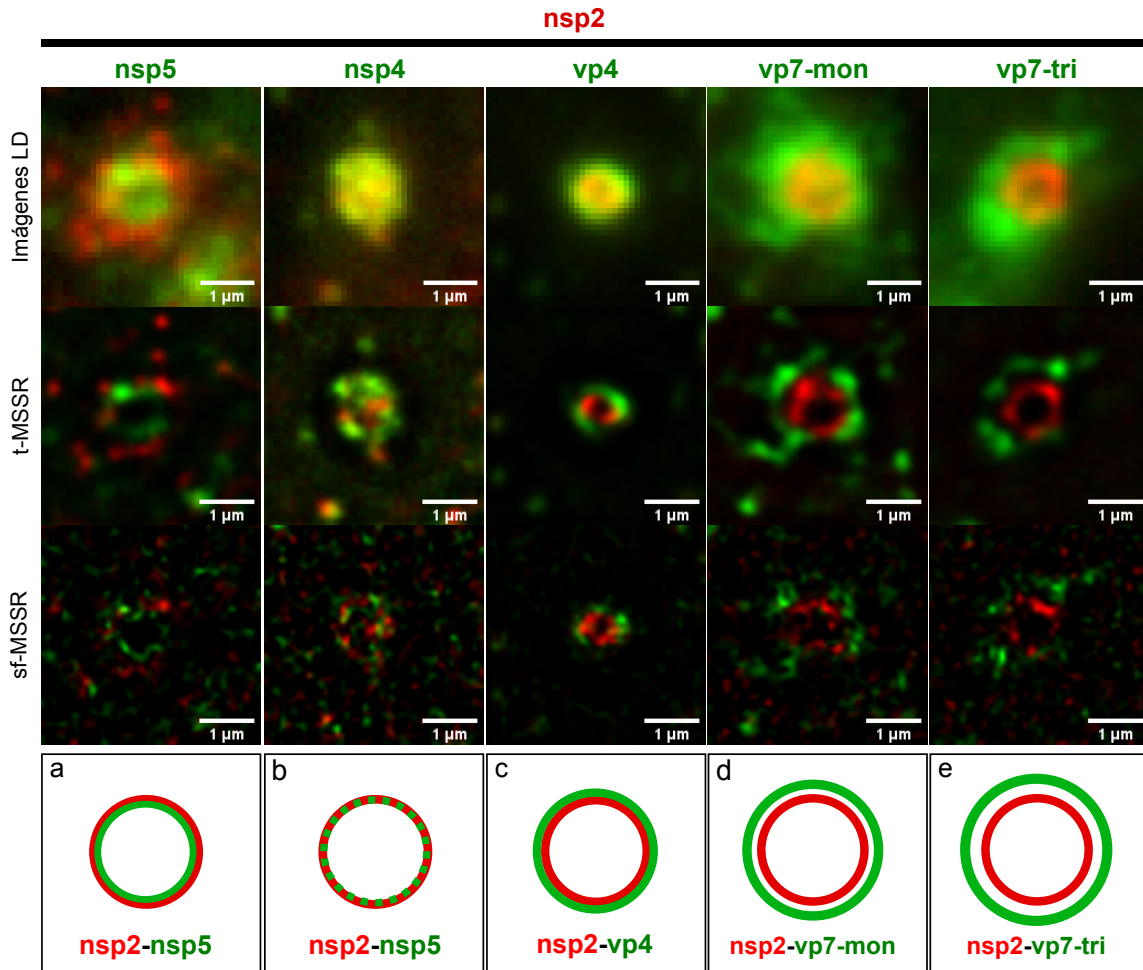


Figura 5.12: Distribución relativa de proteínas virales en viroplasm de rotavirus (VP) visualizados por análisis con *MSSR*. La proteína nsp2 se indica con color rojo para todos los paneles y se utiliza para la detección de VP en células infectadas y sirve como punto de referencia para comparar la distribución relativa en la VP de la distribución de otras proteínas virales. El título de las columnas representa la segunda proteína (indicada por el color verde) en el estudio de colocalización con nsp2, correspondiente a las proteínas nsp5, nsp4, vp4 y vp7 en su forma monomérica y trimérica (vp7-mon y vp7-tri, respectivamente) ordenados de izquierda a derecha. Filas de arriba hacia abajo: imágenes de difracción limitadas de los PV; *MSSR*, imágenes de superresolución reconstruidas por *MSSR* utilizando el análisis temporal de 100 imágenes con difracción limitada por VP; *sf-MSSR*, imágenes de superresolución reconstruidas por *MSSR* utilizando una única imagen limitada por difracción por VP. a-e) Diagramas del modelo propuesto para la distribución de proteínas virales.

Con *MSSR*, se pudo visualizar la organización nanoscópica del rotavirus VP en virtud del análisis de imágenes LD en cuestión de segundos utilizando una computadora de escritorio normal. Las proteínas virales dentro del medio VP mostraron una organización en capas, similar a la observada por Garcés en [46]. La figura complementaria 5.12 muestra las distribuciones de las proteínas virales NSP2, VP4, NSP5, NSP4 y VP7 en su forma monomérica y trimérica. Se encontró que el núcleo más interno de la VP estaba enriquecido por proteínas NSP2, NSP5 y NSP4, seguido de capas de VP4 en el medio y VP7 en su forma monomérica y trimérica en el lado más externo de la VP.

A modo de comparación con los resultados obtenidos en [46]. Utilizando 3B-ODE SRM, se procesaron las mismas imágenes de VPs con *sf - MSSR* y *t - MSSR* con un análisis temporal de píxeles de 100 imágenes limitadas por difracción. Aunque se subrayó el mismo patrón concéntrico de disposición de proteínas virales dentro de la VP utilizando ambos enfoques, se observaron diferencias estructurales, como el grosor y la continuidad de la capa. Esto se debe a que en *sf - MSSR* la imagen de salida solo representa la señal correspondiente al conjunto de fluoróforos emisores capturados en el intervalo de tiempo de adquisición de la imagen de entrada analizada, mientras que el análisis temporal por píxeles genera una reconstrucción promediada por conjuntos con resolución nanoscópica.

5.4.2. Imágenes de superresolución de células vivas

MSSR fue desafiado para obtener imágenes de superresolución de células vivas mediante el estudio de la reacción acrosomal (*RA*), un fenómeno secretor único que resulta de eventos de fusión entre la membrana plasmática y una vesícula especializada llamada acrosoma, ubicada en la cabeza del espermatozoide [47].

La dinámica nanoscópica de la *RA* se visualizó siguiendo la dinámica espacio-temporal de la SiR-actina, una sonda fluorescente que fluoresce preferentemente cuando se une a F-actina (verde), y FM4-64 que marca la membrana celular (magenta) (figura 5.13). De acuerdo con hallazgos previos [48], *MSSR* permite visualizar eventos complejos de reorganización en la membrana plasmática, en las membranas acrosómicas internas y externas, y en el citoesqueleto de actina cortical ubicado debajo de la vesícula acrosómica, como resultado de la *RA* (figura 5.13).

Se observaron varios eventos de fenestración en y dentro de las membranas plasmáticas y acrosómicas (figura 5.13 y películas s4 y s5), mostrando una compleja dinámica de milisegundos (películas s6 y s7). Al comienzo de la reacción acrosomal, la fluorescencia de FM4-64 se restringió a la membrana plasmática que era visible por encima del citoesqueleto de actina F (figura suplementaria 5.13 a, películas s5 y s6). Al final de *RA*, la membrana plasmática y la membrana acrosómica externa se pierden, exponiendo la membrana acrosómica interna, lo que proporciona nuevos

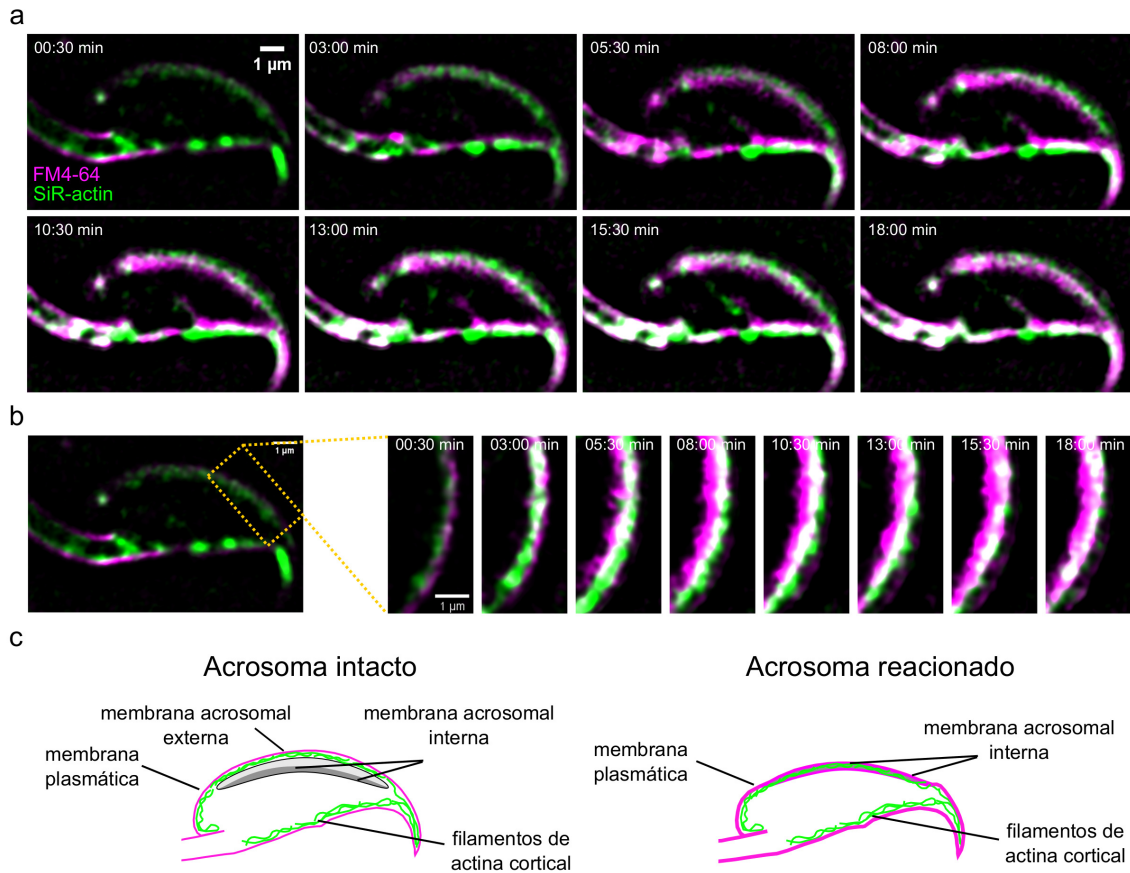


Figura 5.13: Análisis de *MSSR* de un solo cuadro para imágenes de espermatozoides de ratón para el estudio de la reacción acrosomal. a) Utilizando el análisis *MSSR* de fotograma único, es posible visualizar el curso de la exocitosis acrosómica espontánea. b) Mayor aumento de la membrana de los espermatozoides que experimenta eventos de fenestración. c) Esquemas de la exocitosis acrosómica. Al principio, solo se puede ver la membrana plasmática a través del tinte FM4-64 (izquierda). A medida que se desarrolla la exocitosis acrosómica, la membrana plasmática y la membrana acrosómica externa se pierden en el proceso. Como resultado, FM4-64 (presente en el medio de registro) ahora tiñe la membrana acrosómica interna (derecha).

sitios de unión para el FM4-64 (figura suplementaria.5.13 a, películas s5 y s7) [49]. Como consecuencia de eso, se registró un notorio aumento de la fluorescencia de FM4-64 cerca del citoesqueleto de actina cortical (figura 5.13 b y c).

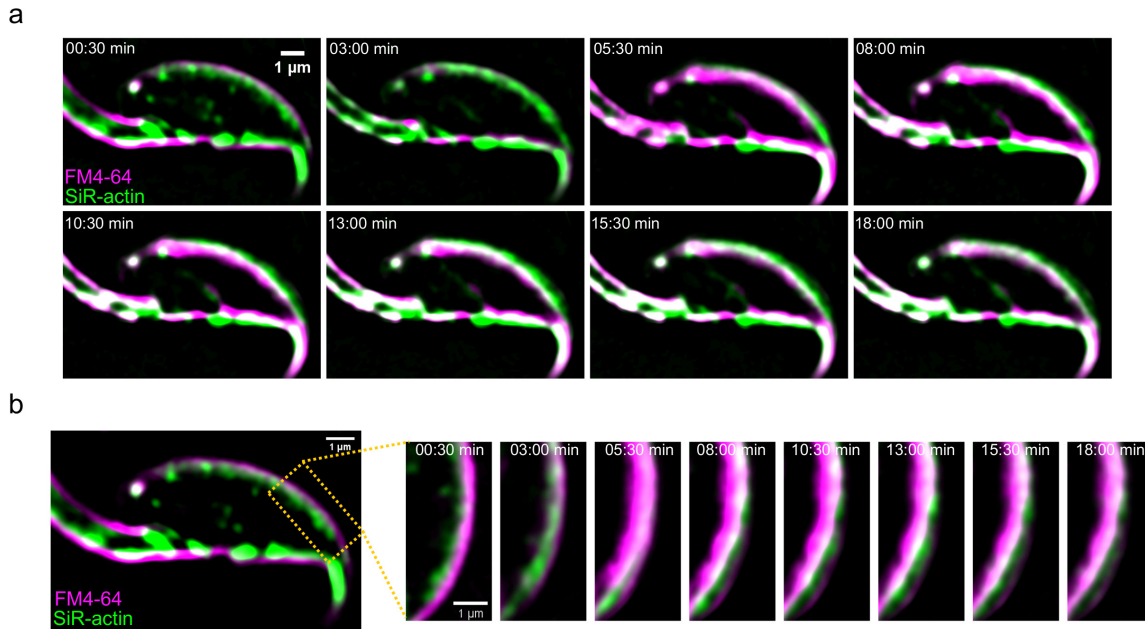


Figura 5.14: Análisis temporal de *MSSR* secuencia de para imágenes de espermatozoides de ratón para el estudio de la reacción acrosomal. a) Utilizando el análisis *MSSR* de 100 cuadros, es posible visualizar el curso de la exocitosis acrosómica espontánea. b) Mayor aumento de la fenestración de la membrana de los espermatozoides.

Si se comparan las imágenes SRM obtenidas por un solo cuadro con del análisis de 'pseudo' réplicas temporales recolectadas en la misma escena, como en [48], en general, las observaciones que surgen de ambos resultados son básicamente las mismas (comparar figura suplementaria 5.14 con figura 5.14; comparar las películas s4 y s5 con las películas s8 y s9). En cualquier caso, se puede observar el aumento de la fluorescencia de FM4-64, la dinámica de la actina F y los eventos de fenestración de la membrana. No obstante, la ventaja de utilizar un enfoque de análisis *sf-MSSR*, es que la obtención de imágenes de un cuadro implica mucha menos fotomanipulación, por lo que se reduce el daño de la muestra. Además, cuando se utiliza el análisis *sf-MSSR*, *MSSR* permite evaluar la dinámica de milisegundos de un proceso general que tarda minutos en ocurrir, información que se pierde cuando se requieren cientos de cuadros para derivar una única micrografía SRM (figura 5.14) [48].

5.4.3. SPT es mejorado por MSSR

En los últimos años, la obtención de imágenes de una molécula única junto con la microscopía de superresolución han contribuido a comprender cómo se produce el movimiento molecular a nivel de nanoescala. Aunque las técnicas de molécula única nos han permitido reconocer más detalles sobre la intrincada biología de la célula, como el movimiento de motores moleculares o la dinámica de difusión de lípidos en la membrana celular, todavía hay mucho que contribuir a la comprensión fundamental de esta variedad de fenómenos.

Junto con la gran diversidad de técnicas de una molécula, el seguimiento de partículas individuales (*SPT*) se ha aplicado con éxito a una variedad de sistemas diferentes que van desde el seguimiento del movimiento 2D de lípidos individuales en [50–52], bicapas lipídicas sintéticas hasta el movimiento de células con orgánulos y embriones 3D completos [53–55]. A pesar de eso, *SPT* es una modalidad de imagen que requiere características especiales de microscopía, que con su estudio ayuda a lograr una resolución temporal y espacial excepcional, proporcionando datos fieles del proceso biológico que se trata de describir. El éxito de *SPT* se basa en el cumplimiento de aspectos generales como detección (buena *SNR* y relación de fotogramas), localización (eficiencia cuántica, gran aumento, reconstrucción de subpíxeles, localización de molécula única) y vinculación de las trayectorias a lo largo de los cuadros de la secuencia analizada; en último término, el análisis de los datos resultantes puede proporcionar información del movimiento del conjunto de moléculas marcadas que se están estudiando en la actualidad.

En la gran mayoría de las aplicaciones de imágenes de células vitales, el seguimiento de partículas individuales exigen tiempos de exposición cortos y poca exposición a la luz para capturar y restaurar el movimiento significativo de las partículas y evitar la fototoxicidad celular. Además, cada molécula fluorescente tiene capacidades limitadas para producir fotones. Cuando la cámara recibe y digitaliza la señal de un solo fluoróforo, los fotones llegan a posiciones aleatorias dadas por la distribución definida de la *PSF*. Por lo tanto, el límite de precisión viene dado por el teorema del límite central como σ/\sqrt{N} donde N es el número de fotones, es decir, por ruido de disparo. Dado esto, se ha establecido experimentalmente un límite inferior de $SNR < 5$ sobre el cual cualquier algoritmo *SPT* probado funciona de manera confiable [56].

Aparte del ruido de disparo, la precisión puede ser peor para el ruido de fondo, ya sea por autofluorescencia o por ruido del detector. Además, surge un tercer tipo de problema cuando dos partículas están cerca una de la otra. *MSSR* ha mostrado propiedades de eliminación de ruido, proporcionando información nanoscópica a muy bajos *SNR*, cerca de la unidad (figura 5.8). Para probar si *SPT* puede mejorarse mediante el preprocesamiento *MSSR*, el método fue analizado por el “Desafío de Seguimiento de Partículas Únicas” ([56]; <http://bioimageanalysis.org/track/>).

