

# Algoritmos Iterativos de Tomografía Tridimensional en Microscopía Electrónica de Transmisión

Carlos Óscar Sánchez Sorzano

23 de enero de 2002

# Índice general

<b>Objetivos</b>	<b>v</b>
<b>I Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción a la microscopía electrónica tridimensional</b>	<b>3</b>
1.1. Introducción a la biología estructural . . . . .	3
1.2. Introducción a la microscopía electrónica de transmisión . . . . .	7
1.3. Introducción a la reconstrucción tridimensional . . . . .	11
<b>2. Fundamentos de Tomografía</b>	<b>15</b>
2.1. Concepto . . . . .	15
2.1.1. Técnica tomográfica . . . . .	15
2.1.2. Dirección y orientación de la proyección . . . . .	17
2.1.3. Teorema de la sección central . . . . .	20
2.1.4. Revisión de los algoritmos de reconstrucción tomográfica	22
2.2. Expansión en serie del volumen solución . . . . .	24
2.2.1. Rejillas de expansión . . . . .	24
2.2.2. Funciones de Kaiser-Bessel modificadas como base . . .	26
2.3. Algoritmos iterativos basados en expansión en serie . . . . .	29
2.3.1. Planteamiento algebraico del problema tomográfico . . . .	29
2.3.2. Técnicas de reconstrucción algebraica (ART) . . . . .	32
2.3.3. Algoritmos . . . . .	36
<b>II Materiales y métodos</b>	<b>39</b>
<b>3. Mejoras al proceso de reconstrucción basado en ART</b>	<b>41</b>

3.1.	Optimización del proceso de reconstrucción . . . . .	41
3.1.1.	Reducción del espacio de reconstrucción . . . . .	41
3.1.2.	Optimización de los parámetros del blob . . . . .	43
3.1.3.	Optimización de los parámetros libres del algoritmo de reconstrucción ART . . . . .	48
3.1.4.	Simulaciones . . . . .	48
3.1.5.	Evaluadores numéricos: Figuras de Mérito . . . . .	51
3.1.6.	Metodología de optimización de parámetros . . . . .	57
3.1.7.	Variabilidad de los parámetros libres . . . . .	61
3.2.	Orden de las proyecciones . . . . .	66
3.3.	Normalización de las proyecciones . . . . .	67
3.4.	Imposición de restricciones de simetría . . . . .	71
3.5.	Ecuaciones a nivel volumétrico . . . . .	77
3.5.1.	Planteamiento de las ecuaciones volumétricas . . . . .	77
3.5.2.	Imposición de restricciones de positividad . . . . .	78
3.5.3.	Imposición de restricciones de volumen . . . . .	80
3.5.4.	Imposición de restricciones de superficie . . . . .	81
3.5.5.	Solución inicial . . . . .	85
3.6.	Corrección de la función de transferencia del microscopio . . . . .	86
3.6.1.	Identificación de la función de transferencia . . . . .	86
3.6.2.	Corrección de fase . . . . .	108
3.6.3.	Corrección de amplitud vía refinamiento iterativo de datos . . . . .	108
3.7.	Protocolo de reconstrucción . . . . .	112
<b>4.</b>	<b>Extensión del método de reconstrucción basado en ART: Cristales</b>	<b>115</b>
4.1.	Planteamiento de la reconstrucción cristalográfica . . . . .	115
4.2.	Muestreo del volumen a reconstruir . . . . .	118
4.3.	Muestreo del espacio de proyecciones . . . . .	121
4.4.	Algoritmos . . . . .	124
4.5.	Protocolo de reconstrucción . . . . .	127

### **III Resultados 129**

<b>5.</b>	<b>Aplicación</b>	<b>131</b>
5.1.	Optimización del factor de relajación . . . . .	132
5.1.1.	Optimización bajo unas condiciones concretas . . . . .	135
5.1.2.	Variabilidad . . . . .	136

5.1.3. Importancia de la optimización . . . . .	139
5.2. Optimización de la ordenación de las proyecciones . . . . .	143
5.3. Optimización de los parámetros de estimación ARMA . . . . .	143
5.4. Optimización de las restricciones de superficie . . . . .	147
5.5. Optimización del factor de relajación de IDR . . . . .	148
5.6. Determinación de la CTF . . . . .	150
5.7. Reconstrucción de partículas individuales . . . . .	155
5.7.1. Reconstrucción de un phantom sencillo . . . . .	155
5.7.2. Reconstrucción de un <i>phantom</i> realista . . . . .	163
5.7.3. Reconstrucción de una macromolécula real . . . . .	167
5.8. Reconstrucción de virus icosaédricos . . . . .	172
5.9. Reconstrucción de cristales . . . . .	174
5.9.1. Reconstrucción de cristales <i>phantoms</i> . . . . .	174
5.9.2. Reconstrucción de un cristal real . . . . .	175
<b>IV Discusión</b>	<b>179</b>
<b>6. Discusión</b>	<b>181</b>
<b>V Conclusiones y planes de futuro</b>	<b>191</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>193</b>
<b>8. Planes de futuro</b>	<b>195</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>197</b>



# Objetivos

La biología molecular se perfila actualmente como un vasto campo dirigido al estudio y conocimiento de los componentes elementales en el desarrollo de la vida celular. El objetivo es la caracterización de los complejos moleculares (proteínas, DNA, RNA, así como sus complejos macromoleculares) y su interrelación. Principalmente dichos complejos definen la función y dinámica de una célula viva. De este conocimiento se desprende la posibilidad de actuar a nivel intra e intercelular en diversas enfermedades mediante el diseño de medicamentos específicos, la detección precoz de otras, modificar genéticamente especies para que muestren una determinada característica, el establecimiento de líneas evolutivas tanto a nivel de genes como de especies, ... Como vemos, el interés por este tipo de estudios trasciende más allá del conocimiento meramente científico, ya que sus aplicaciones pueden mejorar notablemente nuestras condiciones de vida.

Dentro del campo de la biología molecular nos encontramos con la biología estructural cuyo objetivo es la determinación de la estructura tridimensional de los complejos macromoleculares implicados en los diferentes procesos. De entre las diferentes estructuras susceptibles de estudio, centraremos nuestro interés en la conformación de proteínas o agregados proteicos ya que son los que desarrollan principalmente "la vida inteligente" de la célula. Este interés por su forma se basa en la premisa de que la función de una proteína está muy ligada a la estructura tridimensional que adquiere en el espacio. De tal modo que cambios en su estado de actividad puede responder a cambios conformacionales, o que proteínas de composición bien distinta que realizan la misma función pueden compartir una estructura similar.

En principio, podemos distinguir dos aproximaciones distintas a la obtención de la conformación que una macromolécula adopta en el espacio: una trata de predecir dicha estructura en base a una información *a priori* de la molécula tales como secuencia de aminoácidos, función o familia, combinada con información de similaridad con otras moléculas de estructura conocida; por el contrario, la segun-

da infiere la estructura tridimensional a partir de datos experimentales dirigidos a conocer su forma mediante técnicas tales como rayos X, resonancia magnética nuclear o microscopía electrónica. Cada una tiene sus limitaciones y, por tanto, un rango de aplicación: los rayos X permiten la obtención de información estructural a muy alta resolución con la condición de que el espécimen bajo estudio forme un cristal, lo cual no es fácil y tanto menos cuanto el peso molecular de la partícula aumenta; la resonancia magnética nuclear también permite la obtención de datos de alta resolución, pero con unas limitaciones de tamaño mucho mayores que en rayos X; por último, la microscopía electrónica de transmisión no impone condiciones al espécimen en estudio con el inconveniente de que la información recogida es de mucho menor calidad que con las otras dos técnicas. Es por ello, que estas técnicas experimentales se ven asociadas al empleo de potentes algoritmos de procesamiento de imagen que traten de paliar tal limitación. El resultado es que en la actualidad la resolución alcanzada por estudios realizados por microscopía cada vez se acerca más a las cotas alcanzadas tanto por la difracción de rayos X como por la resonancia magnética nuclear.

