

## PYSUPPOSE3D: DECONVOLUCIÓN 3D CON SUPERRESOLUCIÓN EN MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

### PYSUPPOSE3D: 3D DECONVOLUTION WITH SUPERRESOLUTION IN FLUORESCENCE MICROSCOPY

Matías Charrut<sup>1</sup> y Micaela Toscani<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ingeniería, Instituto de Ingeniería Biomédica, Laboratorio de Fotónica. Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Recibido: 19/05/2025 ; Aceptado: 09/06/2025

En el presente trabajo se implementó un sistema de microscopía de fluorescencia que permite la adquisición de imágenes en tres dimensiones para su posterior procesamiento mediante el algoritmo SUPPOSe 3D con el objetivo de obtener una reconstrucción con superresolución. SUPPOSe es un algoritmo de deconvolución con superresolución que permite reconstruir la estructura verdadera distorsionada en una imagen incorporando información a priori. La aproximación SUPPOSe consiste en aproximar la estructura real en la muestra como una superposición de fuentes puntuales de igual intensidad, llamadas fuentes virtuales. Este procedimiento permite simplificar el problema de deconvolución y lo convierte en un problema de minimización sin restricciones, que debe resolverse encontrando las posiciones de las fuentes virtuales. Estas posiciones pueden tomar valores en todo el dominio y se determinan mediante la minimización de una función objetivo a través de un algoritmo genético. A lo largo de este trabajo se puso a prueba el método SUPPOSe para imágenes en tres dimensiones tanto generadas sintéticamente como adquiridas de manera experimental con el sistema implementado. Se utilizaron muestras con estructuras conocidas para validar los resultados obtenidos y evaluar el rendimiento del algoritmo en función de las características de las imágenes procesadas.

*Palabras Clave:* Deconvolución, Superresolución, SUPPOSe, Fluorescencia.

In the present work, a fluorescence microscopy system was implemented that allows the acquisition of three dimensional images for subsequent processing using the SUPPOSe 3D algorithm with the aim of obtaining a superresolution reconstruction. SUPPOSe is a superresolution deconvolution algorithm that allows reconstructing the true distorted structure in an image by incorporating a priori information. The SUPPOSe approach consists of approximating the real structure in the sample as a superposition of point sources of equal intensity, called virtual sources. This procedure simplifies the deconvolution problem and converts it into an unconstrained minimization problem, which must be solved by finding the positions of the virtual sources. These positions can take values in the whole domain and are determined by minimizing an objective function through a genetic algorithm. Throughout this work the SUPPOSe method was tested for both synthetically generated and experimentally acquired 3D images with the implemented system. Samples with known structures were used to validate the results obtained and to evaluate the performance of the algorithm as a function of the characteristics of the processed images.

*Keywords:* Deconvolution, Superresolution, SUPPOSe, Fluorescence.

<https://doi.org/10.31527/analesafa.2025.36.4.76-84>

 ISSN - 1850-1168 (online)

#### I. INTRODUCCIÓN

La microscopía óptica brinda la posibilidad de examinar muestras vivas en condiciones similares a las que se encuentran en su estado natural, lo que se ha expandido cada vez más a partir de la amplia disponibilidad de nuevas técnicas de marcado por fluorescencia. A medida que la investigación biológica avanza hacia la escala molecular, las limitaciones en términos de resolución y eficiencia lumínica son cada vez más estrictas. En la microscopía óptica, la resolución espacial se encuentra limitada por la longitud de onda de la luz debido a los fenómenos de interferencia y difracción. La resolución que se puede lograr con este tipo de microscopía se encuentra limitada a aproximadamente 200 nm en la dirección lateral y aproximadamente 500 nm en

la dirección axial, lo que dificulta el estudio de las características de un objeto que posean tamaños menores o se encuentren cercanas a distancias por debajo del límite de difracción del sistema. Al adquirir una imagen de microscopía óptica, la señal proveniente del objeto observado se encuentra degradada principalmente al proceso de formación y registro de la imagen. La degradación producida en este proceso de formación de la imagen es determinista y puede caracterizarse mediante la función de dispersión de punto que se denominará PSF (del inglés *point spread function*). Ésta describe la respuesta del sistema óptico frente a un objeto puntual infinitesimal y el ancho de esta PSF es el que define el límite de resolución del sistema. La degradación producida por el proceso de registro de la imagen, denominada ruido, es una realización de un proceso aleatorio del cual no es posible conocer a priori su valor, pero se

\* mtoscani@fi.uba.ar

pueden asumir propiedades estadísticas. Si el sistema óptico puede considerarse invariante ante traslaciones, o sea que la PSF es la misma en cualquier lugar del espacio de la imagen, se puede modelar la imagen adquirida  $S$  como el resultado de la convolución del objeto real  $R$  con la PSF  $I$  del sistema óptico, más un término de ruido  $\eta$  y un nivel de fondo constante  $B$

$$S(\mathbf{r}) = R(\mathbf{r}) * I(\mathbf{r}) + \eta(\mathbf{r}) + B. \quad (1)$$

El fondo incluye fluorescencia del medio desenfocado o circundante, cuentas de oscuridad, nivel de lectura o cualquier otra contribución aditiva a la señal explorada. El ruido  $\eta$  son variaciones aleatorias alrededor del nivel de señal medida debidas principalmente al mismo proceso de adquisición. Se desea poder conocer  $R$  con una mejor resolución que la dada por la respuesta del instrumento.

Existen dos grandes enfoques para mejorar la resolución de los sistemas ópticos. El primero de ellos se basa en modificar el sistema de tal manera de lograr angostar la PSF del instrumento [1-4]. La mayoría de estos métodos presentan desafíos en términos de implementación y mantenimiento, y a menudo son incompatibles con especímenes biológicos vivos en su hábitat natural. El segundo enfoque consiste en invertir el proceso de distorsión mediante técnicas de deconvolución conociendo la PSF del sistema óptico. Estas técnicas deben ser optimizadas de manera tal que se asegure la preservación de la información biológica en el resultado obtenido. La inversión directa en 1 es un problema matemático mal condicionado, ya que debido al ruido es posible encontrar soluciones que no tienen significado físico, tales como valores negativos para la intensidad de la imagen. Para obtener una estimación de  $R$  con una precisión razonable y robustez frente al ruido, generalmente se deben utilizar conocimientos a priori sobre la señal en cuestión. De esta manera, la estimación se formula como un problema de optimización que incorpora esta información previa.