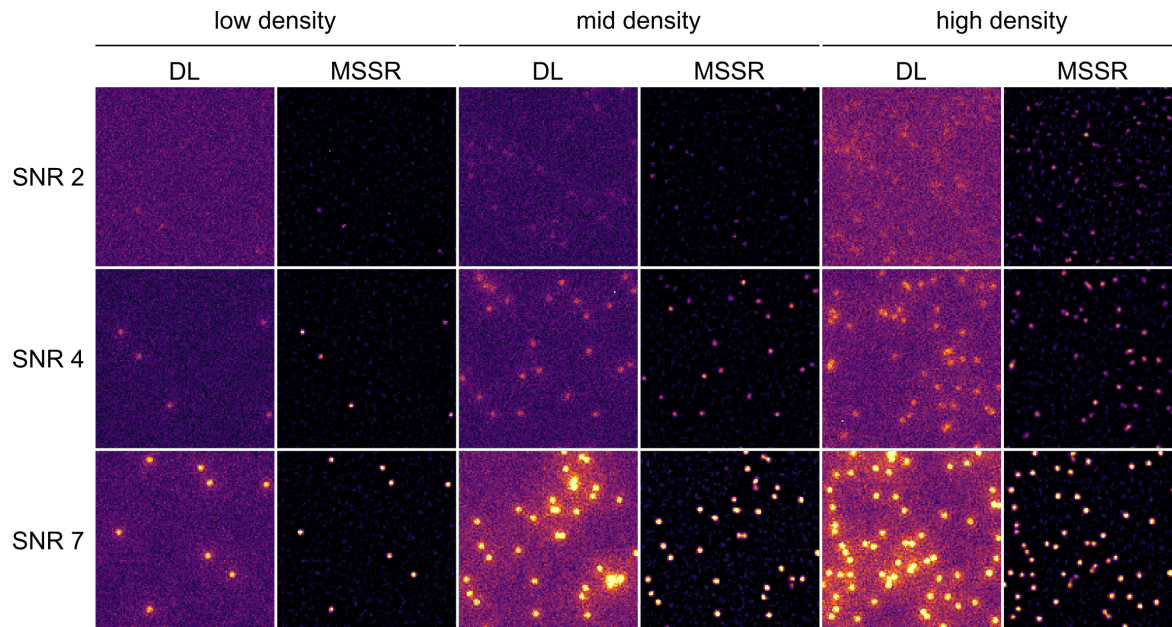


Figura 5.15: *MSSR* resultados de imágenes LD individuales en diferentes densidades de fluoróforos y *SNR*. Imágenes LD y resultados de *MSSR* (amp = 1, PSF = 3, orden = 1) de vesículas difusas del “Desafío de seguimiento de partículas individuales”, generadas para tres *SNR* diferentes: 2, 4, 7 y con tres niveles de densidad de partículas de sub-difracción: bajo, medio, alto equivalentes a 100, 500, 1000 partículas por imagen respectivamente.

Se utilizaron conjuntos de datos de imágenes representativas con el patrón de referencia para evaluar las implicaciones del preprocesamiento con *MSSR* antes de *SPT*, considerando dos factores principales que afectan el rendimiento del seguimiento, a saber, el número de partículas dentro del campo de imágenes y su señal relativa al ruido (figura 5.16). Se probaron tres clases de algoritmos de seguimiento: (i) el marco LAP para el movimiento browniano como en [57], (ii) un rastreador de movimiento lineal basado en el filtro de Kalman [58,59], y (iii) un rastreador basado en vecinos más cercanos [60–62]. La precisión de seguimiento sobre datos sin procesar o *MSSR* preprocesados se evaluó siguiendo cuatro indicadores que van desde 0 (peor) a 1 (mejor): α y β indican el grado general de coincidencia entre la verdad del terreno y trayectorias estimadas; el índice de Jaccard entre pistas cuantifica la correspondencia entre las pistas de verdad del fondo y las devueltas por el algoritmo de seguimiento probado; Por último, el índice de Jaccard entre las detecciones cuantifica qué tan bien las detecciones de la verdad del terreno coinciden con las partículas detectadas por cada algoritmo de seguimiento. Sorprendentemente, en cualquier conjunto de condiciones (*SNR*, densidad de partículas, algoritmo *SPT*), *MSSR* mejora significativamente el rendimiento de seguimiento general.

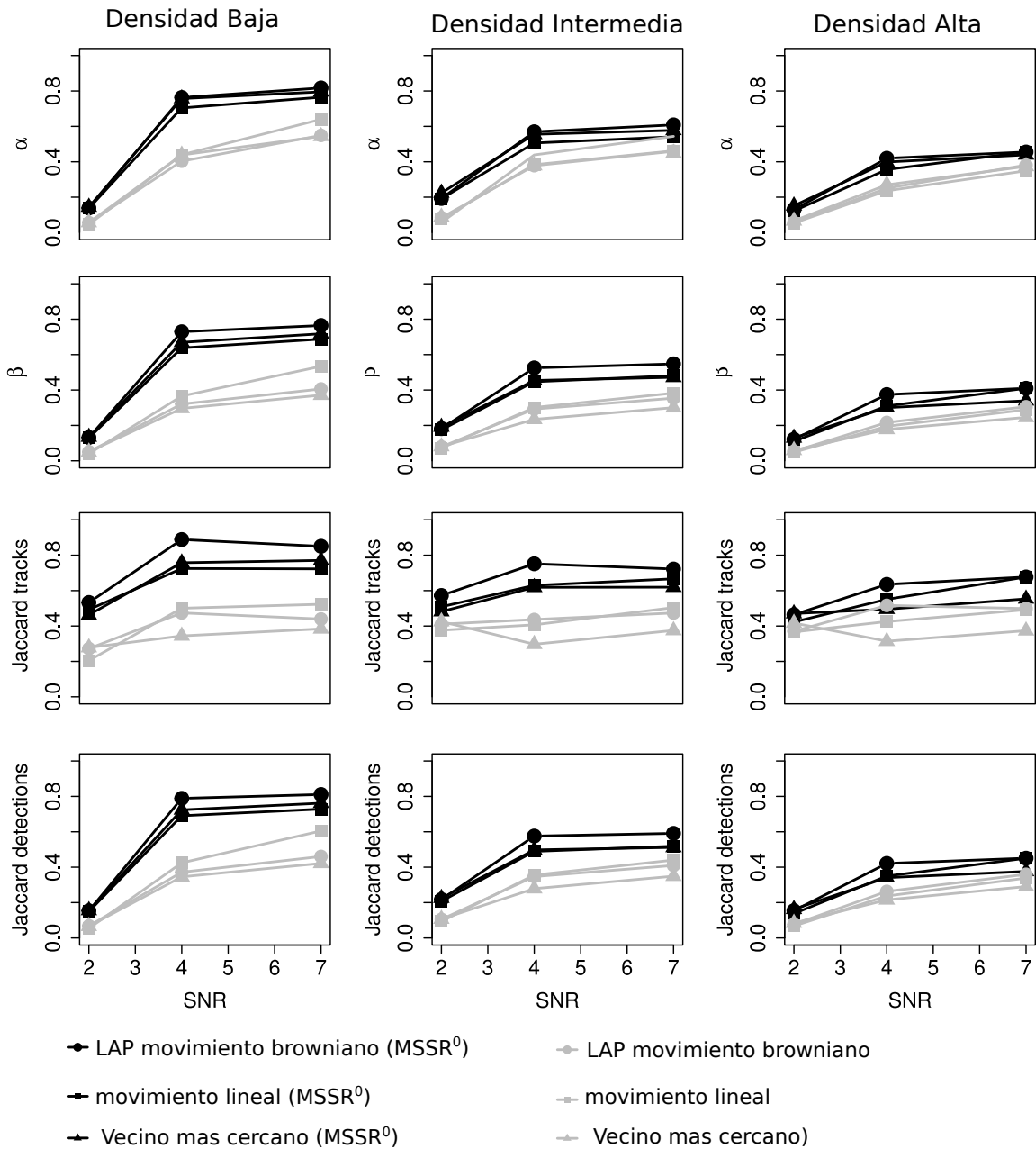


Figura 5.16: Datos de imagen de desafío para el escenario de vesículas del "Desafío de seguimiento de partícula individual", generado en tres SNR diferentes: 2,4,7 y en tres niveles de densidad de partículas de sub difracción: bajo, medio, alto equivalente a 100,500,1000 partículas por imagen respectivamente. Se probó la competencia de tres rastreadores marco LAP, rastreador de movimiento lineal, vecino más cercano sobre datos sin procesar (gris) o preprocesados con $MSSR$ (amp = 1, psf = 3, order = 1) (negro). El seguimiento del rendimiento se evaluó con la "tracking performance evaluation tool" implementada en Icy 2.1.3.0 (<http://icy.bioimageanalysis.com>).

La figura 5.16 muestra que en cualquier situación probada, el preprocesamiento de las imágenes con *MSSR* mejora inevitablemente la fuerza de seguimiento. El preprocesamiento con *MSSR* supera el límite inferior de $SNR < 5$ para el seguimiento del rendimiento. Tenga en cuenta que después del preprocesamiento de *MSSR*, cualquier algoritmo de seguimiento probado frente a datos que alberguen un $SNR = 4$ funciona tan bien como cuando se enfrenta a datos con $SNR = 7$. Además, el preprocesamiento con *MSSR* mejora las capacidades de los algoritmos *SPT* para identificar y vincular de manera confiable partículas individuales en cualquier densidad de partículas probada. Se concluye que el preprocesamiento con *MSSR* mejora cualquier instancia de seguimiento de partículas, independientemente del algoritmo *SPT* utilizado, el número de partículas dentro del campo de imagen o la SNR del conjunto de datos.

5.4.4. Colocalización dinámica con resolución nanoscópica

Un desafío para *SPT* surge cuando se buscan interacciones moleculares, ya que las moléculas individuales a menudo tienen dimensiones nanoscópicas. Observar que la colocalización implica una resolución a nivel subpíxelico, por lo que las interpretaciones deben elaborarse teniendo en cuenta las restricciones debidas al tamaño y muestreo de *PSF*.

El algoritmo *MSSR* se aplicó a ensayos de cortina de ADN para analizar la colocalización de proteínas fluorescentes unidas al ADN. Aquí, un polipéptido de autoensamblaje ($C - S_{10} - B$, etiquetado en verde) se une al ADN que ha sido decorado previamente con *CRISPR - dCas12a* (etiquetado magenta) a través de múltiples *CRISPR-RNA* (crRNA). $C - S_{10} - B$ se une y difunde en el ADN pero no puede moverse más allá de *dCas12a* unido de manera estable (figura 5.17a). *MSSR* aumentó la SNR y la resolución de los quimógrafos que muestran $C - S_{10} - B$ 1D difusión en un tramo de ADN delimitado por *dCas12a* (figura 5.17b). Durante el autoensamblaje, grandes grupos de $C - S_{10} - B$ se forman y se colocalizan con *dCas12a* (figura 5.17c). Como se ve en la figura 5.17d, *MSSR* transformó áreas fluorescentes borrosas en grupos $C - S_{10} - B$ bien definidos e hizo la colocalización de $C - S_{10} - B$ y *dCas12a* más evidente.

Se concluye que, *MSSR* se puede utilizar para mejorar la recuperación de información significativa en escenarios de seguimiento de partículas individuales y colocalización dinámica nanoscópica.

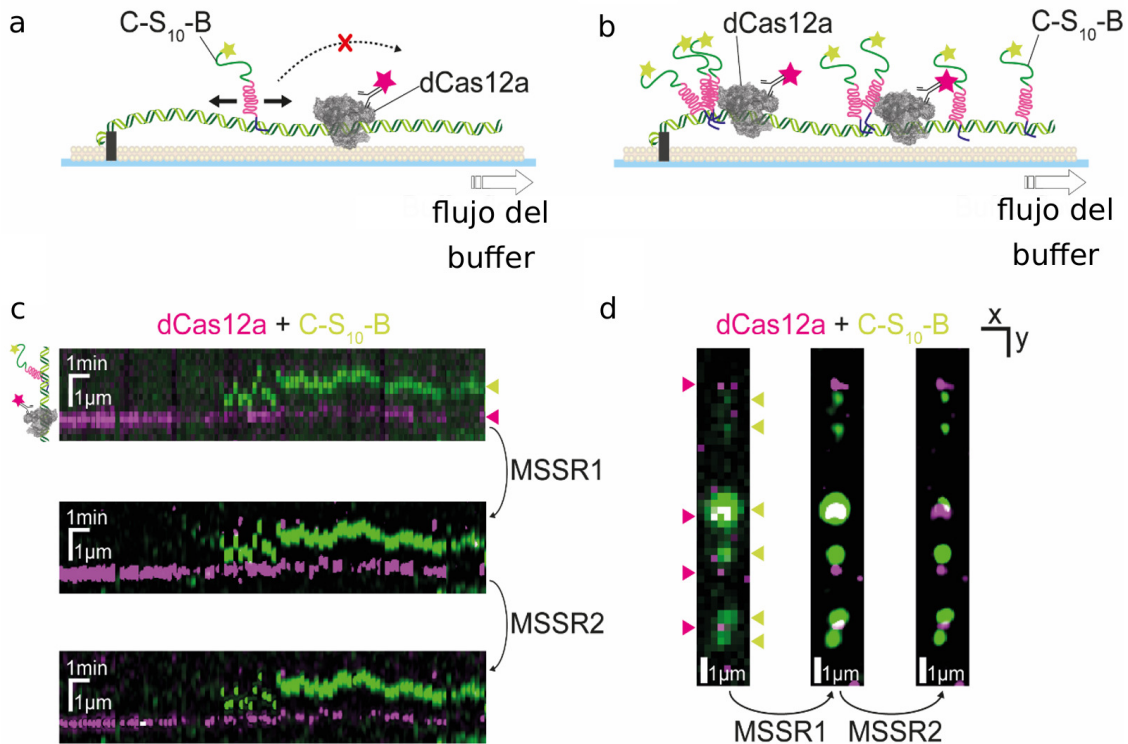


Figura 5.17: *MSSR* elimina el ruido de las imágenes y mejora la visualización de la dinámica intermolecular en escenarios de colocación de molécula única. a) La difusión lineal de $C - S_{10} - B$ (marcado con Alexa488, verde) en el ADN extendido con tampón está restringida por dCas12a unido de manera estable (marcado con puntos cuánticos, magenta) en una molécula de ADN (sin etiquetar). b) El estancamiento de la difusión de $C - S_{10} - B$ por dCas12a provoca la co-localización de ambas moléculas. c) Procesamiento con una y dos iteraciones *MSSR* de un quimógrafo que muestra dCas12a (inmóvil, magenta) y $C - S_{10} - B$ (deslizante, verde) en el ADN (sin marcar). d) Procesamiento con una y dos iteraciones *MSSR* de una molécula de ADN (sin marcar) con $C - S_{10} - B$ (verde) y dCas12a (magenta) unidos.

5.4.5. Nanoscopia volumétrica de muestras profundas

Para demostrar la utilidad de *MSSR* en el área de imagenología multidimensional, este fue desafiado a revelar estructuras nanoscópicas en una raíz *Arabidopsis thaliana* como un ejemplo de muestras multicelulares gruesas, analizadas con microscopía de barrido láser confocal regular y microscopía de iluminación plana selectiva.

Plantas transgénicas de *A. thaliana* con plasmalemma [63] y marcadores fluorescentes nucleares [64], que se utilizan habitualmente para analizar la proliferación

celular durante el desarrollo de la raíz en experimentos de lapso de tiempo, se obtuvieron imágenes con *CLSM* (microscopía confocal de barrido láser, confocal laser-scanning microscope, por sus siglas en inglés). Para desenredar las propiedades de eliminación de ruido de *MSSR* de sus capacidades para mejorar la resolución espacial, el PSF no se muestreó correctamente (ver apéndice A). Tenga en cuenta que en este escenario de CLSM no se puede visualizar de manera óptima las figuras mitóticas, lo cual se muestra en la figura 5.18a y su *ROI* (región de interés, region of interest, por sus siglas en inglés) asociado 5.18b. Sin embargo, cuando estas imágenes fueron postprocesadas con *MSSR*, se observa un mejor contraste en las imágenes de figuras mitóticas debido a la notable calidad del proceso de eliminación de ruido, e incluso, al permitir revelar información estructural oculta (figura 5.18c).

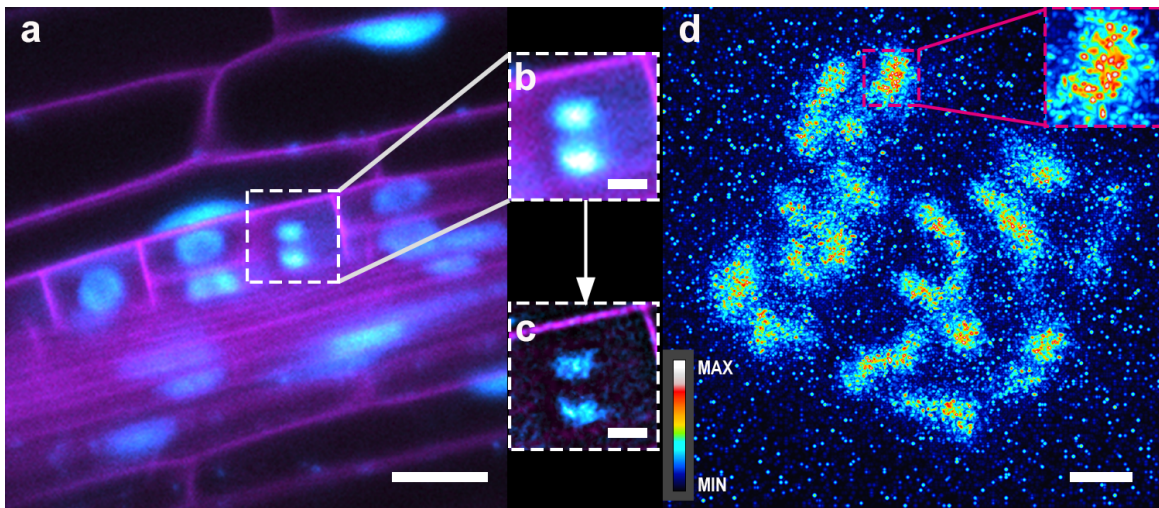


Figura 5.18: a) Imagen del primordio de la raíz lateral en etapa temprana adquirida con CLSM regular. b) *ROI* original tomado de a), resaltado por el cuadrado de rayas blancas. c) El mismo *ROI* que en b) después de ser procesado con *MSSR*. d) Imagen sobremuestreada y procesada con *MSSR* de los cromosomas de células primódicas de la raíz lateral vistos por H2B marcados con RFP. El recuadro muestra un *ROI* de zoom (aumentada 3 veces) resaltado por el cuadrado rojo punteado. Barra de escalas en a) = $20\mu\text{m}$, b) y c) = $5\mu\text{m}$, d) = $1\mu\text{m}$. Las imágenes en a), b) y c) se hizo mediante una proyección en el eje *Z* de diez cortes con el modo de cortes *SUM* y los *FIJI*'s *LUT* usados para los canales rojo y verde fueron "Cyan Hot" y "Magenta", respectivamente, mientras que la imagen en d) se hizo mediante una proyección *Z* de 86 cortes con el modo de intensidad MAX y el *LUT* utilizado fue "Royal" de *FIJI*. Para obtener más detalles, consultar los métodos.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, las imágenes sin procesar se adquirieron con un *PSF* submuestreado y esto nos llevó a preguntarnos si *MSSR* nos permitiría ver estructuras nanoscópicas con el *PSF* adecuado. Para obtener una mejor resolución espacial, se tuvo que sobremuestrear el *PSF* usando *CLSM*

5.4. RESOLUCIÓN NANOSCÓPICA CON IMÁGENES DE FLUORESCENCIA 77

y la misma línea transgénica de *A. thaliana* con Histona H2B marcada con *RFP* (ver métodos). Cuando estas imágenes se procesaron con *MSSR*, se pudo revelar estructuras nanoscópicas debido a la observación de la señal fluorescente emitida por nanodominios heterogéneos de cromatina dentro de las figuras mitóticas (figura 5.18d). Es probable que estos nanodominios se asemejen a las garras de nucleosomas previamente reportadas en células de mamíferos [65, 66] y en *A. thaliana* núcleos de hojas [67]. Debido a que estas imágenes se adquirieron como *Z*-planos, la aplicación de *MSSR* nos dio una resolución nanoscópica 3D (figura 5.18d, mov. S10).