En este contexto, la presente tesis pretende caracterizar los algoritmos de reconstrucción tridimensional empleados en microscopía electrónica y mejorar el protocolo de reconstrucción desde el punto de vista de teoría de señal. Centramos nuestro estudio en las denominadas "partículas individuales", que es el nombre que recibe el caso particular en que los agregados macromoleculares no forman una estructura ordenada en el espacio, tal como un cristal o una hélice. En concreto, concentraremos nuestro análisis en el algoritmo iterativo conocido como ART (Algebraic Reconstruction Technique) y en diversas variaciones sobre el mismo. Dicho algoritmo pertenece a una familia denominada métodos de expansión en serie del volumen a reconstruir, ya que tratan de determinar el conjunto de coeficientes adecuado para una determinada expansión en serie del volumen solución. En general, cualquier algoritmo de tomografía tridimensional recibe una serie de imágenes de proyección (transformadas de rayos X) del espécimen bajo estudio y devuelve la estructura tridimensional que, desde algún punto de vista, "mejor" concuerda con dichas proyecciones. La tesis propuesta abordará los siguientes puntos:

- Definición del algoritmo sobre rejillas de expansión diferentes a la cúbica (rejillas centradas en el cuerpo y centradas en las caras) y con funciones base distintas de los vóxeles (funciones de Kaiser-Bessel o blobs), ya que estas otras expansiones se han mostrado útiles en tomografía aplicada a otros campos.

- Determinación de los parámetros óptimos de rejilla y blob para la consecución de unos objetivos determinados de resolución y tiempo de computación. Es decir, dada una resolución objetivo seleccionar aquel blob y rejilla que minimizan el tiempo de cómputo.
- Diseño de una metodología de comparación objetiva de resultados basada en simulación de datos, reconstrucción de los mismos y posterior evaluación de los resultados por medio de observadores numéricos (*Figures of Merit*, o FOMs). Esta metodología ya ha sido aplicada con éxito tanto en tomografía médica como en biología estructural.
- Modelado de la función de transferencia del microscopio electrónico de transmisión bajos dos técnicas de preparación de espécimen diferentes: criomicroscopía y tinción negativa. Este modelado ayudará a una simulación más realista de las condiciones experimentales.
- Aplicación de la metodología de comparación a la optimización de los parámetros libres presentes en el algoritmo (número de iteraciones y factor de relajación) en distintas situaciones aplicables a la microscopía electrónica de partículas individuales. En este punto se pretenderán describir pautas de comportamiento del algoritmo de reconstrucción frente a variables como nivel de ruido, número de imágenes, tamaño de las mismas, ...
- Estudio de la influencia del ordenamiento de las proyecciones en el resultado final. Como en cualquier algoritmo iterativo, la secuencia de presentación de datos de entrada suele condicionar la reconstrucción obtenida.
- Caracterización e introducción de condiciones de simetría en el propio proceso de reconstrucción. El conocimiento de relaciones de simetría en el interior de la macromolécula a reconstruir constituye una información adicional sobre el volumen que debe ser explotada.
- Aplicación de dicha simetría a la reconstrucción tridimensional de virus.
- Comparación de diferentes métodos de normalización de las proyecciones en el contexto de llegar a imponer la ligadura de positividad al volumen reconstruido. Según el tipo de normalización aplicado a las proyecciones, se puede considerar que el volumen reconstruido debe tener valores no negativos puesto que no tiene sentido una masa negativa.



- Introducción de restricciones de superficie en el proceso de reconstrucción. Estas nuevas ecuaciones permitirán la integración de datos de proyección obtenidos con microscopía electrónica con otros superficiales provenientes de microscopía de fuerza de masas (AFM) o sombreado metálico.
- Introducción de restricciones de volumen de tal forma que se limite la cantidad de masa reconstruida.
- Corrección explícita del efecto ejercido por la función de transferencia del microscopio en el volumen final reconstruido. Esta corrección permitirá el aumento significativo de la resolución alcanzada.
- Extensión de la formulación del algoritmo de tomografía a la reconstrucción de cristales, así este campo podrá beneficiarse de la, en principio, superioridad de este método frente a la inversión directa de la transformada de Fourier.
- Aplicación de las mejoras anteriormente expuestas a la reconstrucción de complejos macromoleculares a partir de datos experimentales (imágenes) de microscopía electrónica, analizando el efecto de la introducción de estas mejoras.

Como consecuencia de las mejoras propuestas en la presente tesis, se prevé un avance significativo en cuanto a la resolución alcanzada en la reconstrucción de partículas individuales, permitiendo así que la flexibilidad y amplio espectro biológico de la técnica experimental de microscopía electrónica de transmisión se vean potenciados con la posibilidad de alcanzar datos estructurales de alta calidad con el consiguiente aporte cualitativo al campo de la biología estructural. Así mismo, se abre la posibilidad de aplicar técnicas de procesado de imagen en el espacio real a campos que tradicionalmente han estado dominado por el procesamiento en el espacio de Fourier (reconstrucción de virus y cristales). Este nuevo enfoque del problema permite la integración de datos estructurales con origen en el microscopio electrónico de transmisión con información proveniente de otras microscopías (AFM o sombreado metálico), así como con otro tipo de información *a priori* tales como el conocimiento de la masa de la partícula a reconstruir o distribución estadística del conjunto de densidades.

# **Parte I**

## **Introducción**



# Capítulo 1

## Introducción a la microscopía electrónica tridimensional

Este capítulo pretende contextualizar la presente tesis dentro del campo de aplicación en el que ha sido concebida: la microscopía electrónica de macromoléculas aisladas en el marco de la biología estructural. Para ello realizaremos un breve acercamiento a cada uno de los diferentes términos (microscopía electrónica, macromoléculas aisladas y biología estructural) con el objeto de caracterizar correctamente el problema a resolver por la tesis así como el entorno en el que se ha desarrollado.

### 1.1. Introducción a la biología estructural

La biología nos enseña que desde los seres vivos unicelulares hasta el más complejo de los pluricelulares puede ser estudiado a nivel local por el comportamiento de su constituyente más elementales: la célula [2]. Independientemente de que una célula constituya en sí misma un ser unicelular o que pertenezca a un complejo entramado celular formando un ser vivo superior, dicha única célula presenta toda la funcionalidad de un ser vivo completo, entre las que figuran funciones tales como la nutrición, reproducción y adaptación a su entorno, además de las funciones en las que la línea celular a la que pertenece se haya especializado dentro del organismo que nos encontremos estudiando.