El desafío de obtener imágenes de alta resolución más allá del límite impuesto por la difracción, las aberraciones y el ruido con una sola imagen fue perseguido durante décadas mediante la deconvolución. En [5] los autores examinan varios algoritmos de deconvolución estándar como ser: RIF (del inglés *regularized inverse filter*), regularización de Tikhonov, Landweber, Tikhonov-Miller, Richardson-Lucy y RL-TV (del inglés *Richardson-Lucy with total-variation regularization*). Estos algoritmos se evalúan para diferentes imágenes y se implementan en un software de código abierto. El enfoque más simple para realizar la deconvolución es la minimización de la función de costo de mínimos cuadrados que mide la similitud entre la imagen adquirida y la estimación. Esto es una inversión directa de la convolución en el dominio de Fourier, pero tiende a amplificar el ruido presente en la imagen dando resultados con oscilaciones de alta frecuencia no deseadas. Una manera de evitar la amplificación del ruido es agregar términos de regularización a la función de costo, de forma tal que se penalicen valores no deseados en la solución. Tikhonov [6], RIF [7] y Tikhonov-Miller son métodos que incorporan estos términos de regularización para convertir el problema matemático en uno bien condicionado. Sin embargo, tam-

poco se logran obtener resultados favorables en la mayoría de los casos como en el método iterativo de Landweber [8] que tiende a producir un ajuste excesivo en el ruido cuando el número de iteraciones no se elige adecuadamente, o en Richardson-Lucy [9, 10] que normalmente produce señales espurias cerca de transiciones bruscas en el contenido de la imagen (artificios de *Ringing*) también debidas a la amplificación del ruido. Existe métodos iterativos rápidos que incorporan restricciones de raleza en el dominio *wavelet* y donde el problema de optimización se resuelve utilizando nuevos parámetros y un operador de umbral suave [11]. Todos estos términos de regularización siempre terminan siendo un factor amortiguador que suaviza la solución reconstruida. Por último, el método RL-TV [12] agrega un término de regularización usando la norma  $L^1$  para preservar las discontinuidades de la imagen. Sin embargo, este término podría causar artificios si el parámetro de regularización no se elige adecuadamente, produciendo una mala interpretación de la estructura biológica. Para todos estos métodos de deconvolución, la mejora significativa es la reducción de fluorescencia fuera de foco proveniente de otros planos cuando el objeto es tridimensional. En cambio, la mejora en la resolución lateral resulta marginal y en algunos casos las reconstrucciones muestran artificios debido a la técnica de deconvolución utilizada. Existe alternativas recientes basadas en la teoría Mean Shift, como Mean-Shift Super Resolution (MSSR) [13]. Fundamentalmente, se utiliza para mejorar la resolución de imágenes individuales o en una secuencia temporal mediante el método de fluctuaciones de fluorescencia.

En nuestro grupo se ha desarrollado un algoritmo de deconvolución con superresolución denominado SUPPOSe [14-21]. El método se basa en asumir que la estructura observada se puede aproximar como una superposición de fuentes puntuales de igual intensidad. Al introducir esta premisa, la deconvolución se convierte en un problema matemático bien condicionado y es posible obtener soluciones con superresolución. El algoritmo SUPPOSe puede aplicarse en imágenes únicas, mejorando la resolución del sistema óptico sin comprometer la resolución temporal de la adquisición. Este método ha sido implementado y validado para imágenes adquiridas por microscopía de fluorescencia convencional a partir de muestras en dos dimensiones [19].

En este trabajo se muestra la extensión del algoritmo pySUPPOSe a estructuras en tres dimensiones, su validación en imágenes sintéticas y su aplicación a adquisiciones experimentales obtenidas mediante microscopía fluorescencia. En la Sección II se introduce el algoritmo SUPPOSe en tres dimensiones, su funcionamiento y su implementación. En la Sección III se muestran resultados de SUPPOSe obtenidos a partir de pruebas realizadas con imágenes sintéticas en tres dimensiones. En la Sección IV se muestran resultados de SUPPOSe aplicados a muestras experimentales en tres dimensiones obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. Por último en la Sección V se detallan las mejoras en el algoritmo que fueron necesarias para optimizar el tiempo de cómputo y poder procesar estructuras tridimensionales con el método pySUPPOSe.

## II. MÉTODO

Cuando se mide una imagen de microscopía, el objeto real que se desea observar se encuentra distorsionado por la PSF del sistema y por ruido intrínseco de la medición. Las mediciones en este caso son tridimensionales por lo que se realizan en forma de pila, es decir, se adquiere una secuencia de imágenes donde cada una contiene un plano  $xy$  de la muestra correspondiente a una posición  $z$  distinta. Siendo  $S$  la imagen adquirida la misma se puede representar como en la ecuación (1). En este caso  $r \in \mathbb{R}^3$  es la coordenada en que se realiza la medición. El algoritmo SUPPOSE asume que la estructura real del objeto se puede aproximar como una superposición de fuentes virtuales con igual intensidad  $\alpha$ , denominadas *fuentes virtuales*. Utilizando esta aproximación se puede estimar la estructura real  $R$  como

$$\tilde{R}(\mathbf{r}) = \alpha \sum_{k=1}^N \delta(\mathbf{r} - \mathbf{a}_k), \quad (2)$$

donde  $a_k \in \mathbb{R}^3$  es la posición de cada una de las  $N$  fuentes virtuales utilizadas y  $\alpha$  es la intensidad, la misma para todas las fuentes. Por lo tanto, para reconstruir la imagen original solo se deben encontrar las posiciones de las fuentes virtuales que, convolucionadas con la PSF del sistema, mejor aproximan la imagen  $S$  adquirida. Éstas pueden ubicarse en cualquier punto de  $\mathbb{R}^3$  sin ninguna restricción. Como todas las fuentes tienen el mismo valor de intensidad  $\alpha$ , se logran reconstruir distintas intensidades en la imagen final mediante la superposición de una mayor o menor cantidad de estas fuentes en un área determinada. Las fuentes virtuales SUPPOSE y sus posiciones no tienen correlación real con los fluoróforos (a diferencia de lo que ocurre en algoritmos de localización de molécula única [22-27]), sino que son distribuidas con el objetivo de aproximar la estructura  $R$  de la mejor manera posible. De esta manera, es posible obtener una aproximación de  $S$  como

$$\tilde{S}(r) = \tilde{R}(\mathbf{r}) * \tilde{I}(\mathbf{r}) = \alpha \sum_{k=1}^N \tilde{I}(\mathbf{r} - \mathbf{a}_k), \quad (3)$$

donde  $\tilde{I}$  es la estimación de la PSF del sistema de medición. Esta PSF puede ser obtenida de manera teórica con los parámetros del sistema o de manera experimental. Las posiciones de las fuentes virtuales se estiman resolviendo un problema de optimización minimizando la siguiente función objetivo

$$\chi^2 = \|S(\mathbf{r}) - \tilde{S}(\mathbf{r})\|^2, \quad (4)$$

para un  $N$  y un  $\alpha$  elegidos.

De esta manera el algoritmo SUPPOSE debe abordar un problema de minimización en  $\mathbb{R}^N \times \mathbb{R}^3$  sin restricciones donde la única incógnita es la posición de las  $N$  fuentes virtuales  $a_k$  que pueden tomar cualquier valor en  $\mathbb{R}^3$ . En general, la minimización de funciones tiene el problema de que es muy probable que se llegue a un mínimo local y, de esta manera, no se logre alcanzar el mínimo global, más aún teniendo en cuenta la alta dimensionalidad de este problema en particular. Por ello se utiliza un algoritmo genético. Este tipo de algoritmos son capaces de evitar los extremos locales y acercarse más al mínimo global a costa de realizar un

mayor número de operaciones. El algoritmo genético emula el proceso de evolución natural [14].