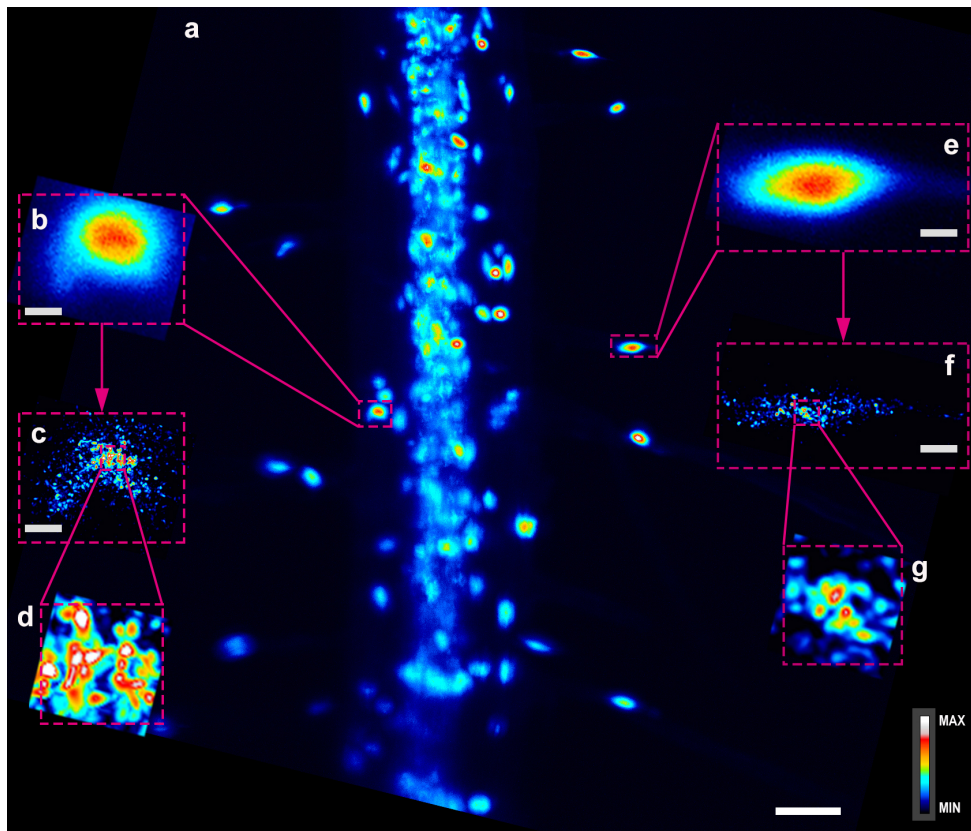


Figura 5.19: a) Proyección de intensidad máxima de la raíz primaria de la línea transgénica *p35s: H2B-RFP*. El ROI izquierdo marcado con un cuadrado punteado rosa se muestra de b) hacia d) y la ROI derecha marcada con un cuadrado punteado rosa se muestra de e) hacia g). b) Imagen original de un núcleo de una célula epidérmica diferenciada sin pelo. c) La misma imagen de b) después de ser procesada por *MSSR*. d) Los detalles de ROI que se muestran en c). e) Imagen original de un núcleo de una célula radicular. f) La misma ROI en e) después de ser procesada por *MSSR*. g) Los detalles de ROI que se muestran en f). Barra de escalas en a = $50\mu\text{m}$, b-c y e-f = $5\mu\text{m}$. Las imágenes finales son proyecciones en *Z* de *n* cortes con el modo de intensidad MAX y el LUT "Real" de FIJI. Consulte los métodos para obtener más detalles.

Capítulo 6

Conclusiones

Se presentó un nuevo método *MSR* computacional, *MSSR*, capaz de lograr nanoscopía multidimensional a través del análisis de un solo cuadro en condiciones de SNR bajas y con artefactos mínimos o nulos dependientes del ruido. Limitado solo por la velocidad de captación en la configuración óptica de la imagen, *MSSR* aumenta la resolución al analizar un solo fotograma o una pila completa de imágenes y se puede utilizar como un poderoso método *MSR* de forma independiente del sistema óptico colector de imágenes. Se demostró la compatibilidad de *MSSR* con otros métodos de *MSR* y que su uso mejoró la resolución y la calidad de la imagen resultante en todos los casos probados.

Los enfoques basados en entropía (principalmente restringidos a sistemas basados en cámaras) como SRRF, ESI, MUSICAL y 3B exigen un análisis temporal que excluye su utilidad para la obtención de imágenes multidimensionales de muestras vivas. La necesidad de recopilar cientos de imágenes de la misma escena pseudoestática desafía la aplicabilidad de estos métodos en la obtención de imágenes multidimensionales. El número de imágenes adquiridas impone una compensación entre las resoluciones temporales y espaciales alcanzables para estos métodos. *MSSR* tiene la capacidad de eliminar estas limitaciones mientras mantiene bajas las demandas computacionales, gracias a las implementaciones disponibles y su compatibilidad con una diversidad de sistemas de imágenes.

Las pruebas adicionales del enfoque de *MSSR* en varios contextos y aplicaciones de imágenes biológicas de fluorescencia demostraron su capacidad para mejorar la calidad de una amplia gama de estudios de microscopía óptica dentro y fuera del ámbito de SRM. Se pudo revelar dinámicas moleculares, a través del análisis de un solo cuadro de imágenes de células vivas, en cuestión de segundos y con demanda de potencia computacional mínima, que si se compara con el algoritmo 3B, los tiempos de procesamiento pudieran tardar varias horas e incluso días. Además, se mostró que *MSSR* mejora en gran medida la eficacia de seguimiento de los métodos SMLM al reducir el ruido de fondo y, por lo tanto, aumentar tanto el contraste

como la SNR de las secuencias SPT corrompidas por ruido de fondo, mejorando la capacidad de resolver la posición de emisores individuales. $MSSR$ empuja aún más los límites de la nanoscopia de células vivas al disminuir la necesidad de un análisis temporal. Su flexibilidad extiende su utilidad a la mayoría de los métodos de microscopía de fluorescencia y otros métodos SRM.

Capítulo 7

Logros alcanzados y trabajo futuro

7.1. Nuevas contribuciones teóricas

Desde el punto de vista histórico, el desarrollo seminal de la teoría de la MS [18, 19] y hasta la actualidad, pocas aplicaciones estadísticas y de imágenes basadas en la teoría de la MS calculan el vector de la MS en sí [68]. Esto puede explicarse, en parte, porque las aplicaciones anteriores de MS se basan en modos de búsqueda en el espacio de características y no operaban directamente en el espacio derivado. En contraste, $MSSR$ representa la primera aplicación de la teoría de MS que opera en el segundo espacio de derivada, calculando el vector MS y estimando densidades entre píxeles, $MSSR$ calcula una función de probabilidad para las estimaciones de fluoróforos cuyas distribuciones de fluorescencia individuales se reducen en comparación con la PSF del sistema óptico.

La información contenida en el segundo espacio de la derivada de la imagen limitada por difracción es utilizada por $MSSR$ para calcular una imagen superresuelta con frecuencias espaciales más altas que la imagen limitada por difracción correspondiente, por lo tanto, superando los límites de Abbe y Sparrow, y estableciendo una imagen no descrita. Lo cual sugiere que el límite de resolución que merece una mayor exploración y caracterización.

7.2. Nuevas contribuciones a la microscopía

Se presentó un nuevo enfoque de SRM analítico capaz de lograr nanoscopía multidimensional a través del análisis de una sola imagen en condiciones de bajo SNR y con un mínimo de artefactos dependientes del ruido. Limitado solo por la velocidad de imagen de la configuración óptica, $MSSR$ aumenta la resolución al analizar un solo cuadro o una pila completa de imágenes y se puede usar como

un poderoso método SRM independiente para cualquier caso o como una mejora para otros análisis de pila métodos SRM multiframe o dependientes del hardware. Se demostró la compatibilidad de MSSR con otros métodos de SRM y se demostró que su uso mejora la resolución y la calidad de imagen general en todos los casos probados.

Los enfoques de multitráma analíticos SRM (principalmente restringidos a sistemas basados en cámaras) como SRRF, ESI, MUSICAL y 3B exigen un análisis temporal que limita su utilidad para la obtención de imágenes multidimensionales de muestras vivas [69–71]. La necesidad de recopilar cientos de imágenes de la misma escena pseudoestática desafía la aplicabilidad de estos métodos en la obtención de imágenes multidimensionales. El requisito de multitráma temporal impone un compromiso entre las resoluciones temporales y espaciales alcanzables para estos métodos. MSSR elimina estas limitaciones al tiempo que mantiene la eficiencia computacional.

Se presentaron aplicaciones del principio MSSR que revelaron dinámicas moleculares rápidas a través del análisis de un solo cuadro de datos de imágenes de células vivas, con tiempos de procesamiento reducidos en comparación con enfoques SRM similares. Además, MSSR mejora en gran medida la eficacia de seguimiento de los métodos SPT al reducir el ruido de fondo y aumentar tanto el contraste como la SNR de las películas SPT ruidosas, mejorando la capacidad de resolver la posición de emisores individuales. MSSR empuja aún más los límites de la nanoscopia de células vivas gracias a su excelente rendimiento de fotograma único. Esta flexibilidad extiende su utilidad a la mayoría de los métodos de microscopía de fluorescencia y SRM alternativos.

Lograr una resolución temporal y espacial alta (o suficiente) dentro de una amplia gama de aplicaciones de microscopía de fluorescencia es un objetivo común entre la comunidad de bioimágenes. Con los avances recientes en equipos de microscopía y protocolos de imágenes, la brecha entre la resolución más alta alcanzable en las dimensiones temporal y espacial dentro del mismo experimento se ha reducido. Esto ha sido un desafío especialmente porque ambos parámetros a menudo involucran instrumentación óptica y estrategias experimentales mutuamente excluyentes. La introducción de MSSR representa un paso más en la dirección correcta, ya que reduce drásticamente la cantidad de datos necesarios para reconstruir una única micrografía súper resuelta.

7.3. Publicaciones y eventos asociados con esta tesis

Publicaciones:

- Esley Torres García, Raúl Pinto Cámara, Alejandro Linares, Damián Martínez, Víctor Abonza, Eduardo Brito-Alarcón, Carlos Calcines-Cruz, Gustavo Valdés-Galindo, David Torres, Martina Jabłoński, Héctor H. Torres-Martínez, José L. Martínez, Haydee O. Hernández, José P. Ocelotl-Oviedo, Yasel Garcés, Marco Barchi, Joseph G. Dubrovsky, Alberto Darszon, Mariano G. Buffone, Roberto Rodríguez Morales, Juan Manuel Rendon-Mancha, Christopher D. Wood, Armando Hernández-García, Diego Krapf, Álvaro H. Crevenna, Adán Guerrero. *Nanoscopic resolution within a single imaging frame*. Preprint at bioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/445262>, (2021).
- Esley Torres García, Raúl Pinto Cámara, Alejandro Linares, Damián Martínez, Víctor Abonza, Eduardo Brito-Alarcón, Carlos Calcines-Cruz, Gustavo Valdés-Galindo, David Torres, Martina Jabłoński, Héctor H. Torres-Martínez, José L. Martínez, Haydee O. Hernández, José P. Ocelotl-Oviedo, Yasel Garcés, Marco Barchi, Joseph G. Dubrovsky, Alberto Darszon, Mariano G. Buffone, Roberto Rodríguez Morales, Juan Manuel Rendon-Mancha, Christopher D. Wood, Armando Hernández-García, Diego Krapf, Álvaro H. Crevenna, Adán Guerrero. *Nanoscopic resolution within a single imaging frame*. Preprint at researchsquare.com, doi: 10.21203/rs.3.rs-984659/v1, (2021).

Eventos:

- Conferencia: *MSSR: algoritmo de microscopía de super-resolución basado en la Medía Desplazada*. Impartida en Seminario Departamental, perteneciente al programa de seminarios del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, 25 de marzo del 2021.
- Conferencia: *MSSR: algoritmo de microscopía de super-resolución basado en la Medía Desplazada*. Impartida en Curso Virtual de Microscopía Avanzada, LNMA, IBt, UNAM, 10 de noviembre del 2021.

7.4. Trabajo futuro

La teoría de MS no está restringida por el número de dimensiones de la información requerida para calcular las ventanas del kernel sobre las que opera MSSR.

Dado eso, los parámetros de MSSR son adecuados para extender su aplicación para evaluar datos con mayores dimensiones. Por ejemplo, en imágenes 2D, el parámetro espacial h_s de MSSR, que abarca el ancho de resolución lateral del PSF, se define como el mismo en las dimensiones x e y de la imagen. En tal caso, la forma del núcleo es circular o cuadrada, dependiendo de la aplicación utilizada. Para la obtención de imágenes de microscopía tridimensional (3D), las dimensiones lateral (plano x-y) y axial (planos x-z e y-z) se ven afectadas de diferentes formas por la difracción. El principio de MSSR se puede ampliar aún más para obtener imágenes volumétricas explícitas mediante el uso de un núcleo h_s asimétrico que se puede definir siguiendo la relación de aspecto lateral-axial 3D de la PSF. Además, la definición del núcleo h_s se puede refinar para considerar también posibles deformaciones de la simetría axial de la PSF debido a aberraciones ópticas introducidas por el sistema de formación de imágenes o por la propia muestra. Se puede prever un razonamiento similar destinado a ampliar la cartera de aplicaciones de MSSR considerando tanto los parámetros h_s como h_r , este último reduce el espacio de intensidad de trabajo donde tienen lugar los cálculos locales de MSSR. Al considerar la dimensión del color (longitud de onda de la luz), ambos parámetros pueden refinarse para establecer nuevas aplicaciones de nanoscopía en imágenes funcionales, como imágenes espectrales [72, 73], imágenes radiométricas de células vitales [74–76] o FRET [77–79].

La exploración de la información almacenada en el espacio de la segunda derivada de la imagen también se puede lograr sustituyendo el valor de la MS por una función similar que opera en el espacio de la segunda derivada. Por ejemplo, Laplaciano, Hessiano o Diferencia de Gaussianas [80–84], que en comparación con la MS ofrecen ventajas computacionales, ya que pueden expresarse en el espacio de Fourier e implementarse utilizando el algoritmo FFT [85, 86].

Para no sacrificar la resolución temporal o espacial, algunos científicos proponen nuevas formas de analizar los datos de imágenes. Algunas aproximaciones se han adaptado para estudiar la dinámica molecular de milisegundos y los cambios de características estructurales dentro del mismo experimento [87–89], por ejemplo, aprovechando el uso simultáneo de espectroscopía de correlación de imágenes (ICS) y métodos SRM como SRRF [11]. En estos contextos, MSSR podría mejorar el análisis de tres maneras:

- entrega imágenes SRM confiables en escenarios de SNR baja, que son comunes en los regímenes experimentales de ICS debido a las velocidades de cuadro relativamente rápidas de sus aplicaciones,
- MSSR introduce no artefactos dependientes del ruido que refinan aún más la calidad del análisis espacial y
- dado que no es necesario un agrupamiento temporal para $MSSR$, no hay restricción en el nivel de detalle temporal recuperable del análisis ICS.

Ahora se pueden obtener imágenes de microscopía de lapso de tiempo de sub-milisegundos mediante tecnologías sCMOS, con aplicaciones para velocimetría de partículas [90, 91], reometría [92, 93] y pinza de parche óptico [94, 95]. Se prevén nuevas aplicaciones para MSSR en estas áreas mediante la revelación de detalles nanoscópicos ocultos en imágenes únicas limitadas por difracción. Además, MSSR puede facilitar la obtención de imágenes nanoscópicas correlativas a través de un análisis inclusivo beneficiado de la diafonía con otras técnicas de imagen como la microscopía electrónica o la microscopía de fuerza atómica [96, 97]. Así mismo, *MSSR* se puede aplicar a la obtención de imágenes volumétricas nanoscópicas utilizándola junto con microscopía de expansión [98, 99], microscopía de ángulo oblicuo [100, 101], microscopía de iluminación plana selectiva y microscopía de láminas de luz de celosía [102, 103], ampliando sus capacidades a los anteriores regímenes de resolución inalcanzables.

Las aplicaciones de MSSR pueden tener un impacto mucho más allá del campo de la microscopía, ya que sus principios pueden aplicarse a cualquier sistema basado en lentes, por ejemplo, astronomía [104, 105] o imágenes de satélite de alta resolución [106].