Para el cumplimiento de todas estas funciones la naturaleza ha desarrollado mecanismos bioquímicos que permiten a cada célula desempeñar la tarea encomendada así como las tareas propias de su mantenimiento. En estos mecanis-

mos bioquímicos se ven envueltas multitud de reacciones químicas en las que las principales protagonistas son moléculas de gran tamaño y complejidad normalmente basadas en muy pocos elementos entre los que destacan el carbono, el oxígeno, el nitrógeno y el hidrógeno. Dichas reacciones forman intrincadas rutas bioquímicas que permiten a la célula temporizar y señalar distintos eventos que a su vez desencadenan nuevas reacciones y así sucesivamente hasta que la función que debe desempeñarse en un momento dado consigue ser efectuada.

Las moléculas implicadas en dichas cadenas de reacción han sido cuidadosamente diseñadas por la naturaleza por medio de procesos de mutación y selección natural hasta alcanzar una gran especificidad en el desempeño de la función a realizar. Es por ello que el estudio profundo de dichas moléculas permite caracterizar de forma constitutiva el comportamiento de una célula, y en último término de un tejido, órgano u organismo. Es más, se ha demostrado [45, 75] que muchas enfermedades actualmente conocidas están relacionadas con alteraciones de las rutas de reacción normalmente generadas ante unas circunstancias determinadas. Por otra parte, la ciencia biológica también nos ha mostrado [1, 140, 106] que alteraciones controladas en dichas reacciones pueden conllevar modificaciones en la resistencia de determinadas especies a agentes en principio nocivos, pueden inducir comportamientos en organismos tales que desempeñen nuevas funciones que resulten beneficiosas para el hombre (por ejemplo, en todo el tema de reciclaje y degradación de sustancias de desecho), pueden modificar la adaptación de ciertas especies al medio de tal forma que puedan desarrollarse en entornos inicialmente hostiles para ellas, y un sinnúmero de nuevas aplicaciones con la que la biología nos sorprende continuamente. Es por estas vertientes económica y de protección de la salud que actualmente se concede una importancia primordial a todas aquellas ramas de la biología que tratan de aumentar nuestro conocimiento sobre el funcionamiento interno de la vida.

Son muchos los tipos de macromoléculas que participan en las reacciones químicas que se producen en el interior de la célula pero se pueden agrupar en grandes familias denominadas glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. A grandes rasgos se puede decir que los glúcidos constituyen la fuente de energía de la célula, los lípidos se emplean para la compartimentalización celular, las proteínas protagonizan toda la vida de la célula y, por último, los ácidos nucleicos son empleados para la conservación de la información necesaria para poder reproducir las proteínas en momentos posteriores así como en células de las siguientes generaciones. Ante esta grosera clasificación se puede comprender que el estudio de las proteínas constituye una pieza clave en la comprensión de la dinámica celular y es por ello comprensible que alrededor de ellas hayan naci-

do numerosas disciplinas (biología molecular, bioquímica, biología estructural, genómica, proteómica, ...) que abordan el problema desde diferentes perspectivas.

En concreto, esta tesis se ha desarrollado en el ámbito de la biología estructural. Esta rama de la biología parte de la suposición de que la función de una proteína está fuertemente ligada a la conformación que adopta en el espacio, sin desdeñar por ello otros factores claramente importantes como puede ser su composición bioquímica.

La estructura de una proteína puede ser estudiada a cuatro niveles: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria [2]. La estructura primaria corresponde a la información de secuencia de aminoácidos, toda la información del plegamiento de una macromolécula se encuentra contenida a este nivel. Secuencias locales de aminoácidos definen la estructura secundaria formada por tres tipos de elementos denominados hélices  $\alpha$ , láminas  $\beta$  y *loops*. La interacción físico-química de los elementos de estructura secundaria entre sí dan lugar a la estructura terciaria, y la agregación de varias estructuras terciarias recibe el nombre de estructura cuaternaria. Ver Figura 1.1

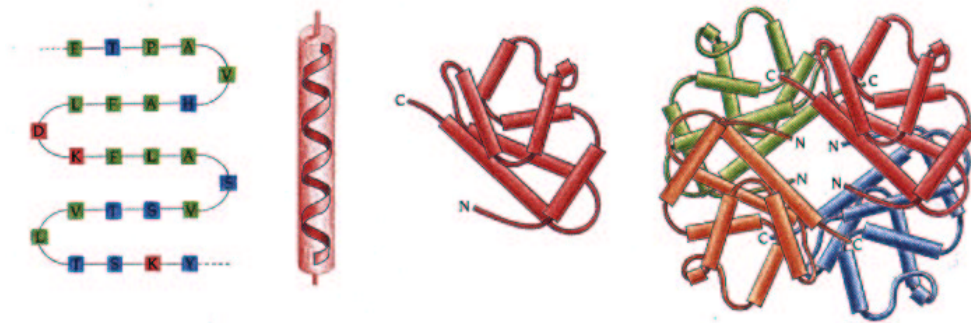


Figura 1.1: De izquierda a derecha: representación esquemática de los niveles de estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

Para estudiar la estructura tridimensional que adopta una proteína en el espacio se han diseñado diferentes estrategias: la primera trata de predecir dicha estructura a partir de los datos bioquímicos que se poseen de ella por medio de la resolución de complejas ecuaciones que definen la interacción de los diferentes átomos que componen la macromolécula; la segunda intenta visualizar la partícula en cuestión utilizando para ello distintas técnicas biofísicas [6] como pueden ser la cristalografía de rayos X, la espectroscopía por resonancia magnética nuclear y la microscopía electrónica de transmisión, ya que otras técnicas más convencionales como

microscopía óptica y microscopía confocal de fluorescencia carecen de la capacidad de resolución suficiente para visualizar partículas tan pequeñas (un tamaño entre 50Å y 5000Å, y un peso molecular que puede llegar hasta los 100 ó 200 kDa).

Todas las técnicas físicas empleadas para visualizar macromoléculas tienen sus ventajas e inconvenientes. Las dos primeras, difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear, proporcionan información de alta calidad. Sin embargo, la difracción de rayos X necesita que un agregado de las macromoléculas en estudio adopte una estructura cristalina, lo cual no es siempre factible y mucho menos cuanto mayor sea el tamaño del complejo a estudiar. La resonancia magnética nuclear hoy día se encuentra limitada al estudio de macromoléculas de pequeño tamaño debido a factores teóricos que pueden ser evitados con la espectroscopía por resonancia magnética nuclear de estado sólido, aunque hasta la fecha aún no se ha resuelto ninguna proteína con esta técnica [6]. Por otra parte, la espectroscopía por resonancia magnética nuclear tiene la ventaja de que permite estudiar las moléculas en solución, no obstante se necesitan altas concentraciones de proteína y que esta posea una alta solubilidad en agua para que los resultados sea interpretables. En cuanto a la microscopía electrónica de transmisión ha sido considerada hasta hace poco como una herramienta de baja resolución, sin embargo durante la última década se han producido importantes avances en las técnicas de preparación (criomicroscopía [24]) y en el dispositivo en sí (filtros de energía [131] y mejoras en la fuente de electrones, FEG, *Field Emission Gun* [159]) que acercan la microscopía electrónica a técnicas de mayor resolución. Por otra parte, las ventajas de la microscopía electrónica frente a las otras dos técnicas son patentes: necesita menor cantidad de proteína, no requiere un estado cristalino de la misma y no impone limitaciones de tamaño a la partícula bajo estudio.