## III. IMÁGENES SINTÉTICAS

Las primeras pruebas de rendimiento se realizaron con pilas de imágenes sintéticas. Una de las estructuras sintetizadas consiste en dos rectas paralelas con direcciones transversales contenidas en distintos planos  $xy$ . Las rectas están separadas por una distancia en  $z$  de aproximadamente 200 nm. El resultado SUPPOSE tras procesar la imagen sintética respectiva se muestra en la Fig. 2. La visualización tridimensional de las coordenadas de la solución permite distinguir la estructura general de los datos, pero esta representación es limitada, ya que si se acumulan fuentes en una misma región es difícil distinguir información de profundidad. Por lo tanto, para generar lo que denominamos una reconstrucción SUPPOSE se convolucionan las posiciones de las fuentes virtuales con una función PSF mucho menor que la del sistema óptico. La profundidad de cada plano se encuentra codificada mediante la escala de colores de la barra de escala. Para cada plano, la intensidad se codifica como transparencia, es decir, los píxeles de mayor intensidad (donde se acumulen más fuentes virtuales) son más opacos y los de menor intensidad se ven más transparentes. Para una mejor visualización se muestran vistas de proyección de la reconstrucción en distintos planos para aportar mayor información.

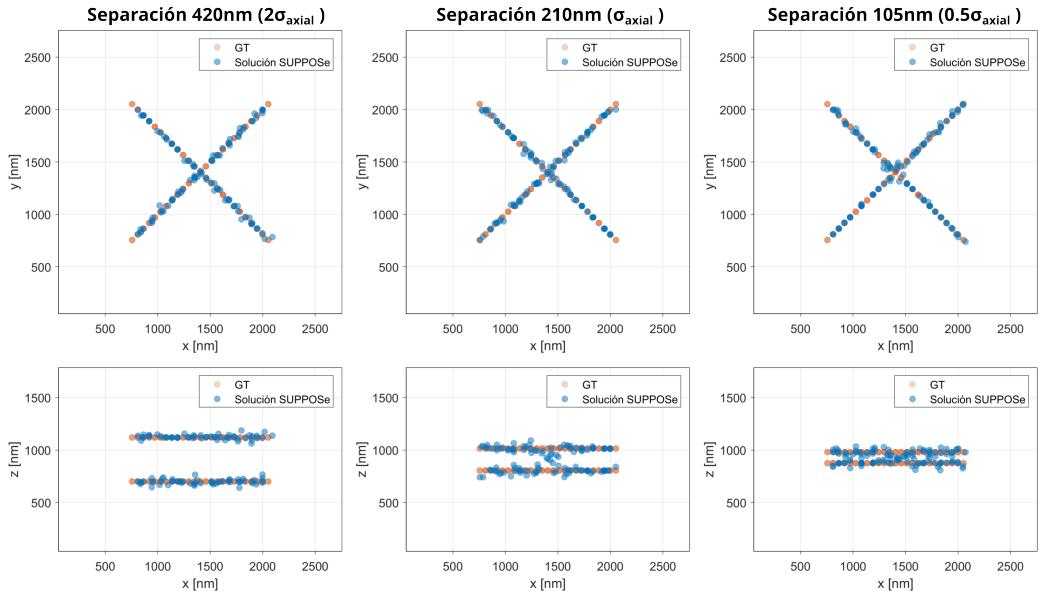
Para sintetizar y procesar las imágenes se utilizó una PSF de tipo haz Gaussiano. Este tiene la característica de ser en cada plano  $xy$  una función Gaussiana de dos dimensiones, pero que a lo largo del eje  $z$  va variando su varianza lateral. La intensidad de esta PSF está dada por la función

$$I(r, z) = I_0 \left( \frac{w_0}{w(z)} \right)^2 \exp \left( \frac{-2r^2}{w(z)^2} \right), \quad (5)$$

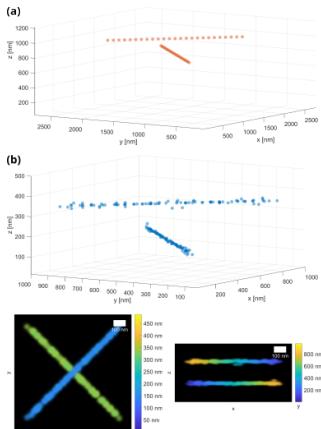
con  $w(z)$

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left( \frac{z}{z_R} \right)^2}, \quad (6)$$

donde  $r$  es la distancia radial al centro del eje del haz y  $z$  la distancia a la cintura o foco del haz,  $w_0$  es la cintura del haz en su punto más angosto en los ejes  $x$  e  $y$  respectivamente y  $z_R$  es la distancia de Rayleigh, que es la distancia a la que el haz alcanza una cintura de  $w(z_R) = \sqrt{2}w_0$  y es calculada como  $z_R = \frac{\pi n w_0^2}{\lambda}$  con  $n$  el índice de refracción del medio y  $\lambda$  la longitud de onda del haz de luz. Se realizaron pruebas para tres separaciones distintas entre rectas. Referenciadas al parámetro  $\sigma_{\text{axial}}$  de la PSF, las separaciones fueron 420 nm ( $2\sigma_{\text{axial}}$ ), 210 nm ( $\sigma_{\text{axial}}$ ) y 105 nm ( $0.5\sigma_{\text{axial}}$ ). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 1, junto con una comparativa de los tres casos, donde se puede ver una proyección en el plano  $xz$  de las coordenadas de las fuentes virtuales de la solución (en color azul), junto con la estructura verdadera superpuesta (en color naranja). Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, el método SUPPOSE colocó las fuentes virtuales en los planos correctos, logrando reconstruir la separación correcta entre las líneas en tres dimensiones.



**FIG. 1:** Comparativa de resultados SUPPOSE para distintas separaciones de rectas transversales referenciadas al valor de  $\sigma_{\text{axial}}$  de la PSF. En la fila superior se muestra la proyección en el plano  $xy$  de las coordenadas de las fuentes virtuales y en la fila inferior la proyección en el plano  $xz$  de las mismas, superpuestas con las coordenadas de las fuentes puntuales de la estructura verdadera.