Bibliografía

- [1] Ernst Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 9(1):413–468, December 1873.
- [2] Lord Rayleigh. On the theory of optical images, with special reference to the microscope. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 23(4):474–482, 1903.
- [3] G. B. Airy. On the Diffraction of an Object-glass with Circular Aperture. *Transactions of the Cambridge Philosophical Society*, 5:283, January 1835.
- [4] H. Bock, C. Geisler, C.A. Wurm, C. von Middendorff, S. Jakobs, A. Schönle, A. Egner, S.W. Hell, and C. Eggeling. Two-color far-field fluorescence nanoscopy based on photoswitchable emitters. *Applied Physics B*, 88(2):161–165, July 2007.
- [5] Oren Solomon, Maor Mutzafi, Mordechai Segev, and Yonina C. Eldar. Sparsity-based super-resolution microscopy from correlation information. *Opt. Express*, 26(14):18238–18269, Jul 2018.
- [6] Susan Cox, Edward Rosten, James Monypenny, Tijana Jovanovic-Talisman, Dylan T Burnette, Jennifer Lippincott-Schwartz, Gareth E Jones, and Rainer Heintzmann. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics. *Nature Methods*, 9:195–200, 2012.
- [7] Edward Rosten, Gareth E Jones, and Susan Cox. Imagej plug-in for bayesian analysis of blinking and bleaching. *Nature Methods*, 10(2):97–98, February 2013.
- [8] Haydee O. Hernández, Paloma Hidalgo, Christopher D. Wood, Ramón González, and Adán Guerrero. Parallelizing the Bayesian Analysis of Blinking and Bleaching for Super-Resolution Microscopy. In Isidoro Gitler and Jaime Klapp, editors, *High Performance Computer Applications*, pages 356–366, Cham, 2016. Springer International Publishing.

- [9] T. Dertinger, R. Colyer, G. Iyer, S. Weiss, and J. Enderlein. Fast, background-free, 3d super-resolution optical fluctuation imaging (sofi). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52):22287–22292, 2009.
- [10] Idir Yahiatene, Simon Hennig, Marcel Müller, and Thomas Huser. Entropy-Based Super-Resolution Imaging (ESI): From Disorder to Fine Detail. *ACS Photonics*, 2(8):1049–1056, August 2015. Publisher: American Chemical Society.
- [11] Nils Gustafsson, Siân Culley, George Ashdown, Dylan M. Owen, Pedro Matos Pereira, and Ricardo Henriques. Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. *Nature Communications*, 7(1):12471, August 2016.
- [12] Krishna Agarwal and Radek Macháň. Multiple signal classification algorithm for super-resolution fluorescence microscopy. *Nature Communications*, 7(1):13752, December 2016.
- [13] Stefan W Hell and Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 19(11):780–782, 1994.
- [14] Stefan W Hell and Matthias Kroug. Ground-state-depletion fluorescence microscopy: A concept for breaking the diffraction resolution limit. *Applied Physics B*, 60(5):495–497, 1995.
- [15] Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, O. Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino, Michael W. Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Harald F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645, 2006. Publisher: American Association for the Advancement of Science .eprint: <https://science.sciencemag.org/content/313/5793/1642.full.pdf>.
- [16] Curran Oi, Simon G. J. Mochrie, Mathew H. Horrocks, and Lynne Regan. Paint using proteins: A new brush for super-resolution artists. *Protein Science*, 29(11):2142–2149, 2020.
- [17] M. G. L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy*, 198(2):82–87, 2000.
- [18] K. Fukunaga and L. Hostetler. The estimation of the gradient of a density function, with applications in pattern recognition. *IEEE Transactions on Information Theory*, 21(1):32–40, January 1975.
- [19] Yizong Cheng. Mean shift, mode seeking, and clustering. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 17(8):790–799, Aug 1995.

- [20] Jun Wang, Paulo Urriza, Yuxing Han, and Danijela Cabric. Weighted centroid localization algorithm: theoretical analysis and distributed implementation. *IEEE Transactions on wireless communications*, 10(10):3403–3413, 2011.
- [21] D. Comaniciu and P. Meer. Mean shift: a robust approach toward feature space analysis. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 24(5):603–619, May 2002.
- [22] Mingzhai Sun, Jiaqing Huang, Filiz Bunyak, Kristyn Gumper, Gejing De, Matthew Sermersheim, George Liu, Pei-Hui Lin, Kannappan Palaniappan, and Jianjie Ma. Superresolution microscope image reconstruction by spatiotemporal object decomposition and association: application in resolving t-tubule structure in skeletal muscle. *Opt. Express*, 22(10):12160–12176, May 2014.
- [23] Yao Wu, Pakorn Kanchanawong, and Ronen Zaidel-Bar. Actin-delimited adhesion-independent clustering of e-cadherin forms the nanoscale building blocks of adherens junctions. *Developmental Cell*, 32(2):139–154, 2015.
- [24] Shan Gao, Fan Xu, Hongjia Li, Fudong Xue, Mingshu Zhang, Pingyong Xu, and Fa Zhang. Detector: structural information guided artifact detection for super-resolution fluorescence microscopy image. *Biomed. Opt. Express*, 12(9):5751–5769, Sep 2021.
- [25] Frank J. Fazekas, Thomas R. Shaw, Sumin Kim, Ryan A. Bogucki, and Sarah L. Veatch. A mean shift algorithm for drift correction in localization microscopy. *Biophysical Reports*, 1(1):100008, 2021.
- [26] Ismail M. Khater, Fanrui Meng, Timothy H. Wong, Ivan Robert Nabi, and Ghas-san Hamarneh. Super resolution network analysis defines the molecular architecture of caveolae and caveolin-1 scaffolds. *Scientific Reports*, 8(1):9009, June 2018.
- [27] Jérôme Boulanger, Charles Kervrann, Patrick Bouthemy, Peter Elbau, Jean-Baptiste Sibarita, and Jean Salamero. Patch-based nonlocal functional for denoising fluorescence microscopy image sequences. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 29(2):442–453, February 2010.
- [28] Frank J Fazekas, Shaw Thomas R, Kim Sumin, Bogucki Ryan A, and Veatch Sarah L. A mean shift algorithm for drift correction in localization microscopy. *bioRxiv*, 2021. Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory eprint: <https://www.biorxiv.org/content/early/2021/05/07/2021.05.07.443176.full.pdf>.
- [29] Sudhir Rao, Allan de Medeiros Martins, and José C Príncipe. Mean shift: An information theoretic perspective. *Pattern Recognition Letters*, 30(3):222–230, 2009.

- [30] Roberto Rodríguez, Esley Torres, and Juan H Sossa. Image segmentation via an iterative algorithm of the mean shift filtering for different values of the stopping threshold. *International Journal of Imaging and Robotics*, pages 27–43, 2012.
- [31] Yasel Garcés Suárez, Esley Torres, Osvaldo Pereira, Claudia Pérez, and Roberto Rodríguez. Stopping criterion for the mean shift iterative algorithm. In *Iberoamerican Congress on Pattern Recognition*, pages 383–390. Springer, 2013.
- [32] K. Kailash Sharma. *Optics: Principles and Applications*. Elsevier Science, 2006.
- [33] Stefan W. Hell and Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.*, 19(11):780–782, Jun 1994.
- [34] Luwei Wang, Bingling Chen, Wei Yan, Zhigang Yang, Xiao Peng, Danying Lin, Xiaoyu Weng, Tong Ye, and Junle Qu. Resolution improvement in sted super-resolution microscopy at low power using a phasor plot approach. *Nanoscale*, 10:16252–16260, 2018.
- [35] Stefano Calovi, Federico N. Soria, and Jan Tønnesen. Super-resolution sted microscopy in live brain tissue. *Neurobiology of Disease*, 156:105420, 2021.
- [36] Raghuvveer Parthasarathy. Rapid, accurate particle tracking by calculation of radial symmetry centers. *Nature Methods*, 9(7):724–726, July 2012.
- [37] Sebastian Acuna, Florian Ströhl, Ida S. Opstad, Balpreet S. Ahluwalia, and Krishna Agarwal. Musij: an imagej plugin for video nanoscopy. *Biomed. Opt. Express*, 11(5):2548–2559, May 2020.
- [38] Siân Culley, David Albrecht, Caron Jacobs, Pedro Matos Pereira, Christophe Leterrier, Jason Mercer, and Ricardo Henriques. Quantitative mapping and minimization of super-resolution optical imaging artifacts. *Nature methods*, 15(4):263–266, April 2018. Edition: 2018/02/19.
- [39] Daniel Sage, Thanh-An Pham, Hazen Babcock, Tomas Lukes, Thomas Pengo, Jerry Chao, Ramraj Velmurugan, Alex Herbert, Anurag Agrawal, Silvia Colabrese, Ann Wheeler, Anna Archetti, Bernd Rieger, Raimund Ober, Guy M. Hagen, Jean-Baptiste Sibarita, Jonas Ries, Ricardo Henriques, Michael Unser, and Seamus Holden. Super-resolution fight club: assessment of 2D and 3D single-molecule localization microscopy software. *Nature Methods*, 16(5):387–395, May 2019.

- [40] C. Bouchiat, M.D. Wang, J.-F. Allemand, T. Strick, S.M. Block, and V. Croquette. Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophysical Journal*, 76(1):409–413, 1999.
- [41] Joerg Schnitzbauer, Maximilian T Strauss, Thomas Schlichthaerle, Florian Schueder, and Ralf Jungmann. Super-resolution microscopy with DNA-PAINT. *Nature Protocols*, 12(6):1198–1228, June 2017.
- [42] Alexander D. Corbett, Michael Shaw, Andrew Yacoot, Andrew Jefferson, Lothar Schermelleh, Tony Wilson, Martin Booth, and Patrick S. Salter. Microscope calibration using laser written fluorescence. *Opt. Express*, 26(17):21887–21899, Aug 2018.
- [43] L. Lü, J. Y. H. Fuh, and Y. S. Wong. *Fundamentals of Laser-Lithography Processes*, pages 9–38. Springer US, Boston, MA, 2001.
- [44] Hyug-Gyo Rhee. Direct laser lithography and its applications. In Michael Wang, editor, *Lithography*, chapter 1. IntechOpen, Rijeka, 2010.
- [45] Bernard N. Fields, David M. Knipe, and Peter M. Howley. *Fields virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013.
- [46] Yasel Garcés Suárez, Jose L Martínez, David Torres Hernández, Haydee Olinca Hernández, Arianna Pérez-Delgado, Mayra Méndez, Christopher D Wood, Juan Manuel Rendon-Mancha, Daniela Silva-Ayala, Susana López, Adán Guerrero, and Carlos F Arias. Nanoscale organization of rotavirus replication machineries. *eLife*, 8:e42906, jul 2019.
- [47] Paula A. Balestrini, Martina Jabłoński, Liza J. Schiavi-Ehrenhaus, Clara I. Marín-Briggiler, Claudia Sánchez-Cárdenas, Alberto Darszon, Darío Krapf, and Mariano G. Buffone. Seeing is believing: Current methods to observe sperm acrosomal exocytosis in real time. *Molecular Reproduction and Development*, 87(12):1188–1198, 2020.
- [48] Ana Romarowski, Ángel G. Velasco Félix, Paulina Torres Rodríguez, María G. Gervasi, Xinran Xu, Guillermina M. Luque, Gastón Contreras-Jiménez, Claudia Sánchez-Cárdenas, Héctor V. Ramírez-Gómez, Diego Krapf, Pablo E. Visconti, Dario Krapf, Adán Guerrero, Alberto Darszon, and Mariano G. Buffone. Super-resolution imaging of live sperm reveals dynamic changes of the actin cytoskeleton during acrosomal exocytosis. *Journal of Cell Science*, 131(21), 11 2018. jcs218958.
- [49] Claudia Sánchez-Cárdenas, Martha Rocio Servín-Vences, Omar José, Claudia Lydia Treviño, Arturo Hernández-Cruz, and Alberto Darszon. Acrosome Reaction and Ca²⁺ Imaging in Single Human Spermatozoa: New Regulatory Roles of [Ca²⁺]_i. *Biology of Reproduction*, 91(3), 09 2014. 67, 1-13.

- [50] Songwan Jin, Peter M. Haggie, and A. S. Verkman. Single particle tracking of membrane protein diffusion in a potential: Simulation, detection, and application to confined diffusion of cfr cl-channels. *Biophysical Journal*, 93(3):1079–1088, 2007.
- [51] Chia-Lung Hsieh, Susann Spindler, Jens Ehrig, and Vahid Sandoghdar. Tracking single particles on supported lipid membranes: Multimobility diffusion and nanoscopic confinement. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(6):1545–1554, 2014. PMID: 24433014.
- [52] Zhongju Ye, Xin Wang, and Lehui Xiao. Single-particle tracking with scattering-based optical microscopy. *Analytical Chemistry*, 91(24):15327–15334, 2019. PMID: 31751513.
- [53] Francesco Pampaloni, Ulrich Berge, Anastasios Marmaras, Peter Horvath, Ruth Kroschewski, and Ernst H. K. Stelzer. Tissue-culture light sheet fluorescence microscopy (TC-LSFM) allows long-term imaging of three-dimensional cell cultures under controlled conditions. *Integrative Biology*, 6(10):988–998, 09 2014.
- [54] Norio Yamashita, Masahiko Morita, Wesley R. Legant, Bi-Chang Chen, Eric Betzig, Hideo Yokota, and Yuko Mimori-Kiyosue. Three-dimensional tracking of plus-tips by lattice light-sheet microscopy permits the quantification of microtubule growth trajectories within the mitotic apparatus. *Journal of Biomedical Optics*, 20(10):1 – 18, 2015.
- [55] Marie Held, Ilaria Santeramo, Bettina Wilm, Patricia Murray, and Raphaël Lévy. Ex vivo live cell tracking in kidney organoids using light sheet fluorescence microscopy. *PLOS ONE*, 13(7):1–20, 2018. Publisher: Public Library of Science.
- [56] Nicolas Chenouard, Ihor Smal, Fabrice de Chaumont, Martin Maška, Ivo F Sbalzarini, Yuanhao Gong, Janick Cardinale, Craig Carthel, Stefano Coraluppi, Mark Winter, Andrew R Cohen, William J Godinez, Karl Rohr, Yannis Kalaidzidis, Liang Liang, James Duncan, Hongying Shen, Yingke Xu, Klas E G Magnusson, Joakim Jaldén, Helen M Blau, Perrine Paul-Gilloteaux, Philippe Roudot, Charles Kervrann, François Waharte, Jean-Yves Tinevez, Spencer L Shorte, Joost Willemse, Katherine Celler, Gilles P van Wezel, Han-Wei Dan, Yuh-Show Tsai, Carlos Ortiz de Solórzano, Jean-Christophe Olivo-Marin, and Erik Meijering. Objective comparison of particle tracking methods. *Nature Methods*, 11(3):281–289, March 2014.
- [57] Khuloud Jaqaman, Dinah Loerke, Marcel Mettlen, Hirotaka Kuwata, Sergio Grinstein, Sandra L Schmid, and Gaudenz Danuser. Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nature Methods*, 5(8):695–702, August 2008.

- [58] R. E. Kalman. A new approach to linear filtering and prediction problems. *Journal of Basic Engineering*, 82(1):35–45, 03 1960.
- [59] Greg Welch and Gary Bishop. An introduction to the kalman filter. Technical Report 95-041, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA, 1995.
- [60] John C. Crocker and David G. Grier. Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(1):298–310, 1996.
- [61] Javier Mazzaferri, Joannie Roy, Stephane Lefrancois, and Santiago Costantino. Adaptive settings for the nearest-neighbor particle tracking algorithm. *Bioinformatics*, 31(8):1279–1285, 12 2014.
- [62] Mohak Patel, Susan E. Leggett, Alexander K. Landauer, Ian Y. Wong, and Christian Franck. Rapid, topology-based particle tracking for high-resolution measurements of large complex 3D motion fields. *Scientific Reports*, 8(1):5581, April 2018.
- [63] Niko Geldner, Valérie Dénervaud-Tendon, Derek L Hyman, Ulrike Mayer, York-Dieter Stierhof, and Joanne Chory. Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 59(1):169–178, July 2009. Edition: 2009/02/26.
- [64] Fernán Federici, Lionel Dupuy, Laurent Laplaze, Marcus Heisler, and Jim Haseloff. Integrated genetic and computation methods for in planta cytometry. *Nature Methods*, 9(5):483–485, May 2012.
- [65] Jason Otterstrom, Alvaro Castells-Garcia, Chiara Vicario, Pablo A Gomez-Garcia, Maria Pia Cosma, and Melike Lakadamyali. Super-resolution microscopy reveals how histone tail acetylation affects DNA compaction within nucleosomes in vivo. *Nucleic Acids Research*, 47(16):8470–8484, 07 2019.
- [66] Maria Aurelia Ricci, Carlo Manzo, María Filomena García-Parajo, Melike Lakadamyali, and Maria Pia Cosma. Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell*, 160(6):1145–1158, March 2015. Place: United States.
- [67] Kinga Rutowicz, Maciej Lirski, Benoît Mermaz, Gianluca Teano, Jasmin Schubert, Imen Mestiri, Magdalena A Kroteń, Tohnyui Ndinyanka Fabrice, Simon Fritz, Stefan Grob, Christoph Ringli, Lusik Cherkezyan, Fredy Barneche, Andrzej Jerzmanowski, and Célia Baroux. Linker histones are fine-scale chromatin architects modulating developmental decisions in arabidopsis. *Genome Biology*, 20:157, December 2019.

- [68] Geming Wu, Xinyan Zhao, Shuqian Luo, and Hongli Shi. Histological image segmentation using fast mean shift clustering method. *BioMedical Engineering OnLine*, 14(1):24, March 2015.
- [69] Marie N. Bongiovanni, Julien Godet, Mathew H. Horrocks, Laura Tosatto, Alexander R. Carr, David C. Wirthensohn, Rohan T. Ranasinghe, Ji-Eun Lee, Aleks Ponjavic, Joelle V. Fritz, Christopher M. Dobson, David Klenerman, and Steven F. Lee. Multi-dimensional super-resolution imaging enables surface hydrophobicity mapping. *Nature Communications*, 7(1):13544, December 2016.
- [70] Laura Teodori, Annunziata Crupi, Alessandra Costa, Alberto Diaspro, Susanne Melzer, and Attila Tarnok. Three-dimensional imaging technologies: a priority for the advancement of tissue engineering and a challenge for the imaging community. *Journal of Biophotonics*, 10(1):24–45, 2017.
- [71] Héctor H. Torres-Martínez, Paul Hernández-Herrera, Gabriel Corkidi, and Joseph G. Dubrovsky. From one cell to many: Morphogenetic field of lateral root founder cells in *arabidopsis thaliana* is built by gradual recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(34):20943–20949, 2020.
- [72] Yang Zhang, Ki-Hee Song, Biqin Dong, Janel L Davis, Guangbin Shao, Cheng Sun, and Hao F Zhang. Multicolor super-resolution imaging using spectroscopic single-molecule localization microscopy with optimal spectral dispersion. *Applied optics*, 58(9):2248–2255, March 2019.
- [73] Xingbo Shi, Minmin Li, Wenfeng Zhao, Aiye Liang, Xiaojun Liu, and Hongwei Gai. Spectral imaging superlocalization microscopy for quantum dots. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 207:308–312, 2015.
- [74] Douglas S. Richardson, Carola Gregor, Franziska R. Winter, Nicolai T. Urban, Steffen J. Sahl, Katrin I. Willig, and Stefan W. Hell. SRpHi ratiometric pH biosensors for super-resolution microscopy. *Nature Communications*, 8(1):577, September 2017.
- [75] Rachel Lee, Jacob A. Erstling, Joshua A. Hinckley, Dana V. Chapman, and Ulrich B. Wiesner. Addressing particle compositional heterogeneities in super-resolution-enhanced live-cell ratiometric pH sensing with ultrasmall fluorescent core-shell aluminosilicate nanoparticles. *Advanced Functional Materials*, n/a(n/a):2106144, 2021.
- [76] David Baddeley, David Crossman, Sabrina Rossberger, Juliette E. Cheyne, Johanna M. Montgomery, Isuru D. Jayasinghe, Christoph Cremer, Mark B. Cannell, and Christian Soeller. 4D Super-Resolution Microscopy with Conventional Fluorophores and Single Wavelength Excitation in Optically Thick Cells and Tissues. *PLOS ONE*, 6(5):1–10, May 2011. Publisher: Public Library of Science.