Aunque existen muchas definiciones de resolución, tomaremos como válida aquella que la define como la menor distancia entre dos puntos que aún permita distinguirlos como separados [107]. El rango de interés en el estudio de proteínas y grandes complejos moleculares se encuentra entre 1Å y 50Å. La resolución típica alcanzada por estudios de cristalografía de rayos X o espectroscopía por resonancia magnética nuclear oscila entre 1Å y 3Å, mientras que en los últimos estudios de microscopía electrónica se alcanzan hasta 7.5Å de resolución [111]. En estos términos debemos aclarar que una resolución alrededor de los 30Å proporciona la forma general de una proteína, los elementos de estructura secundaria [2] se empiezan a ver a unos 7Å de resolución, las cadenas de aminoácidos sobre los 3-4Å y a 1-2Å se pueden localizar los átomos de forma aislada.

## 1.2. Introducción a la microscopía electrónica de transmisión

Como ya se ha introducido en la sección anterior, la microscopía electrónica de transmisión es una técnica estructural de baja-media resolución que cada vez se perfila más como una herramienta poderosa para realizar estudios estructurales a media-alta resolución. Su funcionamiento es similar al de la microscopía óptica salvo por el hecho que el haz de "luz" incidente no se compone por fotones de una determinada longitud de onda sino que son electrones acelerados por una considerable diferencia de potencial, la energía cinética adquirida es la que les confiere su poder resolutivo al llevar asociadas longitudes de onda muy inferiores a las de la luz visible y ultravioleta (ver sección 3.6).

La figura 1.2 muestra un esquema de construcción del microscopio electrónico [47]. Los electrones son producidos por un filamento (cátodo) a alta temperatura en la parte superior del microscopio y son acelerados por una fuerte diferencia de potencial, típicamente superior a los 100kV, producida por la presencia cercana de un ánodo en la que se ha practicado un diminuto orificio por el que salen los electrones en dirección a la columna del microscopio (de una altura cercana a los 2m). Puesto que los electrones son dispersados por fenómenos de colisión con moléculas de gases, es necesario que se haga un fuerte vacío en el interior de la columna de manera que el haz electrónico alcance la muestra situada en el portamuestras. A lo largo de su trayectoria dicho haz es focalizado por medio de dos lentes magnéticas (lente condensadora y lente objetivo) de forma similar a la que las lentes de un microscopio óptico focalizan la luz. Algunos de los electrones del haz son dispersados por la muestra, otros interactúan con los átomos de la misma modificando únicamente su fase y el resto atraviesan la columna sin sufrir alteración alguna. La interacción de los electrones con la muestra será tanto mayor cuanto mayor sea la densidad local del material. En el fondo de la columna se encuentra el sistema de registro de imagen que bien puede ser analógico, compuesto por una pantalla fosforescente y una película fotográfica, o digital, formado por una cámara CCD. La imagen así formada recibe el nombre de micrografía.

En general se puede afirmar que una radiación determinada no puede utilizarse para resolver detalles estructurales menores que la mitad de su longitud de onda. Esta afirmación limita teóricamente la resolución de un microscopio óptico a unos  $0.2 \mu\text{m}$  y la de un microscopio electrónico a  $0.002 \text{ nm}$  [107]. Sin embargo, esta capacidad resolutiva se ve empañada por multitud de factores experimentales los cuales pueden ser clasificados según su fuente en factores intrínsecos al micros-



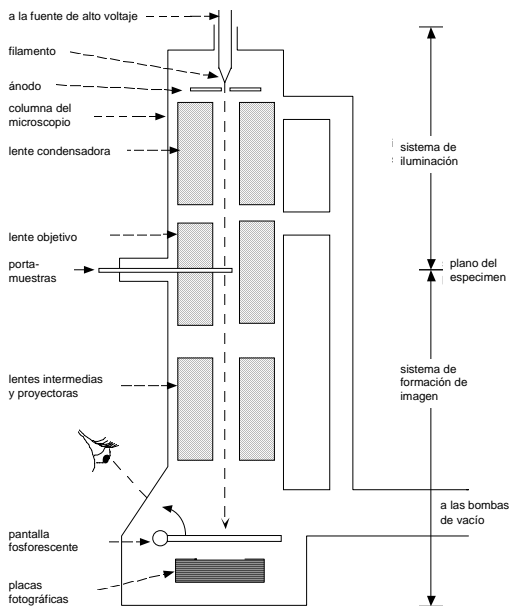


Figura 1.2: Corte longitudinal del tubo de formación de imagen en un microscopio electrónico de transmisión.

copio y factores asociados a la preparación de la muestra dando ambos lugar a fuertes degradaciones de la calidad de imagen.

Los factores ligados al microscopio tienen que ver principalmente con la estabilidad de todas las corrientes eléctricas asociadas tanto a la generación de los electrones como a su focalización. Estas inestabilidades provocan fuertes aberraciones de las lentes mucho más difíciles de corregir que en el caso óptico. De esta forma se limita la resolución del microscopio electrónico hasta los 0.1 nm.

Por otra parte, la preparación de la muestra impone fuertes limitaciones a la resolución alcanzada. El espécimen se encuentra en una situación de alto vacío en el interior de la columna por lo que se debe emplear algún modo de fijar su conformación espacial. Actualmente son dos las técnicas más empleadas a tal efecto: la tinción negativa [32] y la criomicroscopía [24]. La tinción negativa deposita sobre el espécimen una sal metálica (ver figura 1.3) y el contraste en la micrografía viene dado principalmente por la interacción de los electrones con las moléculas

de dicha sal, así pues esta técnica tan sólo proporciona información sobre la superficie exterior de la macromolécula bajo estudio. Además, podemos encontrarnos problemas de tinción parcial, la sal no llega a recubrir la totalidad de la altura del espécimen, o de deformaciones flexibles de la macromolécula bajo el peso del agente de tinción. La segunda técnica, criomicroscopía, congela en un tiempo ultracorto una solución purificada de la proteína en estudio. La rápida congelación de la muestra evita la formación de cristales de hielo que harían más difícil la interpretación de los resultados. Las principales ventajas de esta segunda técnica [68] son que la proteína se encuentra en un entorno más parecido al natural por lo que las deformaciones estructurales serán menores y que, ahora, sí se dispone de información proveniente del interior de la macromolécula. Por contra, el contraste de las imágenes es mucho menor al estar provocado con átomos de mucho menor número atómico que en el caso de la sal metálica.

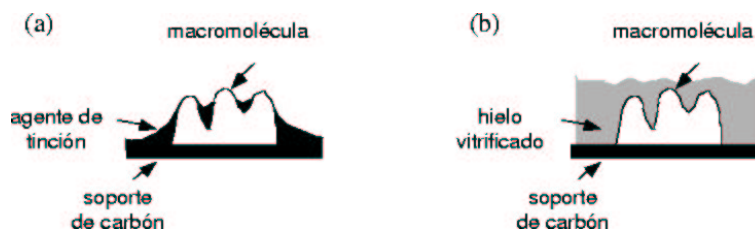


Figura 1.3: Representación esquemática de (a) la tinción negativa y (b) la criomicroscopía.

En cualquiera de los dos casos es necesario añadir una película de carbón que dote de rigidez mecánica a la muestra. Esta película tiene un grosor aproximado de  $10000\text{\AA}$  frente a los  $5000\text{\AA}$  que ocupa el espécimen como máximo. Sin embargo, la tecnología ha avanzado en este sentido y actualmente se han conseguido micrografías de criomuestras en las que no se ha utilizado una película de carbón [14, 31].