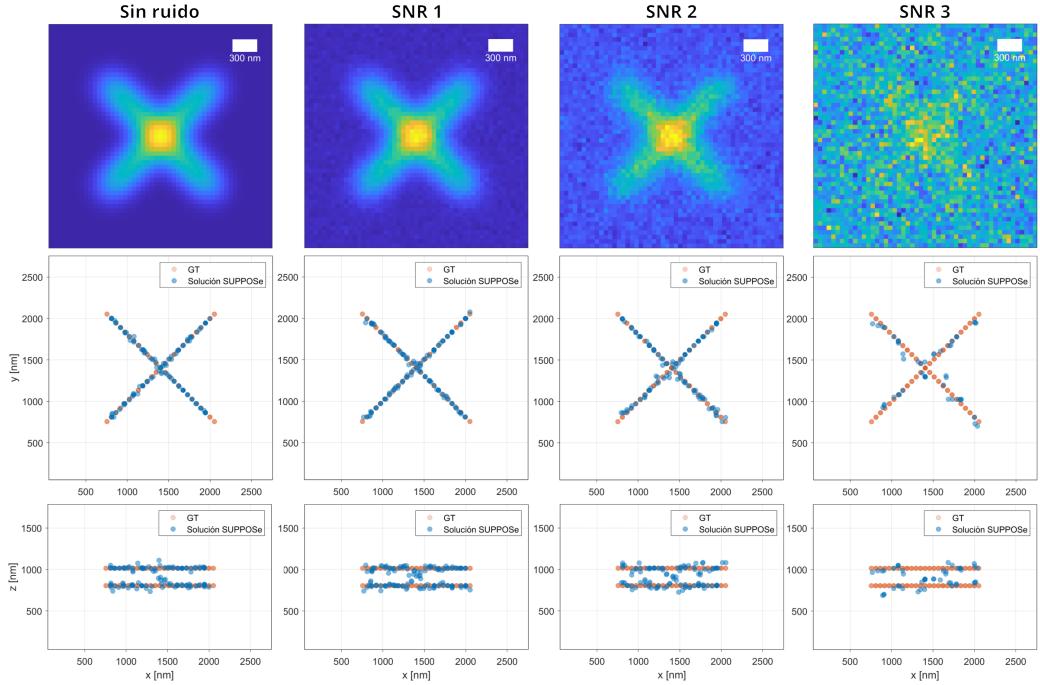


**FIG. 2:** Resultados en imagen sintética de dos rectas paralelas con direcciones transversales ubicadas en distintos planos  $xy$  y separadas 200 nm en el eje  $z$ . (a) Coordenadas en tres dimensiones de las fuentes puntuales de la estructura verdadera. (b) Vista en el plano  $xy/xz$  de la convolución de las posiciones de las fuentes virtuales con una PSF mucho menor que la del sistema óptico. En este caso, el tamaño del píxel de reconstrucción es 5 veces más pequeño que el píxel de la imagen sintetizada. Las fuentes virtuales se convolucionaron con una PSF gaussiana con un parámetro  $\sigma$  6 veces menor que el parámetro  $\sigma$  de la PSF de síntesis de la imagen.

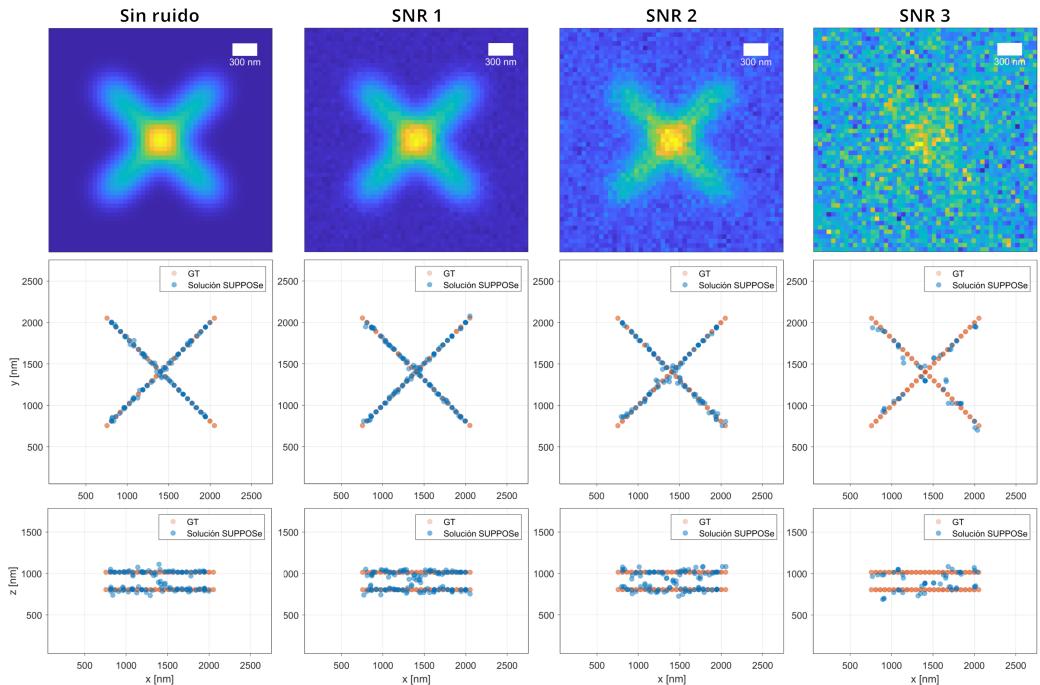
En la Fig. 3 se muestran, para el caso de separación 420 nm, distintos cortes de la pila de imágenes sintetizada y del resultado SUPPOSE. Se puede observar la mejora obtenida en la resolución y la localización de las rectas en el eje axial. Se observa que la solución SUPPOSE reconstruye las rectas en los planos correspondientes a  $z = 700\text{nm}$  y  $z = 1120\text{nm}$ . Esto da una distancia entre ellos de 420 nm, que es consistente con la distancia en la estructura verdadera. En los planos restantes se observa que, si bien existe intensidad en la imagen sintetizada, SUPPOSE no coloca fuentes virtuales allí.

Se realizaron pruebas para evaluar cómo varía el rendimiento del algoritmo SUPPOSE ante distintos niveles de ruido presente en las pilas procesadas utilizando la estructura de rectas separadas de 210 nm en  $z$ . En la Fig. 4 se muestra la comparación de los resultados obtenidos para tres niveles distintos de ruido. Se observa que, a medida que aumenta el nivel de ruido, aumenta también la dispersión en la distribución de las fuentes virtuales alrededor de la estructura verdadera. Sin embargo, se puede observar que, incluso para altos niveles de ruido, el rendimiento del algoritmo sigue siendo muy robusto.