- [77] Hernán E. Grecco and Peter J. Verveer. Fret in cell biology: Still shining in the age of super-resolution? *ChemPhysChem*, 12(3):484–490, 2011.
- [78] Jongjin Lee, Sangjun Park, Wooyoung Kang, and Sungchul Hohng. Accelerated super-resolution imaging with FRET-PAINT. *Molecular Brain*, 10(1):63, December 2017.
- [79] Alan M. Szalai, Bruno Siarry, Jerónimo Lukin, Sebastián Giusti, Nicolás Unsain, Alfredo Cáceres, Florian Steiner, Philip Tinnefeld, Damián Refojo, Thomas M. Jovin, and Fernando D. Stefani. Super-resolution imaging of energy transfer by intensity-based sted-fret. *Nano Letters*, 21(5):2296–2303, 2021. PMID: 33621102.
- [80] Michael K. Ng, Huanfeng Shen, Edmund Y. Lam, and Liangpei Zhang. A Total Variation Regularization Based Super-Resolution Reconstruction Algorithm for Digital Video. *EURASIP Journal on Advances in Signal Processing*, 2007(1):074585, December 2007.
- [81] Amol Singh and Robert S Ohgami. Super-Resolution Digital Pathology Image Processing of Bone Marrow Aspirate and Cytology Smears and Tissue Sections. *Journal of pathology informatics*, 9:48–48, December 2018. Publisher: Medknow Publications & Media Pvt Ltd.
- [82] Emmanuel J. Candès and Carlos Fernandez-Granda. Super-Resolution from Noisy Data. *Journal of Fourier Analysis and Applications*, 19(6):1229–1254, December 2013.
- [83] Yaniv Romano, John Isidoro, and Peyman Milanfar. Rair: Rapid and accurate image super resolution. *IEEE Transactions on Computational Imaging*, 3(1):110–125, 2017.
- [84] Wei Wu and Chenglin Zheng. Single image super-resolution using self-similarity and generalized nonlocal mean. In *2013 IEEE International Conference of IEEE Region 10 (TENCON 2013)*, pages 1–4, 2013.
- [85] Soraya Zenati and Abdelhane Boukrouche. Deconvolution problem 1d and 2d cases solution. In *2008 5th International Symposium on Mechatronics and Its Applications*, pages 1–6, 2008.
- [86] Hanyu Hong and Yu Shi. Fast deconvolution for motion blur along the blurring paths. *Canadian Journal of Electrical and Computer Engineering*, 40(4):266–274, 2017.
- [87] Ron O. Dror, Morten Jensen, David W. Borhani, and David E. Shaw. Exploring atomic resolution physiology on a femtosecond to millisecond timescale using molecular dynamics simulations. *Journal of General Physiology*, 135(6):555–562, 05 2010.

- [88] Orly B. Tarun, Christof Hanneschläger, Peter Pohl, and Sylvie Roke. Label-free and charge-sensitive dynamic imaging of lipid membrane hydration on millisecond time scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(16):4081–4086, 2018. Publisher: National Academy of Sciences eprint: <https://www.pnas.org/content/115/16/4081.full.pdf>.
- [89] Jagadish Sankaran, Harikrushnan Balasubramanian, Wai Hoh Tang, Xue Wen Ng, Adrian Röllin, and Thorsten Wohland. Simultaneous spatiotemporal super-resolution and multi-parametric fluorescence microscopy. *Nature Communications*, 12(1):1748, March 2021.
- [90] Ying-Hsiu Lin, Wei-Lin Chang, and Chia-Lung Hsieh. Shot-noise limited localization of single 20 nm gold particles with nanometer spatial precision within microseconds. *Opt. Express*, 22(8):9159–9170, Apr 2014.
- [91] T.-H. Chen, J. T. Ault, H. A. Stone, and C. B. Arnold. High-speed axial-scanning wide-field microscopy for volumetric particle tracking velocimetry. *Experiments in Fluids*, 58(5):41, April 2017.
- [92] Zachary J. Glover, Carsten Ersch, Ulf Andersen, Melvin J. Holmes, Megan J. Povey, Jonathan R. Brewer, and Adam Cohen Simonsen. Super-resolution microscopy and empirically validated autocorrelation image analysis discriminates microstructures of dairy derived gels. *Food Hydrocolloids*, 90:62–71, 2019.
- [93] Jorge E. Fiscina, Pierre Fromholz, Rainer Sattler, and Christian Wagner. Wide band Fresnel super-resolution applied to capillary breakup of viscoelastic fluids. *Experiments in Fluids*, 54(11):1611, October 2013.
- [94] Eric Betzig. Nobel lecture: Single molecules, cells, and super-resolution optics. *Rev. Mod. Phys.*, 87:1153–1168, Oct 2015.
- [95] Michihiro Igarashi, Motohiro Nozumi, Ling-Gang Wu, Francesca Cella Zanacchi, István Katona, László Barna, Pingyong Xu, Mingshu Zhang, Fudong Xue, and Edward Boyden. New observations in neuroscience using superresolution microscopy. *Journal of Neuroscience*, 38(44):9459–9467, 2018. Publisher: Society for Neuroscience eprint: <https://www.jneurosci.org/content/38/44/9459.full.pdf>.
- [96] Viktoria Liss, Britta Barlag, Monika Nietschke, and Michael Hensel. Self-labelling enzymes as universal tags for fluorescence microscopy, super-resolution microscopy and electron microscopy. *Scientific Reports*, 5(1):17740, December 2015.
- [97] Michal Wojcik, Margaret Hauser, Wan Li, Seonah Moon, and Ke Xu. Graphene-enabled electron microscopy and correlated super-resolution microscopy of wet cells. *Nature Communications*, 6(1):7384, June 2015.

- [98] Cori K. Cahoon, Zulin Yu, Yongfu Wang, Fengli Guo, Jay R. Unruh, Brian D. Slaughter, and R. Scott Hawley. Superresolution expansion microscopy reveals the three-dimensional organization of the *Drosophila* synaptonemal complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(33):E6857–E6866, 2017. Publisher: National Academy of Sciences. eprint: <https://www.pnas.org/content/114/33/E6857.full.pdf>.
- [99] Davide Gambarotto, Fabian U. Zwettler, Maeva Le Guennec, Marketa Schmidt-Cernohorska, Denis Fortun, Susanne Borgers, Jörn Heine, Jan-Gero Schloetel, Matthias Reuss, Michael Unser, Edward S. Boyden, Markus Sauer, Virginie Hamel, and Paul Guichard. Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (U-ExM). *Nature Methods*, 16(1):71–74, January 2019.
- [100] Jeongmin Kim, Michal Wojcik, Yuan Wang, Seonah Moon, Emilia A. Zin, Nadia Marnani, Zachary L. Newman, John G. Flannery, Ke Xu, and Xiang Zhang. Oblique-plane single-molecule localization microscopy for tissues and small intact animals. *Nature Methods*, 16(9):853–857, September 2019.
- [101] Maximilian Hoffmann and Benjamin Judkewitz. Diffractive oblique plane microscopy. *Optica*, 6(9):1166–1170, Sep 2019.
- [102] Jan Huisken and Didier Y. R. Stainier. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development*, 136(12):1963–1975, 06 2009.
- [103] Ying S. Hu, Maxwell Zimmerley, Yu Li, Robin Watters, and Hu Cang. Single-molecule super-resolution light-sheet microscopy. *ChemPhysChem*, 15(4):577–586, 2014.
- [104] Puschmann, K. G. and Kneer, F. On super-resolution in astronomical imaging. *A&A*, 436(1):373–378, 2005.
- [105] Biao Xu, Zhiqiang Wang, and Jinping He. Super-resolution imaging via aperture modulation and intensity extrapolation. *Scientific Reports*, 8(1):15216, October 2018.
- [106] Rui GUO, Xiaoping SHI, Yi ZHU, and Ting YU. Super-resolution reconstruction of astronomical images using time-scale adaptive normalized convolution. *Chinese Journal of Aeronautics*, 31(8):1752–1763, 2018.
- [107] Victoria Pando, Pavel Isa, Carlos F. Arias, and Susana López. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology*, 295(1):190–200, 2002.
- [108] Michael Hirsch, Richard J. Wareham, Marisa L. Martin-Fernandez, Michael P. Hobson, and Daniel J. Rolfe. A stochastic model for electron multiplication

charge-coupled devices – from theory to practice. *PLOS ONE*, 8(1):1–13, 01 2013.

Apéndice

Apéndice A

Condiciones experimentales

Reactivos

Todos los reactivos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO), excepto que se indique lo contrario. SiR-actin fue obtenida de Cytoskeleton (Denver, CO) y FM4-64 fue adquirido de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA).

Reactivos de AFM. La proteína Acidaminococcus sp dCas12a se expresó en Escherichia coli BL2 y se purificó mediante cromatografía en columnas Ni-NTA (Cytiva), HiTrap SP HP (Cytiva) y HiLoad Superdex 200 16/60 (Cytiva) de acuerdo con las recomendaciones (1) y se determinó la pureza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. El ARN guía de 55 nt (ARNg) se transcribió in vitro y luego se purificó mediante el método de TRIzol (Invitrogen) (2) y se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de urea desnaturizante. En este estudio se utilizó la siguiente lista de anticuerpos:

- Anticuerpo monoclonal de ratón VP4 (2G4) (Harry B. Greenberg, Universidad de Stanford. PMID: 2431540),
- Anticuerpo monoclonal de ratón VP7 (M60) (Harry B. Greenberg, Universidad de Stanford. PMID: 2431540),
- Anticuerpo monoclonal de ratón VP7 (159) (Harry B. Greenberg, Universidad de Stanford. PMID: 2431540),
- Anticuerpo policlonal de ratón NSP2 (fabricado por nuestro laboratorio, PMID: 9645203; RRID: AB_2802096),
- Anticuerpo policlonal de conejo NSP2 (fabricado por nuestro laboratorio, PMID: 9645203; RRID: AB_2802097),

- Anticuerpo policlonal de conejo NSP4 (fabricado por nuestro laboratorio, PMID: 18385250; RRID: AB_2802094), ítem Anticuerpo policlonal de conejo NSP5 (fabricado por nuestro laboratorio, PMID: 9645203; RRID: AB_2802098),
- Cabra anti-conejo Alexa 568 (Invitrogen, A-11011) y
- Cabra anti-ratón Alexa 488 (Invitrogen, A-10680).

Animales

Se utilizaron ratones machos maduros CD1 (de 10 a 12 semanas de edad). Los animales se mantuvieron a 23°C con un ciclo de 12 horas de luz a 12 horas de oscuridad. Los procedimientos experimentales con animales fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Expresión y purificación de proteínas CRISPR / Cas

DCas12a con nucleasa muerta de *Acidaminococcus* sp. fusionada a una etiqueta 6His-SUMO N-terminal se expresó en *Escherichia coli* BL21. Las células se cultivaron en caldo Luria-Bertani a 37°C y se transfirieron a 12°C cuando la DO600 alcanzó 0,8. Después de 1h, se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Después de 24h de crecimiento, se recogieron los sedimentos celulares mediante centrifugación y se almacenaron a -70°C hasta la purificación de la proteína.

El sedimento se descongeló en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 250 mM, imidazol 10 mM) y se sonicó durante 6 minutos en intervalos de 5 s ON-25s OFF. A esto le siguió la centrifugación a 35.000 ga 4°C durante 35 min y la filtración utilizando membranas con un tamaño de poro de 0,22 μ m. El extracto libre de células se inyectó en una columna de Ni-NTA (Cytiva) y se eluyó con tampón de elución Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 1 M, imidazol 250 mM. La proteína se mezcló con la proteasa SUMO y se dializó durante la noche a 4°C en tampón de diálisis (tampón fosfato 50 mM pH 6,0, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol al 10 %, DTT 2 mM) para eliminar la etiqueta 6His-SUMO. La proteína escindida se inyectó en una columna de intercambio catiónico HiTrap SP HP (Cytiva) y se eluyó con un gradiente lineal de tampón IEX de 0 a 50 % (HEPES-KOH 20 mM pH 7,2, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol al 10 %, DTT 2 mM). La proteína se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna HiLoadSuperdex 200 pg 16/60 (Cytiva) en tampón de almacenamiento (HEPES-KOH 20 mM pH 7,5, KCl 500 mM, glicerol al 10 %) y las alícuotas se almacenaron a -70°C hasta su uso. La pureza y la identidad de dCas12a se confirmaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia Western contra la región 6xHis en dCas12a.

Preparación nanoreglas CRISPR/dCas12a

Primero, se formó el complejo de ribonucleoproteína CRISPR/dCas12a. En un tubo de microcentrífuga de 0,6 ml, se añadieron los siguientes reactivos (concentración final): tampón de acción CRISPR 1X (TRIS HCl 200 mM, NaCl 500 mM, DTT 5 mM) y dCas12a 20 nM. El gRNA se precalentó a 90°C durante 1 minuto y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Tras enfriar el ARNg, se añadió al dCas12a hasta una concentración final de 30 nM. Los componentes CRISPR/Cas se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Cuando se formó el complejo, se añadió el dsDNA diana y el microtubo se incubó a 37°C durante 1 hora para que el complejo CRISPR/Cas se una a las secuencias diana en el dsDNA y así forme el nanoruler CRISPR/dCas12a.

Preparación de las muestras de nanoreglas CRISPR/d-Cas12

El volumen de trabajo de la muestra fue delimitado por una cinta perforada de doble cara unida a un cubreobjetos y un portaobjetos en cada lado. Los siguientes reactivos se prepararon en un microtubo independiente: CRISPR/dCas12a (descrito en la sección anterior), 20 µg/mL Hoechst33342 y 5 nM PS3 (Schueder et al., 2019) como el ADNss fluorescente (5' -TCCTCCC-3'-ATTO 647N, Integrated DNA Technologies') y clasificado con agua. La mezcla se transfirió a la cinta perforada de doble cara en el cubreobjetos y se cubrió con el portaobjetos. La tabla A.1 muestra la secuencia de ADN empleada.

Expresión y purificación de proteínas CRISPR-Cas

DCas12a con nucleasa muerta de *Acidaminococcus* sp. fusionada a una etiqueta 6His-SUMO N-terminal se expresó en *Escherichia coli* BL21. Las células se cultivaron en caldo Luria-Bertani a 37°C y se transfirieron a 12°C cuando la OD₆₀₀ alcanzó 0,8. Después de 1 h, se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Después de 24 h de crecimiento, se recogieron los sedimentos celulares mediante centrifugación y se almacenaron a -70°C hasta la purificación de la proteína.

El sedimento se descongeló en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 250 mM, imidazol 10 mM) y se sonicó durante 6 minutos en intervalos de 5 s ON-25 s OFF. Esto fue seguido por centrifugación a 35.000g a 4°C durante 35 min y filtración usando membranas con un tamaño de poro de 0,22 µm. El extracto libre de células se inyectó en una columna de Ni-NTA (Cytiva) y se eluyó con tampón de elución

CTCGAGAAGAGAGAAGCTGAAGCTGGTTGTGGTCTCGGTGCTGGTGCACCCGG
 TGAGCCAGGTAACCCAGGATCTCCTGGTAACCAAGGACAGCCCGGTAACAAGGG
 TTCTCCAGGTAATCCAGGTCAACCAGGAAACGAAGGTCAACCTGGTCAACCTGGT
 CAGAACGGACAACCTGGTGAGCCAGGTTCCAACGGTCCACAAGGTTCTCAGGGT
 AACCTGGAAAGAATGGTCAACCTGGATCCCCAGGTTTACAAGGCTCTCCAGGT
 AACCAAGGTTCCCCTGGTCAGCCAGGTAA**CCCTGGTCAACCAGGTGAACAAGG**
TAACCAGGAAACCAGGGTCCAGCCGGTGAGCCAGGTAACCCAGGATCTCCTGG
 TAACCAAGGACAGCCCGGTAACAAGGGTTCTCCAGGTAATCCAGGTCAACCAGG
 AAACGAAGGTCAACCTGGTCAACCTGGTCAGAACGGACAACCTGGTGAGCCAGG
 TTCCAACGGTCCACAAGGTTCTCAGGGTAACCTGGAAAGAATGGTCAACCTGG
 ATCCCAGGTTTACAAGGCTCTCCAGGTAACCAAGGTTCCCCTGGTCAGCCAGG
 TAA**CCCTGGTCAACCAGGTGAACAAGGTAA**CCAGGAAACCAGGGTCCAGCCGG
 TGAGCCAGGTAACCCAGGATCTCCTGGTAACCAAGGACAGCCCGGTAACAAGGG
 TTCTCCAGGTAATCCAGGTCAACCAGGAAACGAAGGTCAACCTGGTCAACCTGG
 TCAGAACGGACAACCTGGTGAGCCAGGTTCCAACGGTCCACAAGGTTCTCAGG
 GTAACCCTGGAAAGAATGGTCAACCTGGATCCCCAGGTTTACAAGGCTCTCCAG
 GTAACCAAGGTTCCCCTGGTCAGCCAGGTAA**CCCTGGTCAACCAGGTGAACAAG**
GTACCAGGAAACCAGGGTCCAGCCGGTGAGCCAGGTAACCCAGGATCTCCT
 GGTAACCAAGGACAGCCCGGTAACAAGGGTTCTCCAGGTAATCCAGGTCAACCA
 GGAAACGAAGGTCAACCTGGTCAACCTGGTCAGAACGGACAACCTGGTGAGCC
 AGGTTCCAACGGTCCACAAGGTTCTCAGGGTAACCTGGAAAGAATGGTCAACC
 TGGATCCCAGGTTTACAAGGCTCTCCAGGTAACCAAGGTTCCCCTGGTCAGCC
 AGGTAA**CCCTGGTCAACCAGGTGAACAAGGTAA**CCAGCCAGGAAACCAGGGTC
 CAGCCGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGTCAAGGAGCCGGTGCTGGAGC
 CGGCCAAGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGTCAAGGAGCCGGTGCTGGAGCCGGCCAAG
 CAAGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGTCAAGGAGCCGGTGCTGGAGCCGGCCAAG
 GTGCTGGTGCTGGTGCTGGTCAAGGAGCCGGTGCTGGAGCCGGCCAAGGTGCT
 GGTGCTGGTGCTGGTCAAGGAGCCGGTGCTGGAGCCGGCCAAGGTGCTAAGA
 AAAAGAAGAAAAAGAAGAAGAAGAAAAAGAAGGGTGCCTAAG.