Otro factor limitante de la resolución en la reconstrucción tridimensional de partículas aisladas es la variabilidad biológica. Para realizar tal reconstrucción se combinan imágenes de proyección procedentes de multitud de distintas macromoléculas, supuestas todas iguales en forma. No obstante, esto no es sino una aproximación puesto que diferencias en el agente de tinción o de su entorno pueden modificar ligeramente la estructura flexible de la proteína en estudio.

Por último debemos mencionar la acción destructiva que la radiación electrónica ejerce sobre la muestra biológica. Dicha destrucción impide la visualización de detalles estructurales de alta resolución, por lo que para minimizar su

impacto y obtener imágenes de alta calidad se disminuye la dosis de radiación empleada, sin embargo estas micrografías con menor dosis también presentan un menor contraste.

Para finalizar podemos concluir que las micrografías obtenidas por microscopía electrónica se caracterizan por un bajo contraste de la señal frente al ruido, presentando una relación señal a ruido, SNR, por debajo de 1/2 (la figura 1.4 muestra un ejemplo de micrografía) y por una resolución muy por debajo de la teórica impuesta por las limitaciones del microscopio. No obstante, a pesar de todos estos inconvenientes se han logrado hacer reconstrucciones a alta resolución de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa a 6Å [156], de la subunidad 50S del ribosoma de *Escherichia Coli* a 7.5Å [111], de la cápsida del *Semliki Forest virus* a 9Å [95], del ribosoma 70S de *Escherichia Coli* a 11.5Å [53], de GroEL a 11.5Å [93] y de la cápsida del bacteriófago HK97 a 12Å [155].

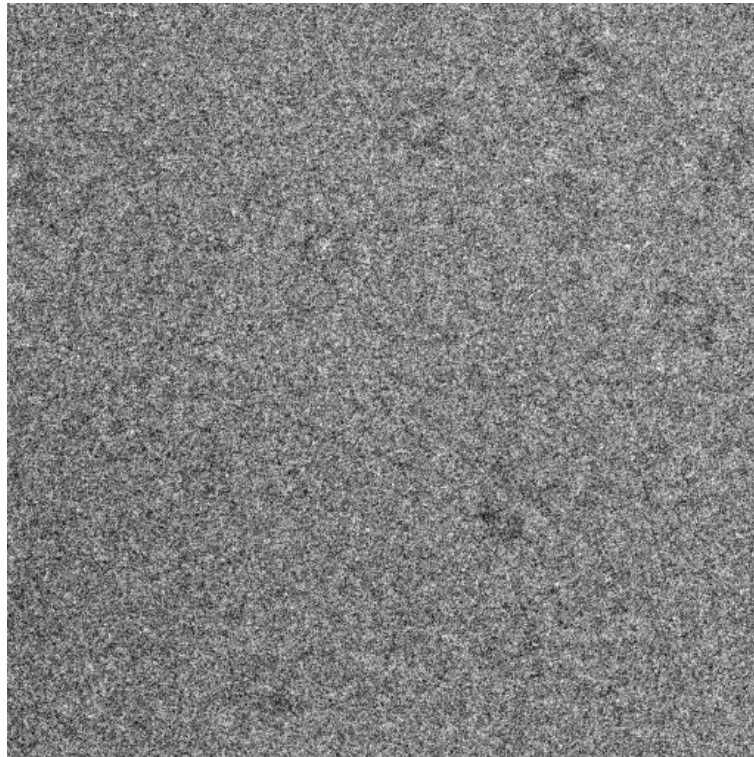


Figura 1.4: Criomicrografía de ejemplo, en este caso no se utilizó soporte de carbón.

### 1.3. Introducción a la reconstrucción tridimensional

Aunque este aspecto se desarrolla en más profundidad en el capítulo 2 y a lo largo de toda la tesis, conviene en esta introducción aclarar los principales aspectos relacionados con ella.

Bajo la suposición de que el espécimen es relativamente fino con respecto a la profundidad de foco del microscopio, *Weak Phase Object*, se puede demostrar que la imagen adquirida es una imagen de proyección [61], un ejemplo cotidiano de imágenes de proyección son las obtenidas por radiografía convencional. En este punto entra en juego una técnica matemática conocida como tomografía que resuelve la estructura tridimensional de la macromolécula que generó tales proyecciones. Existen muchas aproximaciones a la solución de este problema y en esta tesis se ha ampliado el campo de acción y mejorado los resultados obtenidos por un algoritmo iterativo de reconstrucción tridimensional conocido como ART (*Algebraic Reconstruction Technique*).

Sin embargo, son muchas las etapas por las que pasa un conjunto de micrografías antes de producir una estructura tridimensional. Un breve repaso del estado actual de las mismas contextualizará convenientemente la presente tesis (compárese este protocolo de reconstrucción con el propuesto en la sección 3.7)

1. Suponiendo que la micrografía se encuentra en soporte fotográfico, el primer paso hacia una reconstrucción tridimensional consiste en la digitalización correcta de la misma de forma que pueda ser tratada por un ordenador.
2. Posteriormente se procede a la selección y extracción de aquellas regiones dentro de la micrografía que efectivamente corresponden a proyecciones de la proteína estudiada.
3. A continuación se realiza una normalización de las imágenes de proyección con el objetivo de homogeneizar los niveles de densidad de gris de imágenes procedentes de distintas micrografías.
4. Un primer paso de alineamiento traslacional y, dependiendo del caso, rotacional, es necesario para centrar todas las imágenes de proyección y colocarlas en un mismo marco geométrico.
5. Llegados a este punto podemos inventanar las imágenes para eliminar aquellas zonas en las que con seguridad no hay proyección de la proteína. De este modo se elimina parte del ruido.

6. Se suele proseguir con una clasificación de las imágenes de forma que se detecten posibles diferentes conformaciones y se desechen proyecciones que no correspondan a la partícula estudiada.
7. Se procede a una asignación angular, es decir, la determinación de la dirección desde la que cada imagen ha sido proyectada.
8. Finalmente ya estamos en condiciones de realizar la reconstrucción tridimensional. Habitualmente se suelen combinar varios ciclos de asignación angular y reconstrucción tridimensional con la intención de refinar las posiciones angulares de las proyecciones.
9. Por último, se segmenta y visualiza el resultado obtenido.

Como se puede comprobar el papel que las técnicas de teoría de señal, procesamiento de imágenes y las técnicas matemáticas relacionadas juegan un papel fundamental en el proceso ya que posibilitan una máxima extracción de información en un entorno nada favorable como son las imágenes de proyección obtenidas en el microscopio electrónico de transmisión con todas sus restricciones de muy baja relación señal a ruido, SNR, y ancho de banda frecuencial limitado.

En resumen, podemos definir la etapa de reconstrucción tridimensional como aquella que pasa de las micrografías como la mostrada en la figura 1.4 a volúmenes como el mostrado en isosuperficie en la figura 1.5.