Con el objetivo de poner a prueba el método con estructuras tridimensionales complejas, se sintetizaron pilas de imágenes cuya estructura verdadera es un elipsoide hueco con una distribución casi uniforme de fuentes puntuales sobre su superficie [28]. El elipsoide tiene un radio lateral de 432 nm y un radio axial de 560 nm. Se generó la estructura utilizando 2000 fuentes puntuales con un valor de  $\alpha = 100$ . Las pilas de imágenes sintetizadas tienen un tamaño de  $51 \times 51 \times 51$  píxeles. El tamaño de píxel lateral es de 54 nm y el axial, de 35 nm. Para la síntesis se utilizó una PSF elipsoidal gaussiana con parámetros  $\sigma_{\text{lateral}} = 162\text{nm}$  y  $\sigma_{\text{axial}} = 105\text{nm}$ . En la Fig. 5 se muestra la estructura verdadera y la solución obtenida mediante el método SUPPOSE. A los gráficos se les ha añadido un histograma de la distancia radial desde cada fuente hasta el centro del elipsoide, con el fin de facilitar la comparación entre las estructuras. Se observa que SUPPOSE logra reconstruir el elipsoide con una distribución uniforme a lo largo del cascarón. En el histograma de la misma Fig. se puede observar que la distancia radial de las fuentes al centro del elipsoide es muy similar a la de la estructura verdadera. Algunas fuentes se encuentran a distancias mayores de lo esperado, pero la cantidad no es representativa. Para obtener estos resultados, el método se ejecutó utilizando 3000 fuentes virtuales. El tiempo de ejecución fue de aproximadamente 5 horas, utilizando una PC con procesador Intel Core i7-8700K y placas GPU Nvi-



*FIG. 3:* En la fila superior se muestran distintos planos de la pila sintética de las rectas transversales. En la fila inferior se muestra la reconstrucción SUPPOSE respectiva. Las rectas重建adas se encuentran a 420 nm de distancia al igual que las de la estructura verdadera.

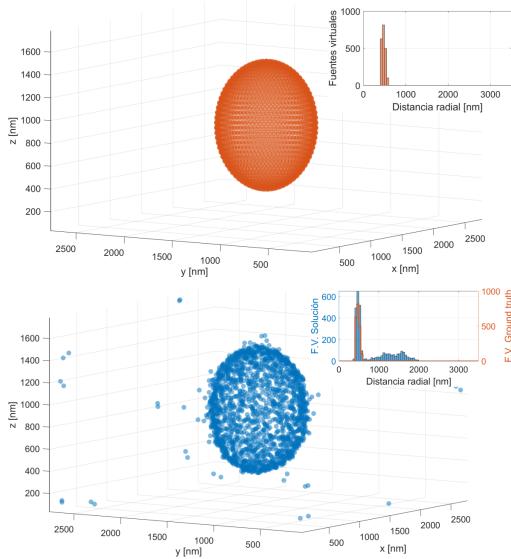


*FIG. 4:* Comparación de los resultados SUPPOSE para las pilas de rectas transversales separadas 210 nm ante distintas condiciones de nivel señal-ruido. Se parte de la imagen sin ruido y el nivel de ruido aumenta de izquierda a derecha. En la fila superior se observa el plano central de la pila procesada. En la fila intermedia se muestra la proyección en el plano xy de las coordenadas de las fuentes virtuales de la solución y en la fila inferior la proyección en el plano xz de las mismas, superpuestas con las coordenadas de las fuentes puntuales de la estructura verdadera.

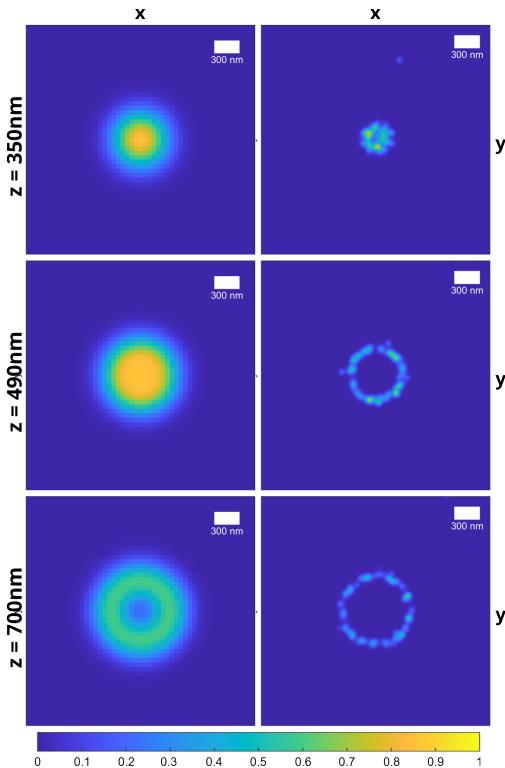
dia GeForce GTX 1080 (2560 cores @ 1607 MHz, 8 GB GDDR5). En la Fig. 6 se muestran distintos planos en  $z$  de la pila sintetizada y el resultado correspondiente. El método logra estimar la estructura real incluso en los planos donde la información está totalmente enmascarada.

Se realizaron pruebas para evaluar el rendimiento del método cuando se utiliza una cantidad de fuentes virtuales es-

casa en comparación con la óptima. Para este análisis, se procesó con SUPPOSE la misma pila de imágenes sintéticas de la Fig. 5, pero utilizando 200 fuentes virtuales, mientras que la solución anterior para esta muestra se obtuvo con 3000. El resultado puede verse en la Fig. 7, donde se observa que SUPPOSE logra definir la estructura distribuyendo las pocas fuentes virtuales disponibles sobre la superficie

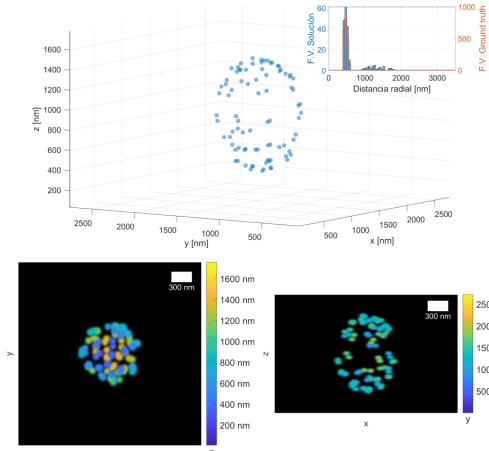


**FIG. 5:** Solución SUPPOSE obtenida tras procesar la estructura sintética de un cascarón de elipsoide (radio lateral de 432 nm y radio axial de 560 nm). En la fila superior se muestra la estructura verdadera, las fuentes están distribuidas de manera casi uniforme en la superficie de la elipsoide. En la fila inferior se muestran las coordenadas de la solución SUPPOSE obtenida junto con el histograma de las distancias de dichas fuentes al centro de la estructura.



**FIG. 6:** Comparación de distintos planos de la pila sintética del elipsoide (izquierda) y la reconstrucción SUPPOSE respectiva (derecha).

del elipsoide. Una ejecución como esta puede ser una alternativa rápida (en este caso llevó 1 hora, es decir, una quinta parte de la ejecución completa) para observar y validar la forma aproximada del objeto que se desea reconstruir, antes de realizar una ejecución con la cantidad de fuentes deseada y que lleve el tiempo completo.