Tabla A.1: Secuencia (5'-3') de la plantilla de dsDNA y los sitios de unión mediante el sistema de nanoreglas CRISPR-dCas12. El color rojo indica PAM y el rosa la secuencia de dirección de la proteína dCas12a.

Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 1 M, imidazol 250 mM. La proteína se mezcló con la proteasa SUMO y se dializó durante la noche a 4°C en tampón de diálisis (tampón fosfato 50 mM pH 6,0, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol al 10 %, DTT 2 mM) para eliminar el 6Etiqueta His-SUMO. La proteína escindida se inyectó en una columna de intercambio catiónico HiTrap SP HP (Cytiva) y se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 50 % de tampón IEX (HEPES-KOH 20 mM pH 7,2, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, 10 % de glicerol, DTT 2 mM). La proteína se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna HiLoad Superdex 200 pg 16/60 (Cytiva) en tampón de almacenamiento (HEPES-KOH 20 mM, pH 7,5, KCl 500 mM, glicerol al 10 %) y las alícuotas se almacenaron a -70°C hasta su uso. La pureza y la identidad de dCas12a se confirmaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia Western contra 6xHis en dCas12a.

Producción de crRNAs

El crRNA usado en experimentos de microscopía de fuerza atómica (AFM) fue producido por transcripción *in vitro* de moldes de ADN previamente amplificados por PCR. Las plantillas se produjeron utilizando dos oligos autocomplementarios:

Fw 5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGTAATTTCTACTCTTGATAGAT-3' y

Rv 5'-CCCTGGTCAACCAGGTGAACAAGGATCTACAAGAGTAGAAATT-3'

(comprado de IDT). La transcripción *in vitro* y la purificación de crRNA se realizaron utilizando HiScribe T7 (NEB) y RNA Cleanup kits (NEB), respectivamente.

El conjunto de crRNA para cortinas de ADN se produjo de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se obtuvieron moldes de ADN parcialmente bicatenario para la transcripción *in vitro* hibridando un oligo de avance largo de 24 nt que codifica el promotor de la ARN polimerasa de T7:

5' GAAATTAATACGACTCACTATAGG,

con un grupo de cinco oligos inversos de 68 nt de largo:

5'-AUGAUGUUCUGCUGGAUAUGCACU-3',

5'-CCUGACACCGGACGGAAAGCUGAC-3',

5'-AAUGUCGGCUAAUCGAUUUGGCCA-3',

5'-GCUAGCAAUUAUGUGCAUCGAUU-3' and

5'-AUGAACGCAAUAUUCACAAGCAAU-3'

(comprado de IDT), que codifica la secuencia de crRNA y la región complementaria al promotor T7. Los oligonucleótidos directo e inverso se hibridaron a una relación de 1,5: 1 (Fw: Rv) en Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, tampón EDTA 1 mM,

se incubaron a 75°C durante 5 minutos y se enfriaron a 25°C durante 25 minutos. Se utilizó el kit HiScribe T7 para la transcripción in vitro y el conjunto de crRNA se purificó con TRizol (Ambion).

Ensayo de cortina de ADN

Se mezcló ADN del bacteriófago λ (λ ADN) (NEB) con oligos biotinilados complementarios a los extremos cohesivos del ADN λ en tampón de reacción para la ligasa de ADN T4 (NEB), incubados a 70°C durante 15 minutos y se enfrió a 15°C durante 2 h. Se utilizó ADN ligasa de T4 para la ligación durante la noche a temperatura ambiente. Después de la inactivación de la ligasa con NaCl 2 M, el ADN biotinilado se purificó en una columna de exclusión por tamaño Sephacryl S-1000 (GE Healthcare).

La celda de flujo se pasivó con una solución de lípidos (1.954 % DOPC, 0.04 % DOPE-mPEG2k y 0.006 % DOPE-biotina) en tampón (Tris-HCL 10 mM pH 8, NaCl 100 mM) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La celda de flujo se lavó con tampón BSA (Tris-HCl 40 mM pH 8, MgCl₂ 2 mM, BSA 0,2mg/ml) y se incubó durante 10 minutos. El ADN biotinilado en tampón BSA se inyectó en la celda de flujo y se lavó el ADN no anclado. Se usó tampón BSA suplementado con NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 2 mM para la formación de imágenes.

Las partículas de ribonucleoproteína se prepararon mezclando dCas12a con el conjunto de crRNA a una proporción molar de 1:10 en tampón (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol al 2 %, DTT 2 mM) a 37°C durante 30 minutos. El complejo (10 nM) se inyectó en la celda de flujo para la unión del ADN durante 30 minutos a temperatura ambiente. El marcaje de dCas12a se logró con anticuerpos anti-FLAG conjugados con puntos cuánticos (QD705). C-S10-B se marcó con maleimida-Alexa488 en una única cisteína N-terminal.

Las imágenes se adquirieron a 60X con un microscopio Nikon Ti-E invertido con láser de excitación de 488 nm. La emisión se dividió con un divisor de haz dicróico de 638 nm (Chroma) y se capturó con dos cámaras EM-CCD (Andor iXon DU897). Las imágenes se procesaron con FIJI.

Microscopía de fuerza atómica

La partícula de ribonucleoproteína (RNP) se ensambló a partir de dCas12a y crRNA (relación molar 1: 1,5) en tampón AFM (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, MgCl₂ 15 mM, DTT 1 mM) a 37°C durante 20 minutos. La plantilla de ADN (1500 pb) con cuatro sitios diana dCas12a se añadió a la mezcla en una proporción molar de 40: 1 (RNP: ADN) y se incubó durante 1 a 25°C. La muestra se diluyó 5 veces hasta

una concentración final de ADN 1 nM y se depositó sobre una mica recién escindida durante 10 minutos, seguido de enjuague con 0,5 ml de agua mili-Q filtrada y secado al aire.

Las imágenes se adquirieron con un microscopio de fuerza atómica (NanoScope V, Bruker) en modo ScanAsyst-Air a temperatura ambiente y 1.024 muestras/línea. Las imágenes se procesaron con el software de análisis NanoScope v1.89 (figura A.1).

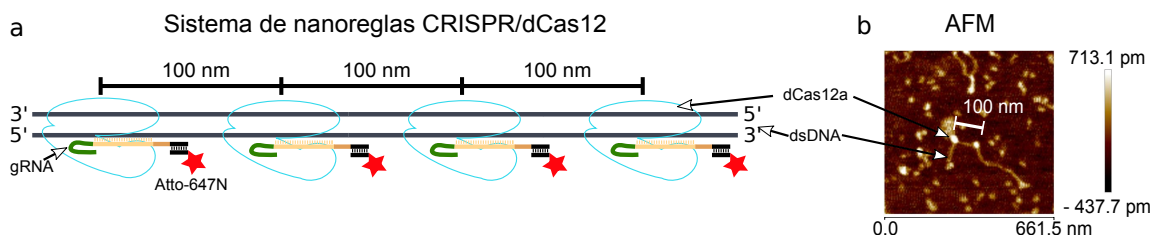


Figura A.1: Sistema nanoruler CRISPR-Cas, que consta de un ADN de doble hebra (dsDNA) de 1537 pb con cuatro sitios de unión para dCas12a, separados regularmente en longitudes de 297 pb (100 nm) sobre la cadena de dsDNA. Para validar el sistema, primero se obtuvieron imágenes del complejo proteína-ADN a través de microscopía de fuerza atómica (AFM) en condiciones secas y se midió la distancia entre cada complejo dCas12a. a) Representación gráfica del sistema nanoruler CRISPR-Paint. b) Nanoregla CRISPR-Paint visualizado por microscopía de fuerza atómica.

Imágenes de muestra nanoregla de GATTA-PAINT y CRISPR/dCas12a

La nanoregla GATTA-PAINT 40 RG se proporcionó como un único portaobjetos listo para la obtención de imágenes (nanotecnologías de ADN GATTAquant). Tiene una separación de 40 nm entre tres sitios fluoróforos cada uno (ATTO 542/ATTO 655) y 80 nm entre los más lejanos. La formación de imágenes se realizó en un microscopio invertido Olympus IX-81 con iluminación de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF) con una profundidad de penetración de 200 nm. La imagen fue generada por la cámara EMCCD iXon 897. Modelo No. DU-879-CS0-# BV. Se adquirió un conjunto de 300 fotogramas con un tiempo de exposición de 50 ms, láser de excitación de 488 y 561 nm con potencia láser completa (23,1 mW) y un tamaño de pixel de 160 nm. Por *MSSR* solo se analizaron los primeros 100 fotogramas. La muestra del nanoruler CRISPR/dCas12a se visualizó en la misma configuración que el nanoruler GATTA-PAINT 40RG, con la diferencia de 20 ms como tiempo de adquisición y potencia láser. Por *MSSR*, se utilizó un conjunto de 100 cuadros en 100x100 pixeles para el análisis de imágenes.

PSFcheck. Microscopy with nanoimager

PSFcheck fue empleado como patrón de fluorescencia inmóvil, como muestra de calibración (<https://www.psfcheck.com>). Los patrones fluorescentes se fabricaron utilizando escritura láser directa a través de pulsos ultracortos de infrarrojos, los cuales crean regiones de autofluorescencia en un polímero de mezcla epoxi de dos partes intercalado entre un cubreobjetos y un portaobjetos del microscopio [42].

La muestra emite fluorescencia en un espectro de emisión de banda relativamente ancha, lo que permite al experimentador utilizar diferentes conjuntos de filtros para la adquisición en diferentes canales de fluorescencia. Su espectro de excitación varía de 470 a 610 nm (pico 495) y, en general, la banda de detección comienza en una longitud de onda 30 nm más larga que la longitud de onda de excitación.

Uno de los patrones consiste en una matriz 3D de pequeñas características de la carcasa de 1 micrómetro de diámetro. Cada característica de la cáscara tenía una separación de 10 micrómetros de otras características pequeñas dentro del mismo plano 2D; y la matriz 3D constaba de 3 de estas capas separadas 10 micrómetros entre sí. El grosor fluorescente de una carcasa es pequeño en comparación con el PSF, por lo que se calculó que el FWHM promedio en varias características era de 208 nm en un microscopio SIM.

Se obtuvieron las imágenes de este patrón usando el NanoImager-S (modo TIRF) equipado con un objetivo de inmersión en aceite 100X, 1.4 NA. La muestra de PSFcheck se excitó con láser de 561 nm y la fluorescencia emitida se adquirió en el Filtro de Emisión 2: Banda 1 575-616.5 acoplado a un sCMOS Hamamatsu Orca Flash 4.0 V2. El tiempo de adquisición fue de 33 ms.

Infección e inmunofluorescencia de células de rotavirus

El cultivo celular y la infección se realizaron como se describió anteriormente en [46]. Brevemente, las células MA014 (American Type Culture Collection; ATCC: CRL-2378.1; RRID: CVCL_3846) cultivadas en cubreobjetos de vidrio se infectaron con rotavirus RRV (obtenido de Harry B. Greenberg, Stanford University) en una multiplicidad de infección (MOI) de 1 como se describió anteriormente [107].

Configuración óptica para visualización y reconstrucción de imágenes de maquinarias de replicación de rotavirus por *MSSR*

Todas las mediciones de imágenes para las reconstrucciones se realizaron en una configuración de microscopio invertido Olympus IX-81 para excitación de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF) (Olympus, iluminador cellTIRFTM). El ángulo crítico se estableció de manera que el campo de evanescencia tuviera una profundidad de penetración de 200 nanómetros (software Xcellence v1.2, solución de imágenes blandas Olympus GMBH). Las muestras se iluminaron continuamente usando fuentes de excitación dependiendo del fluoróforo en uso. Los tintes Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 568 se excitaron con un láser de estado sólido bombeado por diodos de 488 nm o 568 nm, respectivamente. La selección del haz y la modulación de las intensidades del láser se controlaron mediante el software Xcellence v.1.2. Se utilizó un conjunto completo de cubos de láser multibanda para discriminar las fuentes de luz seleccionadas (LF 405/488/561/635 A-OMF, Bright Line; Semrock). La fluorescencia se recogió utilizando una lente de objetivo de inmersión en aceite Olympus UApo N 100x = 1: 49 de apertura numérica, con una lente de aumento intermedio adicional de 1,6x. Todas las películas se grabaron en una región de 128×128 píxeles de una cámara de dispositivo acoplado de carga multiplicadora de electrones (EMCCD) (iXon 897, modelo No: DU-897E-CS0-#BV; Andor) a 100 nm por píxel, y dentro de un intervalo de 50 ms (100 imágenes por excitación fluorescente). Para la reconstrucción de la imagen por *MSSR*, la amplificación (AMP en el complemento) de la imagen se estableció en 5, el tamaño del PSF en píxeles (PSF en el complemento) se estableció en 3 y el orden (Orden en el complemento) se estableció en 1 para todas las imágenes. Además, se utilizó la opción de cálculo paralelo para la reconstrucción de una sola imagen y para el análisis temporal de 100 imágenes utilizando la opción Mean.

Imágenes en vivo de la exocitosis acrosomal del espermatozoide y la dinámica de la F-actina

El medio no capacitante (NC) utilizado fue un Toyoda-Yokoyama-Hosi modificado (TYH modificado) que contiene 119,3 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 1,71 mM de CaCl₂·2H₂O, 1,2 mM de KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄·7H₂O, 0,51 mM de sodio piruvato, glucosa 5,56 mM, HEPES 20 mM y gentamicina 10 µg/ml. Para las condiciones de capacitación se añadieron (CAP) NaHCO₃ 15 mM y BSA 5 mg/ml.

Los animales se sacrificaron y se recogió espermatozoide de ratón del epidídimo de la cola. Ambos epidídimos de la cola se colocaron en 500 µl de NC. Después de

15 minutos de incubación a 37°C, se extrajo el epidídimo. Los espermatozoides se preincubaron durante 10 minutos en presencia de SiR-actina 100 nM en NC. Una vez cargados, los espermatozoides se incubaron durante otros 60 minutos en CAP, la concentración de SiR-actina fue de 100 nM durante todo el experimento.

Los espermatozoides se inmovilizaron en cubreobjetos recubiertos con concanavalina-A (1mg /ml). A continuación, la cámara se llenó con medio de grabación (NC) que contenía SiR-actina 100 nM y FM4-64 0,5 μ M. Se obtuvieron cien imágenes cada 30 segundos durante 20 minutos utilizando el Oxford Nanolmager, ONI (Universidad de Oxford). Para la excitación de SiR-actina, se utilizó un láser de 640 nm y para la excitación de FM4-64 se utilizó un láser de 561 nm.

Plantas y condiciones de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se esterilizaron en la superficie, se germinaron y se cultivaron en medio 0.2 \times Murashigue y Skoog (preparado en base al medio Linsmaier y Skoog L477; Phyto Technology Laboratories, Lenexa, KS, EE. UU.), PH 5.7, suplementado con vitaminas (0,1mg l⁻¹ piridoxina, 0,1 mg l⁻¹ ácido nicotínico), sacarosa al 1 % y agar al 0,8 %. Las plantas se cultivaron en una cámara a 21°C, fotoperiodo claro/oscuras de 16/8 h y una intensidad de luz de 105 μ mol fotones m⁻²s⁻¹.

Las imágenes confocales de la doble línea transgénica, un F1 de un cruce entre plasmalemma pUBQ10 :: NPSN12-YFP [30] y líneas marcadoras p35S: H2B: RFP [40] nucleares, se obtuvieron con un microscopio Zeiss Axiovert 200M equipado con un C- APO \times 63, objetivo 1.2 NA (Oberkochen, Alemania) y un sistema confocal acoplado con una fuente láser de 488 nm, un cubo de filtro con filtros de paso-banda de 525/45 nm y 630/92 nm para emisión de proteína fluorescente amarilla y roja, respectivamente, y una etapa XY de recorrido de motor lineal y una etapa piezoeléctrica de eje Z con controladores (Thorlabs, Inc. Newton, Nueva Jersey, EE. UU.). Se empleó un tamaño de píxel XY de 404 nm y el tamaño de paso Z de 500 nm. La imagen final en la Fig. 5.18a-c es de una proyección en Z de diez cortes con el modo de cortes SUM y el FIJI LUT usado para los canales rojo y verde fueron “Cyan Hot” y “Magenta”, respectivamente.

Una línea marcadora nuclear, p35S: H2B: RFP, fue fotografiada con un microscopio confocal Olympus FV1000-IX81 invertido equipado con un objetivo LUMFLN $times$ 60, 1.3 NA S. El láser de 543 nm se utilizó para excitar RFP y la luz emitida se filtró con BA560-660. Se empleó un tamaño de píxel XY sobremuestreado de 41 nm y el tamaño de paso Z de 100 nm. La imagen final en la Figura 5.18d fue hecha por una proyección Z de 86 cortes con el modo de intensidad MAX y

el LUT usado fue “Royal” de FIJI [90].