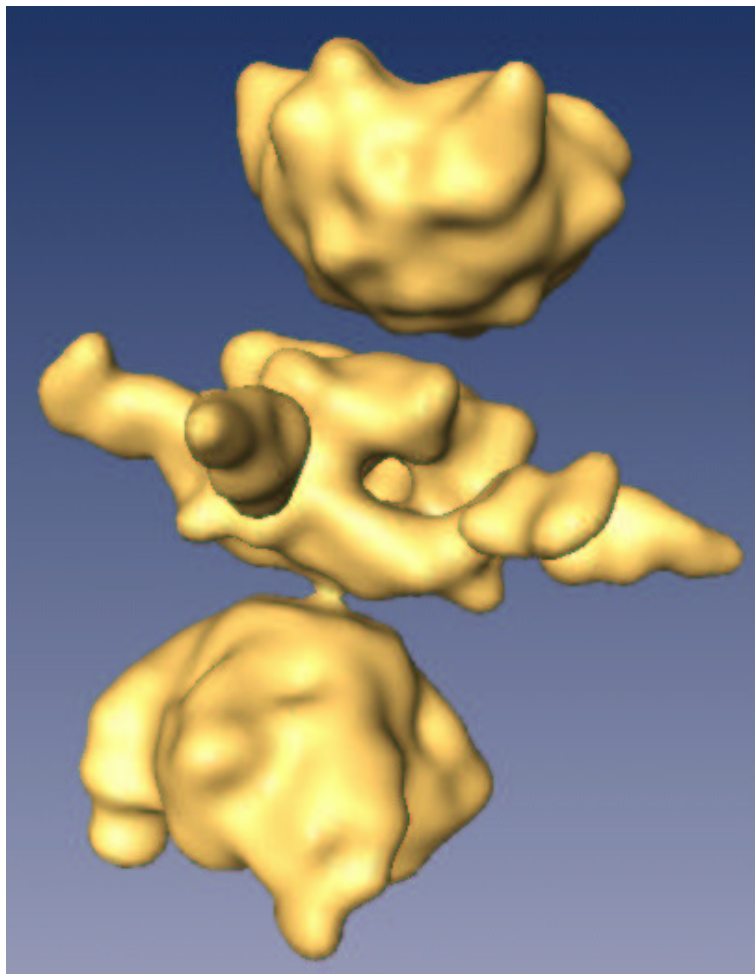


Figura 1.5: Reconstrucción tridimensional de ejemplo. Isosuperficie correspondiente a la reconstrucción del antígeno de tumorigenicidad del poliomavirus *Simian Vacuolating SV40* realizada en esta tesis.



# Capítulo 2

## Fundamentos de Tomografía

### 2.1. Concepto

#### 2.1.1. Técnica tomográfica

La tomografía es una técnica matemática que trata de derivar los valores de una función real definida en un espacio  $n$ -dimensional a partir de sus proyecciones en espacios de dimensión más reducida [74, 64]. En procesamiento de imágenes biomédicas se habla de que dicha función se reconstruye a partir de sus proyecciones bien sean éstas de dimensión 1 como las obtenidas con resonancia magnética nuclear [9], o de dimensión 2 como las obtenidas con rayos X [9] o como en el caso que nos ocupa el microscopio electrónico de transmisión [9, 61, 47]. En la primera situación se utiliza la Transformada de Radon como operador de proyección, mientras que en la segunda dicho operador recibe el nombre de Transformada de Rayos X [113, 115].

Intuitivamente podemos entender la tomografía en microscopía electrónica por analogía con la tomografía médica. La figura 2.1 muestra un par de radiografías de un tórax humano. Con una sola imagen bidimensional sería imposible determinar la posición exacta en el espacio 3D de las estructuras anatómicas indicadas por los números, sin embargo al añadir imágenes complementarias, dicha posición puede ser localizada sin dificultad. Añadiendo el número suficiente de radiografías se puede conocer con exactitud la densidad ósea, por ejemplo, en cada punto del espacio. Éste es el objetivo de la tomografía: pasar de un conjunto de imágenes bidimensionales al conocimiento de la estructura tridimensional que las generó, o que al menos es compatible con ellas.

Cada una de las imágenes de proyección,  $p(\mathbf{s}) : \mathbf{s} \in \mathbb{R}^2$ , es la transformada de



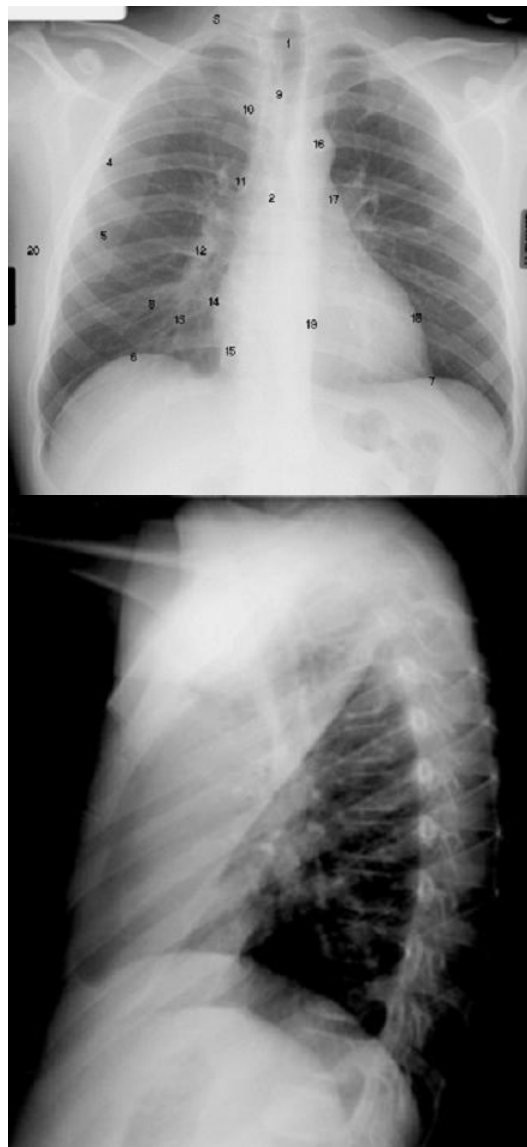


Figura 2.1: Radiografías de tórax ilustrando el concepto tomográfico.

rayos X del volumen original,  $f(\mathbf{r}) : \mathbf{r} \in \mathbb{R}^3$ , donde el valor de  $f$  en cada punto representa la intensidad de una cierta magnitud física (en el ejemplo de las radiografías la opacidad a los rayos X mientras que en microscopía electrónica el potencial de Coulomb). La transformada de rayos X de un objeto tridimensional se define como la integral de línea de dicho objeto a lo largo de una recta determinada por el punto  $\mathbf{s}$  y un vector de dirección  $\vec{\omega} \in \mathbb{R}^3$

$$p_{\vec{\omega}}(\mathbf{s}) = \mathcal{TX}\{f(\mathbf{r}), \vec{\omega}\} = \int_{-\infty}^{\infty} f(H^t \mathbf{s} + l\vec{\omega}) dl \quad (2.1)$$

cuya fórmula de inversión directa [115]

$$f(\mathbf{r}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi^3}} \int_{S^2} |HE_{\vec{\omega}} \mathbf{r}| p_{\vec{\omega}}(HE_{\vec{\omega}} \mathbf{r}) d\vec{\omega} \quad (2.2)$$

donde  $H$  es el operador proyección sobre el plano XY,  $H = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$ , por lo que  $HE_{\vec{\omega}} \mathbf{r}$  es la proyección del punto  $\mathbf{r}$  sobre el plano perpendicular a  $\vec{\omega}$  que asume todos los valores posibles en la esfera unidad ( $S^2$ ). El problema de esta fórmula de inversión es precisamente que se necesitan todas las posibles proyecciones además de ser especialmente sensible al ruido [113]. Por estas razones históricamente se han adoptado diferentes aproximaciones a la misma. Algunas de ellas trabajan en el espacio de Fourier [74, 64, 87, 113, 114, 115] haciendo uso del teorema de la sección central contemplado en la sección 2.1.3, mientras que otras trabajan en el espacio real entre las que se encuentran las de expansión en serie del volumen solución (sección 2.2) [74, 64, 113, 114, 115] adoptadas en esta tesis.