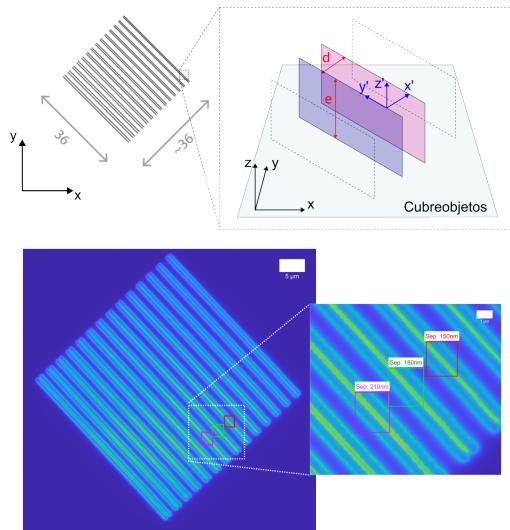


**FIG. 7:** Solución SUPPOSE para la estructura sintética del elipsoide utilizando una cantidad de fuentes virtuales (200 fuentes) sustancialmente inferior al valor óptimo. En la fila superior se muestran las coordenadas de las fuentes junto con el histograma de las distancias al centro de la estructura comparado con el de la estructura verdadera. En la fila inferior se muestra la proyección en el plano xy/xz de la reconstrucción obtenida.

#### IV. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tras analizar el rendimiento de SUPPOSE con datos sintéticos, se procedió a poner a prueba el método con datos experimentales procedentes de una muestra patrón. Se adquirieron imágenes de una estructura de cintas paralelas presentes en una muestra de calibración Argo-SIM [29] de la marca Argolight utilizando microscopía de epifluorescencia. La estructura de la muestra consiste en una serie de cintas paralelas de altura nominal  $e = 600 \pm 200\text{nm}$  dispuestas de a pares. Las cintas de cada par están separadas una distancia  $d$ , que aumenta gradualmente desde 0 nm hasta 390 nm en pasos de 30 nm. Dado que esta muestra posee una estructura conocida y con gran versatilidad, las primeras pruebas de concepto de pySUPPOSE3D en datos experimentales se llevaron a cabo con dicha muestra. Al estar fabricado con un sustrato fluorescente con índice de refracción similar al del vidrio, se utilizó epifluorescencia de campo amplio para adquirir las imágenes. Se puede ver un diagrama de la estructura en la Fig. 8. El sistema utilizado para las mediciones permite lograr un tamaño de píxel de 33.9 nm en el eje lateral y de 32.6 nm en el eje axial. La muestra fue excitada con luz ultravioleta de longitud de onda  $\lambda = 365\text{nm}$  y presenta un pico de emisión en  $\lambda = 460\text{nm}$ . Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite con magnificación de  $60\times$  y apertura numérica 1.45. La resolución teórica para estos parámetros es  $R_{\text{lateral}} = 158\text{nm}$  y  $R_{\text{axial}} = 437\text{nm}$ . Se estimó la PSF de manera experimental utilizando una muestra de nanoesferas fluorescentes *Termo Fisher TetraSpeck* (modelo T14792 [29]) de 100 nm de diámetro, las cuales emiten en la misma longitud de onda que la muestra Argo-SIM. Se registró la emisión a lo largo del eje axial de múltiples nanopartículas. Sumando estas contribuciones se obtuvo una pila de imágenes correspondiente a la estimación de la PSF. La PSF estimada se utiliza de forma directa en la operación de convolución implementada en el algoritmo, mediante la forma de una tabla de consultas (LUT). Esto último se desarrolla con más detalle en la Sección V.

Se procesaron con SUPPOSE las imágenes de los pares de cintas separadas 210 nm, 180 nm y 150 nm, por ser las que se encuentran a distancias similares a la resolución teórica del sistema. Para ello, se seleccionó una región de interés para cada conjunto de cintas. El tamaño de las regiones seleccionadas es del orden de  $2.20 \times 2.37 \times 1.53 \mu\text{m}^3$ . Estas regiones se encuentran marcadas en la imagen de la Fig. 8.



**FIG. 8:** Muestra Argolight Argo-SIM. En la fila superior, un diagrama esquemático de la estructura tridimensional de la muestra utilizada. En la fila inferior, una de las imágenes adquiridas donde se marcan las regiones de interés procesadas (cintas separadas 210 nm, 180 nm y 150 nm).

SUPPOSE se ejecutó con 7000 fuentes virtuales y las corridas tardaron aproximadamente 19 horas en completarse. En la Fig. 10 se muestran los resultados para las tres separaciones de las cintas procesadas. A la izquierda se muestra la comparación entre la imagen central de la pila adquirida y la reconstrucción SUPPOSE. A la derecha se muestra la proyección  $x, z$  de esta comparación.

Se puede observar en las imágenes adquiridas que la información de la distancia entre cintas está fuertemente enmascarada, siendo indistinguible para el caso de cintas separadas a 150 nm. En todos los casos, la solución SUPPOSE logra una mejora en la resolución y hace que sea posible definir la separación entre las estructuras. Se midió la distancia entre las cintas a lo largo de la dirección transversal a la estructura en las reconstrucciones SUPPOSE obtenidas y se registraron valores promedio de 220 nm, 190 nm y 150 nm para cada caso, que son acordes a los valores teóricos declarados por el fabricante de la muestra.

En las soluciones SUPPOSE obtenidas, se observa una acumulación de fuentes virtuales en el plano central de la pila. A partir de varios análisis realizados utilizando datos sintéticos, se concluyó que este fenómeno se debe a la falta de información en el eje axial de la PSF debido al truncamiento de los datos medidos. Se realizaron pruebas con imágenes de esferas sintéticas variando la longitud axial de la pila de la PSF utilizada para procesarlas; los resultados se muestran en la Fig. 9. Los resultados fueron consistentes con lo observado en datos experimentales y marcan un criterio de decaimiento en la intensidad de la PSF que determina la longitud óptima de la pila a ser medida. Es preciso

destacar que, a pesar de la falta de información de la PSF en el eje axial, SUPPOSE logra obtener una mejora en la resolución lateral.