Se realizaron imágenes de microscopía de iluminación de plano selectivo (*SPIM*) de las células de la raíz de *A. thaliana* sobre una raíz primaria transgénica que expresa p35s: H2B-R con un sistema SPIM interno inspirado en el proyecto OpenSPIM [<https://doi.org/10.1038/nmeth.2507>], con algunas modificaciones de configuración del diseño original. Brevemente, la ruta de iluminación consiste en un combinador láser C-flex que proporciona fuentes de excitación láser a 405, 488, 561, 638 nm (Hubner Photonics, Cobolt Series 01-06, DPL para 561 y MDL para 405,488,638), que está acoplado al Óptica SPIM a través de una única guía láser multimodo (Fibra óptica con salida FC-APC). La luz láser se enfoca en un plano horizontal con forma de lente cilíndrica (Thorlabs ACY254-050-A, $f = 50,0 \text{ m} \pm 1 \%$, $\emptyset 25,4 \text{ mm}$, revestimiento AR: 350 - 700 nm). El plano focal de la lente cilíndrica se obtiene mediante un telescopio en el plano focal posterior del objetivo de iluminación (Olympus UMPLFLN10XW, inmersión en agua 10X, NA = 0,3 mm WD = 3,5 mm). La hoja de luz de excitación está confinada dentro del área de imagen por una hendidura (Thorlabs VA100 / M, hendiduras mecánicas ajustables, rosca interna = 2,4 mm), que se coloca en el centro del telescopio. La hoja de luz resultante tiene una cintura de haz de aproximadamente 3 μm en el plano focal del objetivo de iluminación. La unidad de detección consta de un objetivo de inmersión en agua 20X (Olympus UMPLFLN20XW, NA = 0,5 mm WD = 3,5 mm), una lente de tubo ($\emptyset 60 \text{ mm} \times 104 \text{ mm}$), un juego de filtros de emisión de paso de banda múltiple (Semrock, FF01-446 / 523 / 600 / 677-25 BrightLine, $\emptyset 25 \text{ mm} \times 3,5 \text{ mm}$) y una cámara sCMOS con 82

Microscopía confocal de barrido láser

La obtención de imágenes de la línea transgénica doble, F1 de un cruce entre plasmalema pUBQ10 :: NPSN12-YFP [63] y líneas marcadoras nucleares p35S: H2B: RFP [64], se realizó con un microscopio Zeiss Axiovert 200M equipado con un Objetivo C-APO $\times 63$, 1.2NA W (Oberkochen, Alemania) y un sistema confocal acoplado con una fuente láser de 488 nm, un cubo de filtro con filtros de paso de banda de 525/45 nm y 630/92 nm para la emisión de proteínas fluorescentes amarillas y rojas, respectivamente, y una etapa XY de recorrido de motor lineal y una etapa piezoeléctrica del eje Z con controladores (Thorlabs, Inc. Newton, Nueva Jersey, EE. UU.). Se implementaron el tamaño de pixel XY de 404 nm y el tamaño de paso Z de 500 nm. La imagen final en la Fig. 7 a, byc fue hecha por una proyección Z de diez cortes con el modo SUM cortes y los LUT de FIJI usados para los canales rojo y verde fueron “Cyan Hot” y “Magenta”, respectivamente.

Para mejorar la resolución de la señal de Histona H2B: RFP, se obtuvieron imágenes de una línea marcadora nuclear, p35S: H2B: RFP, con un microscopio confocal invertido Olympus FV1000-IX81 equipado con un objetivo LUMFLN $\times 60$,

1.3NA S. El láser de 543 nm se utilizó para excitar RFP y la luz emitida se filtró con BA560-660. Se implementaron el tamaño de pixel XY de 41 nm y el tamaño de paso Z de 100 nm. La imagen final en la Figura 7d fue hecha por una proyección Z de 86 cortes con el modo de intensidad MAX y el LUT usado fue "Royal" de FIJI.

Apéndice B

Interpolación de imágenes

La operación de interpolación aplicada a imágenes digitales puede tener muchos objetivos y aplicaciones, en este trabajo sólo se va referir al caso que se aumenta el tamaño de la imagen. La meta final es variar las dimensiones de la imagen de tal forma que la imagen resultante sea lo más parecido a la original. Así, cuando se aumenta el tamaño de una imagen discreta, los pixeles originales se complementan con nuevos pixeles interpolados. A continuación se describen los métodos de interpolación más utilizados en la literatura.

Interpolación vecino mas cercano

Este es el método más básico y con menos costo computacional, en el que sólo se tiene en cuenta el pixel más cercano de la imagen original al interpolado. A cada uno de los pixeles interpolados se le asigna el valor de su pixel vecino más cercano sin tener en cuenta los valores de pixeles vecinos. Visualmente puede ser interpretado como agrandar el tamaño de cada pixel en la imagen original. En la figura B.1 se muestra un esquema de el proceso del procedimiento anteriormente explicado.

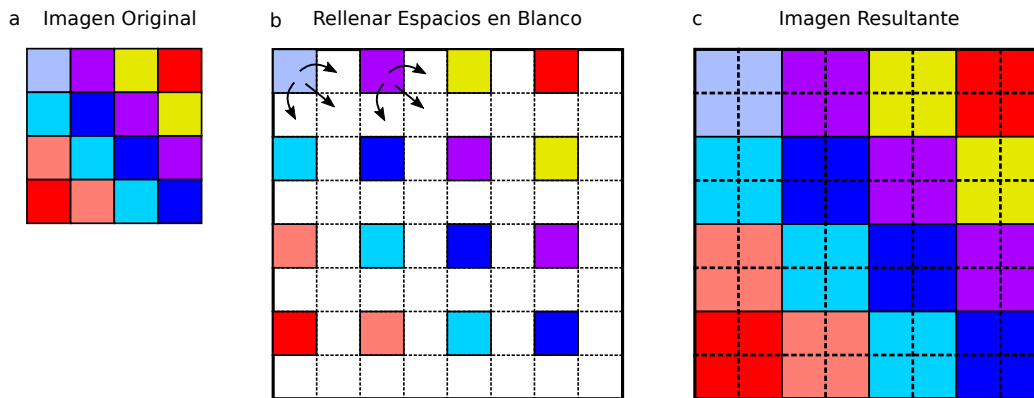


Figura B.1: Interpolación de vecino más cercano. a) Imagen original de dimensión 4x4. b) Interpolación de la imagen a) al doble de su tamaño. Los pixeles nuevos toman el mismo valor que su pixel vecino más cercano. c) Imagen resultado de la interpolación, quedando con dimensión 8x8.

Interpolación bilineal

La interpolación bilineal está basada en usar el promedio ponderado de los 4 pixeles más cercanos de la imagen original respecto al pixel interpolado. El resultado da una imagen suavizada en comparación con el método de vecino más cercano.

Súpongase que se tienen cuatro pixeles p_1, p_2, p_3, p_4 con coordenadas $(x_1, y_1), (x_2, y_1), (x_2, y_2), (x_1, y_2)$ e intensidades f_1, f_2, f_3, f_4 respectivamente. Se quiere determinar la intensidad del pixel q en la posición subpíxelica (x, y) (punto rojo) como se muestra en la figura B.2.

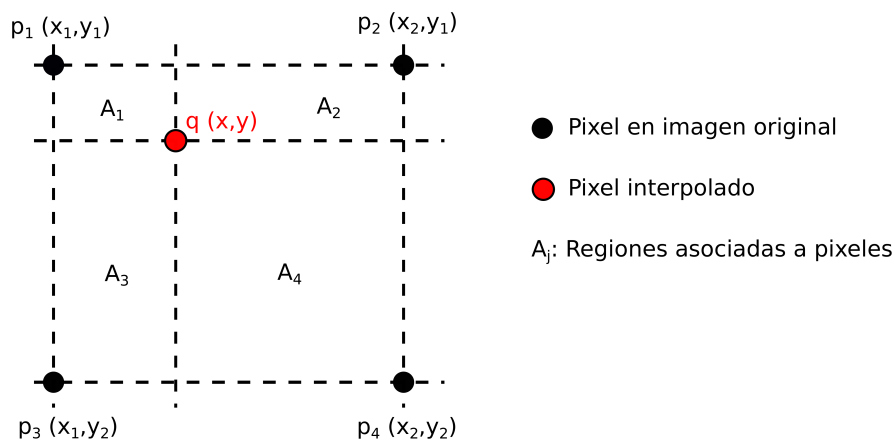


Figura B.2: Esquema de interpolación bilineal. El valor del pixel interpolado q en la posición (x, y) va estar determinado por las áreas A_j y las intensidades de sus cuatro pixeles más cercanos.

La fórmula de interpolación va a estar dada por:

$$\begin{aligned}
 f(q) &= f(p_1) \frac{(x_2 - x)(y_2 - y)}{(x_2 - x_1)(y_2 - y_1)} + f(p_2) \frac{(x - x_1)(y_2 - y)}{(x_2 - x_1)(y_2 - y_1)} + \\
 &\quad f(p_3) \frac{(x_2 - x)(y - y_1)}{(x_2 - x_1)(y_2 - y_1)} + f(p_4) \frac{(x - x_1)(y - y_1)}{(x_2 - x_1)(y_2 - y_1)} \\
 &= f(p_1) \frac{A_4}{A} + f(p_2) \frac{A_2}{A} + f(p_3) \frac{A_2}{A} + f(p_4) \frac{A_1}{A} \\
 &= \frac{1}{A} (f(p_1)A_4 + f(p_2)A_2 + f(p_3)A_2 + f(p_4)A_1),
 \end{aligned}$$

donde $A = A_1 + A_2 + A_3 + A_4$ es el área total encerrada entre los cuatro píxeles.

Interpolación bicúbica

La interpolación bicúbica es el método más usado en el escalado de imágenes con el cual se preservan detalles de la imagen original con buena precisión. Las imágenes remuestreadas con interpolación bicúbica son más suaves y tienen menos tendencia a crear artefactos que los métodos anteriormente expuestos.

A diferencia de la interpolación bilineal, en la interpolación bicúbica se consideran 16 píxeles en una vecindad de 4×4 de la imagen original respecto al pixel interpolado. Este método es una extensión de la interpolación cúbica (caso unidimensional) al caso bidimensional, su fórmula está dada por:

$$v(x', y') = \sum_{i=0}^3 \sum_{j=0}^3 a_{i,j} p(x_i, y_j), \quad (\text{B.1})$$

donde $a_{i,j}$ son los coeficientes asociados a cada pixel, $v(x', y')$ es el valor del pixel interpolado (punto rojo), $p(x_i, y_j)$ es valor del pixel de la imagen original δ_x y δ_y son las distancias entre x', x y y', y respectivamente, como se muestra en la figura B.3. La parte ingeniosa es determinar los 16 coeficientes asociados a los píxeles, lo que conlleva a resolver un sistema de 16 ecuaciones. Sin embargo, en la práctica no se procede de esta manera ya que sería de alto costo computacional, por lo que se usan splines cúbicos de interpolación. La fórmula empleando el núcleo de Catmull-Rom está dada por la expresión:

$$\text{cubic}(x) = \begin{cases} (-c + 2)x^3 + (c - 3)x^2 + 1 & \text{si } 0 \leq x < 1 \\ -cx^3 + 5cx^2 - 8cx + 4c & \text{si } 1 \leq x < 2 \\ 0 & \text{otro caso} \end{cases} . \quad (\text{B.2})$$

donde c es un parámetro que controla el grado de suavidad de los valores de los píxeles interpolados respecto a sus vecinos, siendo $c = \frac{1}{2}$ el valor óptimo.

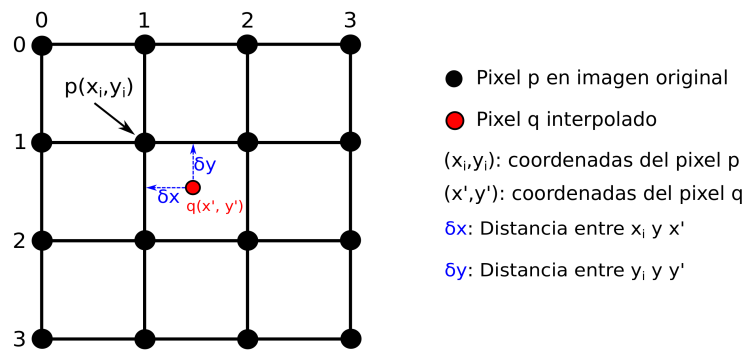


Figura B.3: Esquema de interpolación bicúbica. El valor del pixel interpolado q en la posición (x,y) va estar determinado por las funciones de peso $a_{i,j}$ y los valores de sus 16 pixeles más cercanos $p_{i,j}$.

En la figura B.4¹ se muestra un ejemplo a modo de comparación de los tres métodos de interpolación descritos anteriormente. La flecha negra, en las regiones ampliadas, indica una zona en que se diferencian las imágenes resultantes. Notar que con la interpolación de vecino más cercano la imagen queda pixelada, para los otros dos casos la interpolación presenta un mejor suavizado. La interpolación bicúbica es la que ofrece menor pixelación y conservación de los detalles de la imagen.

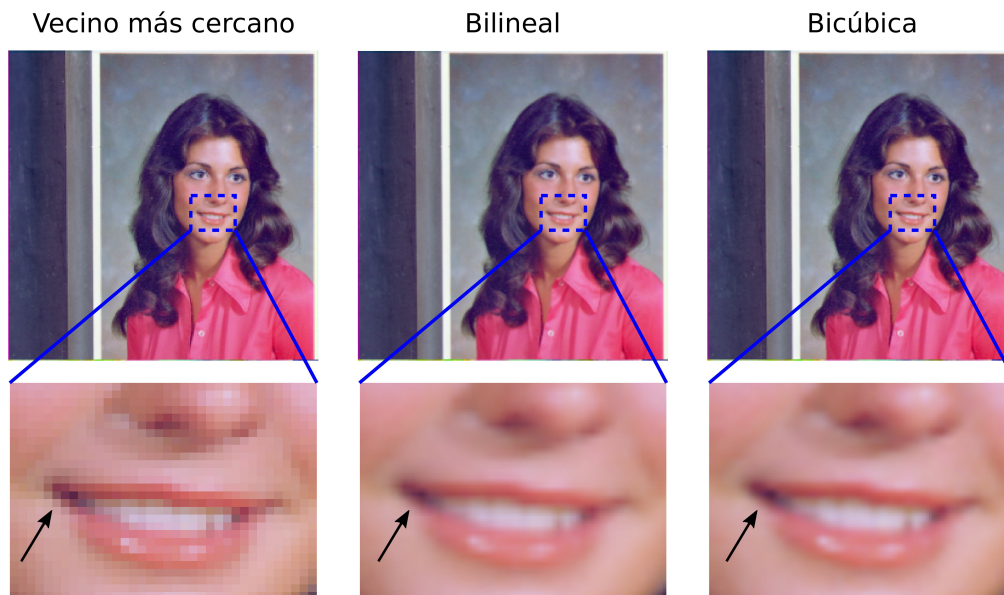


Figura B.4: Resultados de interpolaciones de vecinos más cercano, bilineal y bicúbica al procesar una imagen digital. La flecha señala una región a modo de comparación entre los tres métodos. La interpolación bicúbica es la que ofrece mejores resultados.

¹Imagen tomada de <http://sipi.usc.edu/database/database.php?volume=misc&image=4#top>.

Apéndice C

Minimización de malla

Ocasionalmente, las reconstrucciones proporcionadas por *MSSR* pueden presentar un patrón en forma de malla al realizar el análisis temporal; este es un artefacto relacionado con el paso de interpolación que forma parte del algoritmo de superresolución. *MSSR* utiliza interpolación bicúbica, que ofrece mejores resultados en términos de calidad de imagen general en comparación con otras opciones disponibles (vecino más cercano, bilineal).

En esta sección se muestra una explicación del origen de la malla, se describe el proceso de minimización (en adelante denominado 'compensación') y una comparación entre los datos con y sin dicha compensación.

Razonamiento detrás del algoritmo

La figura C.1 muestra un ejemplo del resultado obtenido de una secuencia de imágenes procesada con interpolación y cómo se ve afectada. Una secuencia de imágenes blancas contaminadas con ruido EM-CCD (usando un código personalizado escrito en R basado en la teoría y ecuaciones proporcionadas por Hirsch en [108]) y un valor de amplificación de 5 se muestra en la figura C.1a; una estructura similar a una malla se puede percibir fácilmente ya que las líneas verticales y horizontales se distribuyen uniformemente por todo el marco (panel inferior en la figura C.1a). Después de un análisis cuidadoso de los perfiles de línea en la figura C.1c, se puede concluir que:

- la distancia (en píxeles) entre los máximos de malla es igual al valor de amplificación.
- Estas líneas (malla) corresponden a los mínimos locales y el punto medio entre ellos a los máximos.

- La distancia entre un máximo y un mínimo locales es la mitad del valor de amplificación.

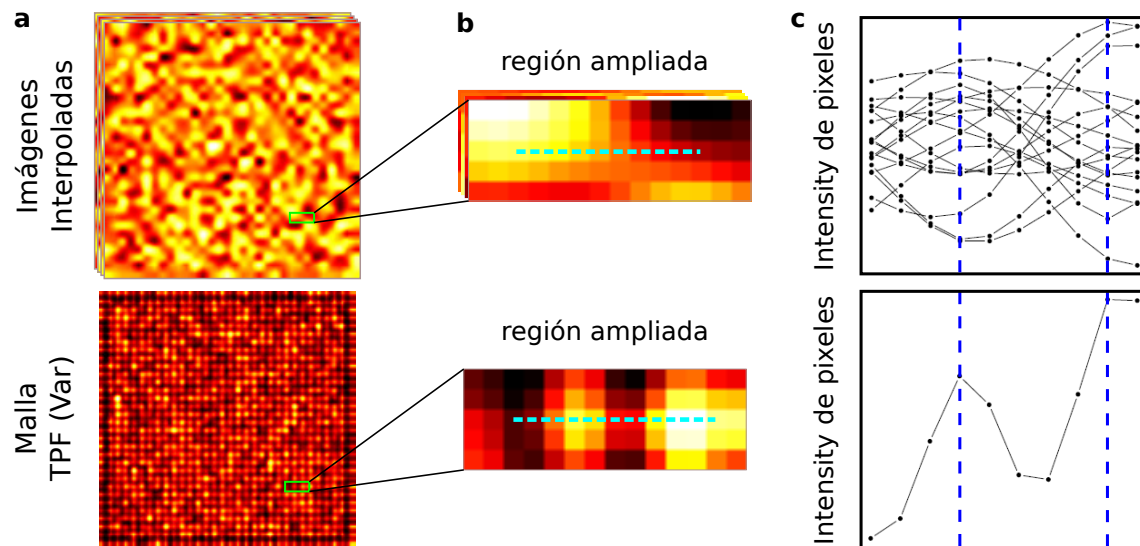


Figura C.1: Ejemplo del resultado obtenido de una secuencia de imágenes procesada con interpolación y cómo se ve afectada. a) Secuencia de imágenes interpoladas sin presencia de emisores y su proyección de varianza (donde es evidente la presencia de la malla). b) Región ampliada de las imágenes en a). c) Perfiles de línea correspondientes a los valores de pixeles a través de las líneas de puntos cian en los *ROIs* ampliados. Los primeros quince fotogramas se muestran en el gráfico superior en c). Las líneas de puntos azules en c) representan la posición de los valores máximos de la malla a lo largo del perfil de la línea.