### 2.1.2. Dirección y orientación de la proyección

Tomar una imagen de proyección desde una dirección  $\vec{\omega}$  es equivalente a aplicar las rotaciones adecuadas al volumen  $f$  y posteriormente realizar una proyección vertical. La rotación de un volumen se determina en mecánica bien por el uso de ángulos de Euler bien por el empleo de *quaternions*. Tradicionalmente en microscopía electrónica se ha elegido la representación por ángulos de Euler,  $(\phi, \theta, \psi)$ , en que  $\phi$  es un ángulo, llamado azimutal, de rotación en torno al eje  $z$ ,  $\theta$ , llamado ángulo de inclinación, respecto al nuevo  $y$  y  $\psi$ , o ángulo de rotación en el plano, respecto al último  $z$  [47].

La dirección de proyección,  $\vec{\omega}$ , propiamente dicha viene dada por  $\phi$  y  $\theta$  mientras que  $\psi$  fuerza una rotación del plano de proyección. Las tres matrices de

rotación se combinan por una simple multiplicación de tal forma que una rotación por ángulos de Euler se puede reducir a una única matriz de rotación dada por

$$E_{\omega, \psi} = \begin{pmatrix} \cos \psi \cos \theta \cos \phi - \sin \psi \sin \phi & \cos \psi \cos \theta \sin \phi + \sin \psi \cos \phi & -\cos \psi \sin \theta \\ -\sin \psi \cos \theta \cos \phi - \cos \psi \sin \phi & -\sin \psi \cos \theta \sin \phi + \cos \psi \cos \phi & \sin \psi \sin \theta \\ \sin \theta \cos \phi & \sin \theta \sin \phi & \cos \theta \end{pmatrix} \quad (2.3)$$

Esta matriz es la verdadera matriz de proyección que debe sustituir a la  $E_{\omega}$  del apartado 2.1.1 aunque por claridad de exposición allí se prefirió no mencionar nada sobre  $\psi$ .

A su vez la matriz de Euler se identifica con una matriz de cambio de base entre la base canónica universal  $\mathbf{e}_x = (1, 0, 0)^t$ ,  $\mathbf{e}_y = (0, 1, 0)^t$ ,  $\mathbf{e}_z = (0, 0, 1)^t$  y una base interna asociada a las proyecciones formada por los vectores  $\mathbf{p}_x$ ,  $\mathbf{p}_y$  y  $\mathbf{p}_z$  de tal forma que  $\mathbf{p}_i = E_{\omega, \psi}^t \cdot \mathbf{e}_i$  y un vector expresado en la base de la proyección,  $\mathbf{r}_p$ , se expresa en el espacio universal como  $\mathbf{r}_e = E^t \cdot \mathbf{r}_p$ . Es decir, cada vector  $\mathbf{p}_i$  viene dado por una fila de la matriz de Euler.  $\mathbf{p}_z$  define la dirección de proyección, mientras que  $\mathbf{p}_x$  y  $\mathbf{p}_y$  determinan los ejes  $x$  e  $y$  en la proyección.

La figura 2.2 muestra estos ejes cuando no se aplica ninguna rotación, nótese que el plano de proyección se encuentra realmente situado en el origen de coordenadas aunque ha sido desplazado por claridad de representación. Las rotaciones indicadas por los ángulos  $(\phi, \theta, \psi)$  deben aplicarse utilizando los ejes  $\mathbf{p}_i$  manteniendo los  $\mathbf{e}_i$  fijos.

Este nuevo enfoque sobre ejes internos a la proyección es especialmente útil y es quien ha posibilitado un tratamiento integral en la determinación de vistas equivalentes por simetría (ver sección 3.4).

En microscopía electrónica se entiende por geometría de recolección de datos el conjunto de ángulos de Euler asociados a cada proyección. Debido a la naturaleza intrínseca de la partícula bajo estudio y la inclinación dada al soporte de carbón utilizado en el interior del microscopio electrónico nos encontramos con diferentes configuraciones entre las que destacan:

- Serie de eje único (*single axis series*): en la que una única rejilla se inclina sucesivamente sobre un eje tomando en cada paso una micrografía del mismo espécimen. Esta geometría de recolección se caracteriza por tener valores constantes de rotación azimutal  $\phi = \phi_0$  y valores deterministas para el ángulo de inclinación.
- Esquema cónico aleatorio (*random conical tilt*): en este caso es el ángulo

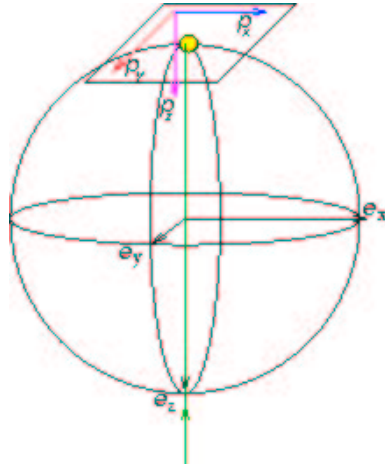


Figura 2.2: Sistemas de coordenadas asociados al plano de proyección y al volumen a proyectar.

de inclinación el que es constante,  $\theta = \theta_0$  mientras que cada proyección obtiene una rotación azimutal aleatoria.

- Vistas laterales: hay situaciones en que debido a la naturaleza de la macromolécula, por ejemplo por semejanza con un cilindro, su forma de interactuar con el sustrato la hace caer lateralmente. En este caso, sin inclinar el espécimen dentro del microscopio se puede obtener un amplio barrido angular tanto en  $\phi$  como en  $\theta$ .

La figura 2.3 muestra un ejemplo de distribución angular uniforme generada sintéticamente. Cada dirección de proyección,  $\vec{\omega}$  se representa por la punta de una flecha en el círculo unidad. La punta de dicha flecha es un triángulo isósceles cuya mayor altura da cuenta del ángulo de rotación en el plano  $\psi$ .

El conocimiento con exactitud de los ángulos de Euler asociados a cada proyección es crucial en el proceso de reconstrucción. En principio, una primera aproximación puede venir dada por la propia geometría de recolección de datos, como en el esquema cónico aleatorio, o por la comparación de las proyecciones obtenidas con un primer modelo. Con los ángulos resultantes se realiza una reconstrucción, e iterativamente se van reajustando los ángulos de las proyecciones con los nuevos volúmenes solución. A este proceso se le llama refinamiento angular y existen multitud de trabajos [150, 120, 40, 41, 127, 121, 122, 49] relacionados con la problemática de la asignación angular.