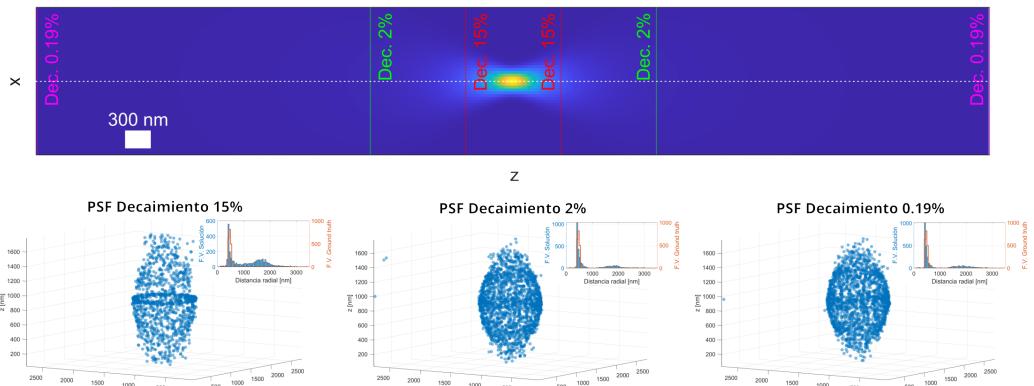
## V. IMPLEMENTACIÓN DEL ALGORITMO

La operación de mayor coste computacional que realiza el algoritmo SUPPOSE es la convolución, de orden  $O(n^6)$  para el caso en tres dimensiones. Esta operación se repite para cada individuo en cada iteración con el fin de evaluar la función objetivo. Esto lleva a que la convolución sea la mayor responsable de los tiempos de ejecución del programa, alrededor del 95 % del tiempo de cómputo total. El código SUPPOSE fue escrito en Python (pySUPPOSE) e implementa la convolución en tarjetas gráficas (GPUs) utilizando la plataforma CUDA de Nvidia. Esta implementación reduce notablemente el tiempo de la convolución en comparación con la utilización de una CPU. En el contexto de datos en tres dimensiones, el proceso de carga de la información de la PSF del sistema representa un desafío significativo. Para esto se implementó la convolución por tabla de consulta o LUT. Se trata de una estructura de datos que permite sustituir toda una rutina o cálculo por una indexación de una tabla. De esta manera, es posible poseer datos precalculados a los que el programa puede acceder rápidamente en lugar de efectuar la operación una y otra vez. En este caso, la PSF se carga como una LUT, de manera que se utilice la información de la tabla en la operación de convolución. Esta mejora no solo permite reducir aún más los tiempos de cómputo, sino que también permite utilizar PSF no analíticas precalculadas o adquiridas directamente del sistema óptico. Para cada fuente virtual, se interpola la PSF obtenida de la tabla para centrar la función en esa posición. Este proceso se repite para todas las fuentes virtuales y, al ir sumando la contribución de cada PSF, se obtiene la imagen final que se utilizará para evaluar la función objetivo. Como este proceso debe repetirse para cada fuente, el coste computacional aumenta linealmente con el número de fuentes virtuales utilizadas.

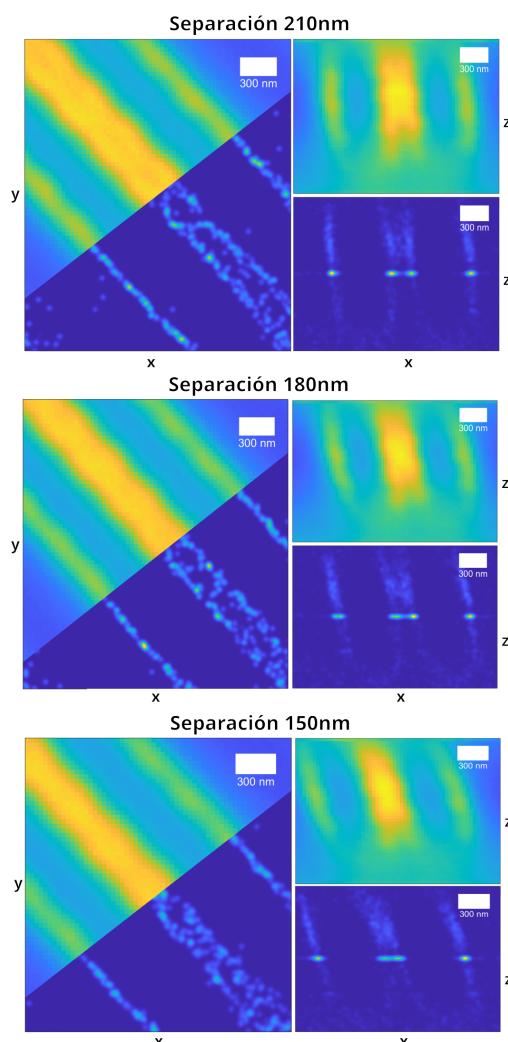
En la Fig. 11 se exponen los resultados de la comparación de tiempos de la convolución en función de la cantidad de fuentes y de la cantidad de píxeles de la imagen para el caso de ejecuciones realizadas en CPU, GPU y GPU+LUT. Se observa que hay grandes saltos de rendimiento tanto entre CPU y GPU como entre GPU y GPU+LUT. Es importante señalar que todas estas pruebas fueron realizadas para imágenes en dos dimensiones.

## VI. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró ampliar el método pySUPPOSE a estructuras tridimensionales. Para ello, se optimizó el algoritmo, permitiendo superar el desafío que suponía en cuanto a capacidad de cómputo a través de la convolución por tabla de consulta o LUT. El método fue puesto a prueba con estructuras sintéticas de distintas geometrías y estructuras experimentales de dimensiones conocidas, obteniendo resultados satisfactorios. Es relevante destacar que, incluso en condiciones de medición desafiantes, como un alto nivel de ruido o una escasa cantidad de fuentes virtuales elegidas, la solución SUPPOSE logra reconstruir la estructura subyacente. Se observó que es fundamental contar con un rango

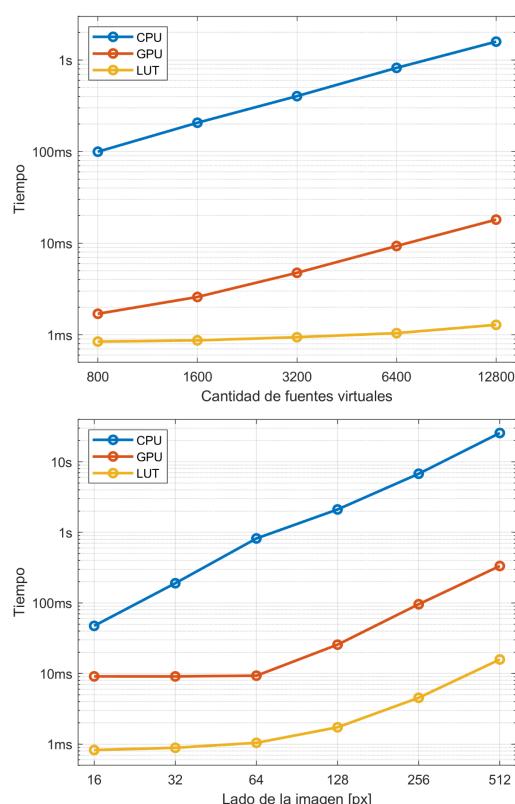


**FIG. 9:** Análisis de la influencia del truncamiento de la PSF en el resultado obtenido. En la fila superior se muestran las distintas PSF utilizadas para el análisis. En la fila inferior se muestran los resultados SUPPOSE obtenidos para los distintos casos.



**FIG. 10:** Comparación entre las imágenes adquiridas y la reconstrucción SUPPOSE para las tres separaciones entre las cintas procesadas. A la izquierda se muestra la comparación entre la imagen central de la pila adquirida y la reconstrucción SUPPOSE. A la derecha se muestra la comparación entre la proyección axial en el plano x,z

axial de la estimación de la PSF que asegure un decaimiento de intensidad al menos del 2 % respecto a su valor máximo, con el propósito de evitar artificios de aglomeración en el plano central de la pila de imágenes adquiridas.