Cuando se produce el proceso de interpolación, se genera un gradiente de intensidades entre los pixeles originales y los que se generan durante el proceso; esto se debe a que la función de interpolación promedia valores que están cerca del punto que se está generando. Para cada pixel nuevo, cuanto más cerca esté del original, más se parecerá. Esto significa que, si un nuevo pixel se encuentra en un punto intermedio entre dos pixeles, su valor se verá afectado por la información de ambos lados y lo más probable es que sea un promedio de ambos. Cuando este proceso se repite sobre la pila con intensidades de pixeles muy similares, los nuevos pixeles (en posiciones intermedias) en cada imagen tenderán a conservar la semejanza entre sí (panel superior en la fig. C.2c), y por lo tanto provocando que la varianza sea bastante baja. En el panel superior de la fig. C.2c, parece que los valores de los pixeles que coinciden con las líneas de puntos azules tienen una mayor dispersión; corresponden a los pixeles generados que fueron los más cercanos a los originales durante el proceso de interpolación.

Para compensar este efecto de “malla”, se realiza un cambio de información en dos direcciones para cada eje, lo que da como resultado cuatro cambios totales

y, por lo tanto, genera cuatro imágenes adicionales (figura C.2). La magnitud del desplazamiento en cualquier dirección es igual a la mitad del valor de amplificación, ya que corresponde a la distancia desde un máximo local dado y su mínimo. Estas cuatro imágenes adicionales junto con la original se promedian y el resultado es la nueva imagen compensada.

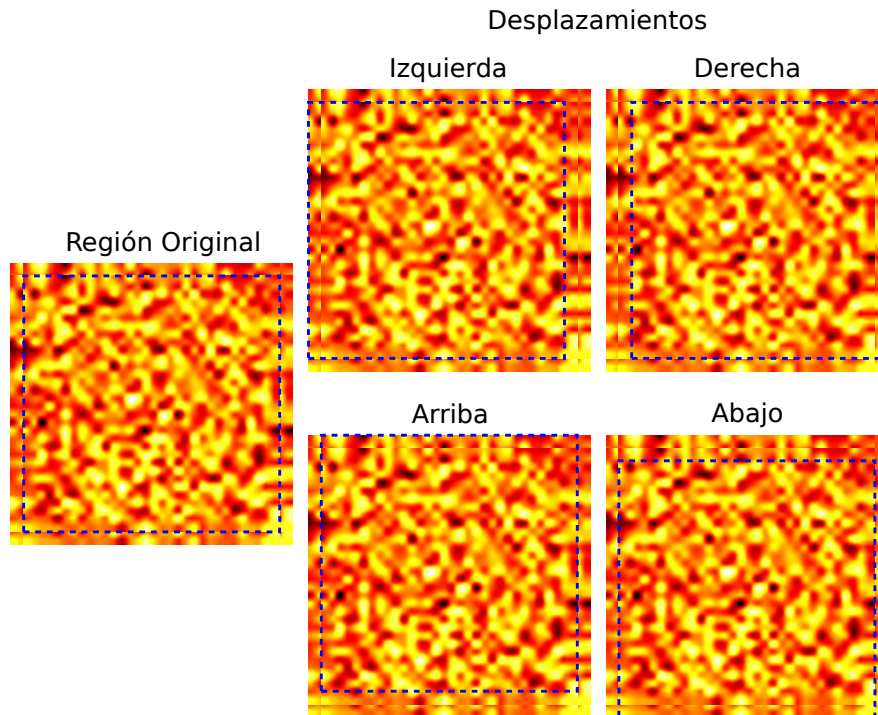


Figura C.2: Esquema de la compensación de malla. Se generan un total de cuatro imágenes adicionales como resultado del desplazamiento espacial de la información de píxeles a ambos lados de cada eje.

Comparación entre datos compensados y no compensados

Se utilizó un conjunto de datos sintéticos (figura C.3) y experimentales (figura C.4) para evaluar efectividad del algoritmo de minimización de malla.

Se utilizó una secuencia de imágenes sin emisores contaminadas con ruido EM-CCD y los datos sintéticos SynEx2¹ con y sin ruido EM-CCD para demostrar el efecto de minimización de malla durante el proceso de interpolación bicúbica.

¹La secuencia de imágenes fue tomada del sitio <https://sites.google.com/site/uthkrishth/musical>

La falta de ruido en los datos sintéticos reduce notablemente la generación de artefactos visibles, mientras que la presencia de ruido aumenta enormemente su aparición. Ejemplos se muestran en la figura C.3 donde las imágenes contaminadas con ruido (figura C.3a) es evidente la malla generada, mientras que en las imágenes carantes de ruido (figura C.3b) no se observa este efecto. El efecto de "malla" siempre tendrá lugar cuando se analicen datos experimentales reales, debido al ruido que se introduce intrínseca e inevitablemente a lo largo del proceso de obtención de imágenes en cualquier sistema óptico.

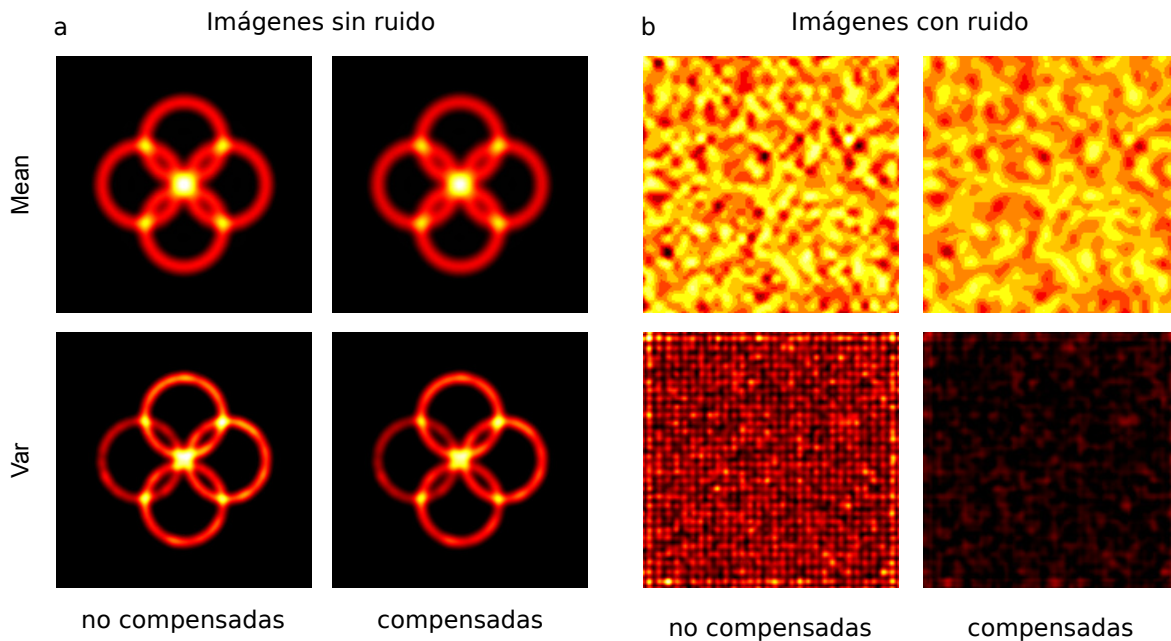


Figura C.3: Ejemplos del resultado de la interpolación bicúbica y compensación de malla en una imagen con ruido (a) y sin ruido (b).

Se utilizó una secuencia de datos experimentales para demostrar el efecto de minimización de "mallado" durante el proceso de *MSSR*. En las figuras C.4a y C.4b se presenta una comparación de los resultados antes y después de la compensación. Primero, el análisis de *MSSR* fue aplicado en una sola imagen (primera imagen de la secuencia, figura C.4 primera fila). Luego, el análisis con *MSSR* se realizó en toda la secuencia con tres funciones temporales (TPM, Mean, y Var) cuyas propiedades varían de acuerdo al grado de parpadeo de los fluoróforos (figura C.4 filas 2-4).

Como se puede observar, el uso de *MSSR* sin compensación en una sola imagen no genera artefactos visibles, pero cuando el proceso se realiza sobre una secuencia de imágenes y se aplica un análisis temporal, la malla puede emerger. La figura C.4 muestra que el patrón de malla solo está presente en el análisis temporal de varianza. Sin embargo, incluso si el patrón de malla no está presente, las imágenes de reconstrucción pueden contener otros artefactos, como la forma poligonal de cuatro

lados dentro de las rosquillas en la figura C.4 una. Cuando se aplica la compensación, el interior de las rosquillas adopta una forma más circular, que es el patrón esperado a obtener.

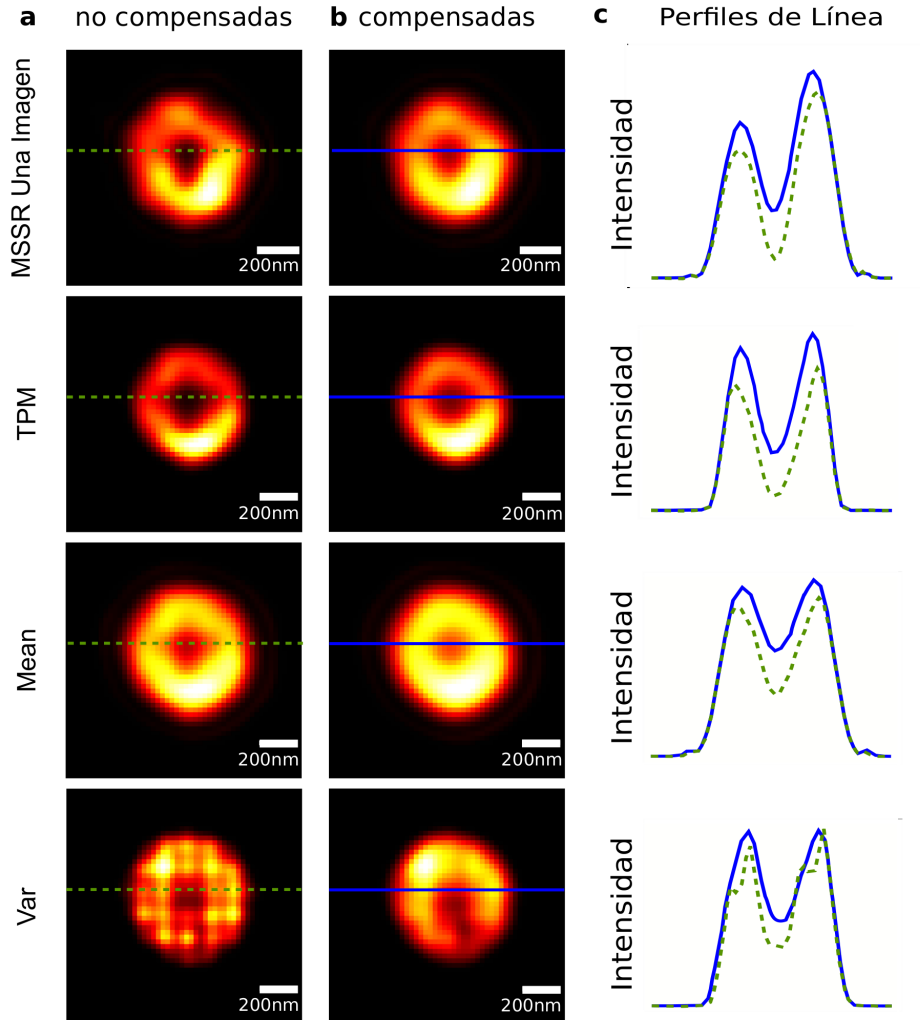


Figura C.4: Ejemplo del resultado de la interpolación bicúbica y compensación de malla en una imagen y secuencia con ruido. a) Sin compensación de malla y b) con compensación de malla. c) Los perfiles de línea de *MSSR* son los resultados de a) y b), la línea verde discontinua en las imágenes corresponde a los valores de a) y la línea azul sólida corresponde a b) respectivamente.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias



DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada **Algoritmo de microscopía de superresolución basado en la Media Desplazada**, que presenta el alumno **Esley Torres García (10012791)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

| NOMBRE | DICTAMEN | FIRMA |
|--|----------|-------|
| Dr. Markus Francizkus Muller CInC-UAEM | APROBADO | |
| Dra. Lorena Diaz González CInC-UAEM | APROBADO | |
| Dr. Rolando Pérez Álvarez CInC-UAEM | APROBADO | |
| Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas IBT-UNAM | APROBADO | |
| Dr. Antonio Daniel Rivera López CInC-UAEM | APROBADO | |
| Dr. Paul Hernandez Herrera IBT-UNAM | APROBADO | |
| Dr. Juan Manuel Rendón Mancha CInC-UAEM | APROBADO | |



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN MANUEL RENDON MANCHA | Fecha:2022-03-11 21:26:03 | Firmante

UoheXUBtr3GBcuwoIUTOXs8Oy79iMOKbi+FfWplj2mdPvQkYKcM/NHnoy0P97qxKli50vUAEJUR3KCoO/ET+xZH0U+R6FgfJDr49Ys2+HmKkig8/ZPK0aB6R2zF0BM3W+ONx1/N9HM12kXvrd8MRk+bBqSYHlpZimR2aGbs26DQr8+ZoolVym0dUwKjGqGue755261Qpu5wrnl88ZY79wg6Cye5KdhlC23VmL+FoUwOSXLDckhVsK/wZYMkavKRxRdP6/dWJUQBKmbC776D4dAfvuAzlwBIPgO1K3NzfwcDyKYLJOGzxRvBSIF32DhJ0nC0i+PMWpVhLUykS6SNQ==

PAUL HERNANDEZ HERRERA | Fecha:2022-03-11 22:19:05 | Firmante

PhdpDKkPFjnlGyXcspixK8r2CSzJyziTrVjCpSv6nzBDIYRTkwxRhlMXIH2KunYqED9Ca6+F1bghlyRXjNqThAavCQmHrJIVWzbrbAflaTz2vj5uStiR8tH3JO0UwzPtoJ2XLkTRTFAORNOKll4Fu7bvzoybKl1n8TgJRh77TakMbu9W+BPH0U8b0VTSy+GSZJLvrAUut5e6kbfJxPOG8r1sYllo/HZ13maUrCtfXdy3cUv0Dr9cT0cpjOFG/fGm35V9ie+sogH85ap8F98Z1U+uYWX6dKwStxruB9k4y+760d5Cok2y51Vk+QusrUnxcNfCarZPm9iBzmnQ==

ADÁN OSWALDO GUERRERO CÁRDENAS | Fecha:2022-03-11 22:57:50 | Firmante

HTKL90U4mSPNI8W8Do6xGBIAvPxNJ557Dm872gwE3Wbnag9ec/TC67bV3RiJce5AZX0HxYSfFLr9kClzwt7QL7hcSeR3WEWNbZxHdDrAGEHvP5PXKB+vOCYqxo3H/vFhb9G36bvegsuzwlrAsd9cB4CvP3KPOOUPVz1dqfDkbq0LvB7h3IFf9bTSGFCM+qhSjamH7ywhGkqYErhstNP/Oz9XHNN1Laj257Zaz49gTQkhaqmsE0pbmu+OBN4ApEbBSWnmAncG/Pb0L3RPKh/Myb9IhDT70Xu/ty+zCFN7UOyFj62Z3AoNSQuGululbPXapNpqbeR463W22VPAUMBaw==

MARKUS FRANZISKUS MULLER | Fecha:2022-03-12 08:21:42 | Firmante

KpBN6jVRrYmL3oeUdxc4YGHFm68MswJEoiZJ0gf/sekHgCyY8XfYBXsqiNjwBR3SNysU5GxwaRrS1AV2Jyc/MhX9tymbibI4O1XUOuSjX5Q2KO2Dnni9Am7re6oEhPKwAI4WB+JOBRAQADPaxPOVq4yVf2T97zd/CzwB2e/Jy1aXbO1ywCxDE9D3K5GUmY4a69JWQzaEav0Y0aQGNnqbbzefeg6XwtLe3dNRzJv12WRNCXZspl30q4+W8wKpa6WB1uhVA0DB/AO0pkecR2LDQK2POVPPWd0x9Nco07QDxtAWMCTV2wyT678y6a8Gjx5h+akz0KjXZKHuo3sZ5Q==

ROLANDO PEREZ ALVAREZ | Fecha:2022-03-12 09:21:35 | Firmante

SAeCrgTKGk00CxZt8TBK+wwelholAoPMY+WX4ztRFW2LjYCRt6Yu83kt4ouVPJJo/Cil22wbqnlITZ7nFOq6liXrHa2GrVm96ZYnSdhn5c+hf9EulkfgD6xKUBPKFv8XrmFUGRCpWdFa1+ILODCYgrauxj74g3a2CKZrK7ZgT8QBSQmOJoJeoYcKXW0ALVN5Expq/65DfgdbsGuYw7nGmzbb5SzE2cTdT7UeyoDb8fql08SPT6FOs0+BBZ1ijDIL5LcB1wWWhF5hhiur4X1wVSiI5f6t0ZqXqHw0bCEblnSxrr67D+H1JtNFJG2/75OFgvfMmcr8Ihn3jQ8l64VA==

LORENA DIAZ GONZALEZ | Fecha:2022-03-12 20:20:08 | Firmante

PFBZDYOY+s7RjPjHg/SFXRO1DH+CDRMIIGxJ8/reITP1Qisl6zdpMqP1x6JOhacFSTXbrCcUetNtjd8P7iOzuWghwAxbPmoDjoM/LciPju3Z0KhWLC/+tp4MsEvKtStoOJJg2sj03JYkz2ZzKITv8AD4AQbaaft/9dJmN3s2lgc8M4Essl4ztk7RF22ceKVPDw2d4FAHaRrmzV4XJkeZsfRnNoEfmloRiXreCQ8it04dv5CFR+f2Yc4SU0m+p331xgsvRscIEP7vtfI4eK4vClfVbF2667/q36Ug11t8Z01nXlpuZeKYHC0NpVroVn4LulfdkzEbOCPozfBIPGrg==

ANTONIO DANIEL RIVERA LOPEZ | Fecha:2022-03-12 21:22:43 | Firmante

A0oj7bl+D47pgh3b0qwtbhpBdlCRReih88RKN4XM7ukvoXlpFqgS3MWG3ww1ZXKqA1kHtd7JFOVDb5IGazp9DP+SFRrbCfUsxsd+XdFSCbnBrpspQ/sawhjy9+csRXwqqTsYGMHtfA6wkT7qjhaKdJLdgF9e3Swl/5Fuu7LshaFize2D6vt72FrxqshJCmTkWVfE+52TUm9VL3dDHYu79LuJlr4M0zmnZJgPrfl6KIYE6/XJ9hXHfS1RPH/RXvLrEUgwNUM65mPKCVWNEV+2+IHBFYNhu/JhFi+cwaab5QKsh+zHucuyBZ61H75STx+z0puTp/+YOpj6BDut8Baw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



lUpXkOGbx

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mH711je8DkeAXwenuNsRZNXnX6R90OXo>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023