**FIG. 11:** Comparación de tiempos de ejecución de una convolución realizada en CPU, GPU y GPU + LUT para imágenes de dos dimensiones. En función de la cantidad de fuentes virtuales (Superior). En función del lado de la imagen para el caso de una imagen cuadrada (Inferior).

## REFERENCIAS

- [1] S. J. Sahl y S. W. Hell. High-Resolution 3D Light Microscopy with STED and RESOLFT en *High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology: New Frontiers in Biomedical Optics* (ed. Bille, J. F.) Cham, 2019. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16638-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16638-0_1).
- [2] D. Wildanger, R. Medda, L. Kastrup y S. Hell. A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution. *Journal of microscopy* **236**, 35-43 (2009). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03188.x>.
- [3] R. Heintzmann y T. Huser. Super-resolution structured illumination microscopy. *Chemical reviews* **117**, 13890-13908 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00218>.

- [4] J. Huff. *The Airyscan detector from ZEISS: confocal imaging with improved signal-to-noise ratio and super-resolution* 2015. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.388>.
- [5] D. Sage, L. Donati, F. Soulez, D. Fortun, G. Schmit, A. Seitz, R. Guiet, C. Vonesch y M. Unser. DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy. *Methods* **115**, 28-41 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2016.12.015>.
- [6] A. N. Tikhonov. *On the solution of ill-posed problems and the method of regularization* en *Doklady Akademii Nauk* **151** (1963), 501-504. <https://www.mathnet.ru/eng/dan28329>.
- [7] N. Wiener. *Extrapolation, interpolation, and smoothing of stationary time series: with engineering applications* <https://ieeexplore.ieee.org/servlet/opac?bknumber=6267356> (MIT Press, 1964).
- [8] L. Landweber. An iteration formula for Fredholm integral equations of the first kind. *American journal of mathematics* **73**, 615-624 (1951). <https://doi.org/10.2307/2372313>.
- [9] W. H. Richardson. Bayesian-based iterative method of image restoration. *JoSA* **62**, 55-59 (1972). <https://doi.org/10.1364/JOSA.62.000055>.
- [10] L. B. Lucy. An iterative technique for the rectification of observed distributions. *The astronomical journal* **79**, 745 (1974). <https://doi.org/10.1086/111605>.
- [11] A. Beck y M. Teboulle. A fast iterative shrinkage-thresholding algorithm for linear inverse problems. *SIAM journal on imaging sciences* **2**, 183-202 (2009). <https://doi.org/10.1137/080716542>.
- [12] N. Dey, L. Blanc-Feraud, C. Zimmer, P. Roux, Z. Kam, J.-C. Olivo-Marin y J. Zerubia. Richardson-Lucy algorithm with total variation regularization for 3D confocal microscope deconvolution. *Microscopy research and technique* **69**, 260-266 (2006). <https://doi.org/10.1002/jemt.20294>.
- [13] E. Torres-García, R. Pinto-Cámara, A. Linares, D. Martínez, V. Abenza, E. Brito-Alarcón, C. Calcines-Cruz, G. Valdés-Galindo, D. Torres, M. Jabłoński *et al.* Extending resolution within a single imaging frame. *Nature Communications* **13**, 7452 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34693-9>.
- [14] S. Martínez, M. Toscani y O. E. Martínez. Superresolution method for a single wide-field image deconvolution by superposition of point sources. *Journal of Microscopy* **275**, 51-65 (2019). <https://doi.org/10.1111/jmi.12802>.
- [15] M. Toscani, S. Martínez y O. E. Martínez. *Single image deconvolution with super-resolution using the SUPPOSE algorithm* en *Single Molecule Spectroscopy and Superresolution Imaging XII* **10884** (2019), 1088415. <https://doi.org/10.1117/12.2508869>.
- [16] G. D. B. Vazquez, S. Martínez y O. E. Martínez. Super-resolved edge detection in optical microscopy images by superposition of virtual point sources. *Optics Express* **28**, 25319-25334 (2020). <https://doi.org/10.1364/OE.397125>.
- [17] M. Toscani, A. Mazzeo, S. Martínez, O. Martínez, A. Lacapmesure y G. B. Vazquez. *Fuentes de error, artificios, aceleración y validación del algoritmo de deconvolución con super-resolución para imágenes de microscopía* en *2020 IEEE Congreso Bienal de Argentina (ARGENCON)* (2020), 1-7.
- [18] M. Toscani y S. Martínez. Solving the boundary artifact for the enhanced deconvolution algorithm SUPPOSE applied to fluorescence microscopy. *Computer Optics* **45**, 418-426 (2021). <https://doi.org/10.18287/2412-6179-co-825>.
- [19] M. Toscani, O. E. Martínez y S. Martínez. Resolution, accuracy and precision in super-resolved microscopy images using SUPPOSE. *Optics and Lasers in Engineering* **161**, 107337 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2022.107337>.
- [20] A. M. Lacapmesure, G. D. B. Vazquez, A. Mazzeo, S. Martínez y O. E. Martínez. Combining deep learning with SUPPOSE and compressed sensing for SNR-enhanced localization of overlapping emitters. *Appl. Opt.* **61**, D39-D49 (2022). <https://doi.org/10.1364/AO.444610>.
- [21] M. Toscani y A. M. Lacapmesure. Improving STED microscopy with SUPPOSE: enhancing resolution from a single-image. *Methods and Applications in Fluorescence* **12**, 025004 (2024). <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ad31b8>.
- [22] M. J. Rust, M. Bates y X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods* **3**, 793-796 (2006). <https://doi.org/10.1038/nmeth929>.
- [23] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz y H. F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642-1645 (2006). <https://doi.org/10.1126/science.1127344>.
- [24] S. T. Hess, T. P. Girirajan y M. D. Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical journal* **91**, 4258-4272 (2006). <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091116>.
- [25] F. Huang, S. L. Schwartz, J. M. Byars y K. A. Lidke. Simultaneous multiple-emitter fitting for single molecule super-resolution imaging. *Biomedical optics express* **2**, 1377-1393 (2011). <https://doi.org/10.1364/BOE.2.001377>.
- [26] B. Huang, W. Wang, M. Bates y X. Zhuang. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science* **319**, 810-813 (2008). <https://doi.org/10.1126/science.1153529>.
- [27] M. F. Juette, T. J. Gould, M. D. Lessard, M. J. Mlodzianoski, B. S. Nagpure, B. T. Bennett, S. T. Hess y J. Bewersdorf. Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. *Nature methods* **5**, 527-529 (2008). <https://doi.org/10.1038/nmeth.1211>.
- [28] C. G. Koay. A simple scheme for generating nearly uniform distribution of antipodally symmetric points on the unit sphere. *Journal of computational science* **2**, 377-381 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.jocs.2011.06.007>.
- [29] M. E. Charrut. *Repositorio del Microscopio TIRF 3D* 2023. <https://gitlab.com/labofotonica/microscopio-tirf-3d>.