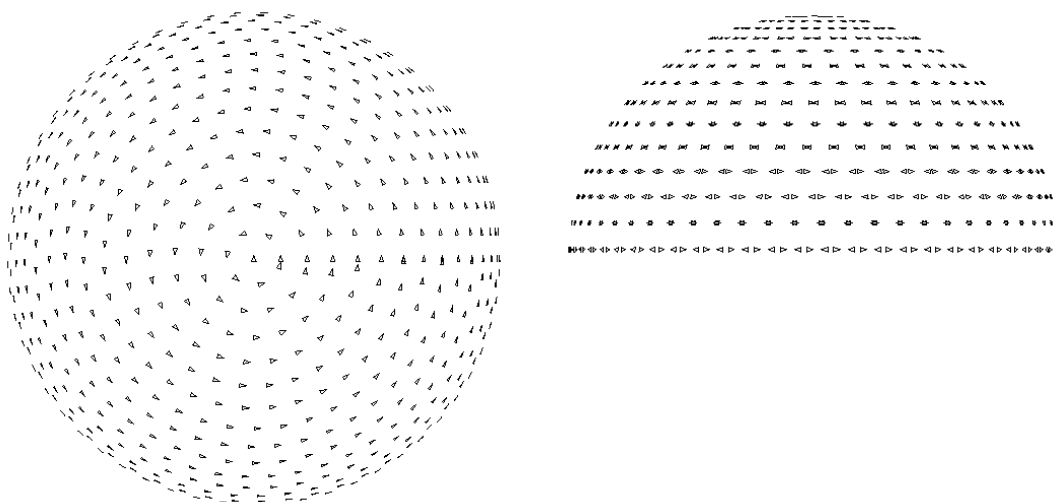


Figura 2.3: Planta y alzado de un ejemplo sintético de geometría de recolección uniforme.

### 2.1.3. Teorema de la sección central

El teorema de la sección central relaciona la transformada de Fourier de una proyección con la transformada de Fourier del volumen que la originó. En concreto afirma que la transformada de Fourier de una proyección a lo largo de la dirección  $\vec{\omega}, \psi$  corresponde a la sección según la misma dirección de la transformada de Fourier del volumen correspondiente [74, 64]. Es decir que una proyección que tiene por ejes  $\mathbf{p}_x, \mathbf{p}_y$  y  $\mathbf{p}_z$  (ver sección 2.1.2) tiene una transformada de Fourier que se corresponde con el plano de vector director  $\mathbf{p}_Z = \mathbf{p}_z$  en el que los ejes  $X$  e  $Y$  coinciden con  $\mathbf{p}_X = \mathbf{p}_x$  y  $\mathbf{p}_Y = \mathbf{p}_y$  (la notación en minúsculas hace referencia al sistema de coordenadas cartesiano en el espacio real, mientras que las mayúsculas se refieren al espacio transformado). La figura 2.4 muestra gráficamente cómo encaja cada transformada de Fourier bidimensional en el espacio de Fourier tridimensional conforme a lo descrito por el teorema.

Este teorema es la base de muchos algoritmos de reconstrucción como retroproyección ponderada (*filtered or weighted backprojection*) y la inversión del espacio de Fourier utilizada en cristales. Además, constituye la base para la mejor comprensión del concepto de falta de unicidad en las reconstrucciones. Para que exista una única reconstrucción posible para un problema tomográfico dado, suponiendo ausencia de ruido, las proyecciones deben ser tales que cubran completa-

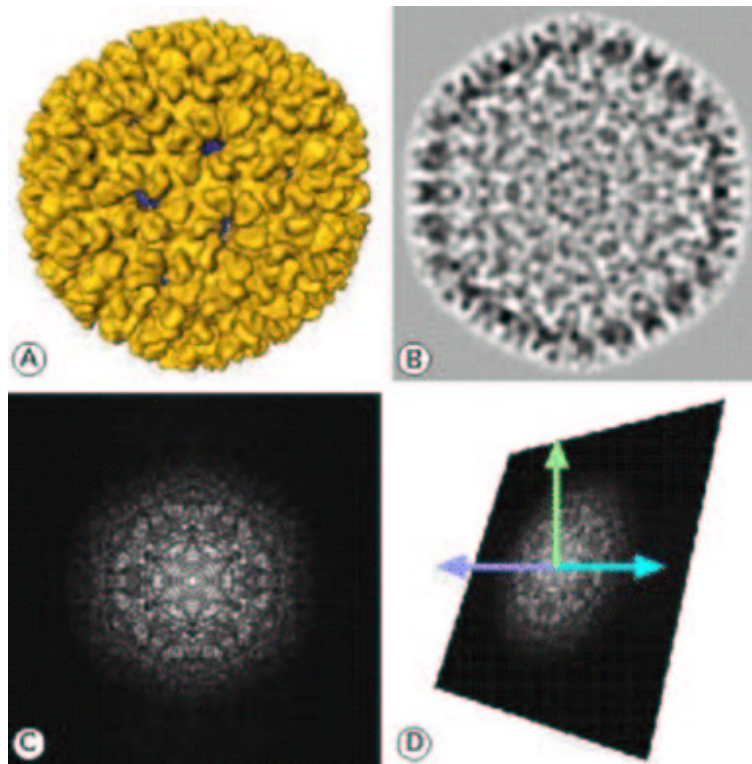


Figura 2.4: Teorema de la sección central: (A) Isosuperficie de un virus icosaédrico, (B) Proyección del mismo, (C) Transformada de Fourier de la proyección, (D) Ubicación de la transformada de Fourier bidimensional en el espacio de Fourier tridimensional correspondiente al volumen del virus.

mente el espacio de Fourier asociado al volumen. Dependiendo de la distribución angular obtenida experimentalmente este hecho puede o no ser aproximadamente cierto. En el mejor de los casos las proyecciones cubrirán suficientemente el espacio de forma que, aunque no formen un continuo, se puedan interpolar todos los valores del espacio con un cierto grado de exactitud. Sin embargo, hay una amplia gama de situaciones en las que la región no cubierta por las proyecciones es bastante extensa. Este es el caso del esquema cónico aleatorio o de las series de eje único en los que si el ángulo de inclinación máximo es  $\theta_0$  existe un cono o una cuña, respectivamente, sin información de semiángulo  $90 - \theta_0$ . Por este motivo, la propia distribución angular está generando una ambigüedad sobre el volumen solución: existen infinitos volúmenes que aún siendo compatibles con las proyecciones obtenidas pueden tener cualquier información en dicho cono o cuña perdida.

Esta región desconocida del espacio de Fourier puede ser supuesto nulo o puede ser rellenado parcialmente por información *a priori*. El espacio perpendicular a  $P$  definido en la sección 2.3.1 está directamente relacionado con este espacio desconocido.

#### 2.1.4. Revisión de los algoritmos de reconstrucción tomográfica

Existen multitud de algoritmos de reconstrucción tomográfica [74, 64, 87, 72, 85, 10, 113, 114, 84, 115] aunque la mayoría de ellos se pueden clasificar en dos grandes categorías: métodos transformados y métodos basados en una expansión en serie del volumen a reconstruir. Los primeros resuelven el problema en base a invertir o pseudo-invertir una estimación de la expresión de dicho volumen en algún dominio transformado, típicamente el espacio de Fourier o el espacio de Radon. Para ello, se encargan de estimar convenientemente la expresión transformada del volumen solución y de realizar la transformada inversa correspondiente a veces teniendo cuidado de proporcionar tan sólo soluciones aproximadas para evitar las inestabilidades numéricas de la solución exacta asociadas al hecho del posible desconocimiento de alguna región del mencionado espacio transformado. Los algoritmos del segundo grupo aproximan el volumen solución por una serie de funciones base desplazadas en el espacio y correctamente ponderadas por lo que su cometido es el de tratar de encontrar los pesos adecuados para cada una de las funciones base atendiendo a la minimización de algún funcional. En este punto tan sólo realizaremos una descripción cualitativa de aquellos algoritmos con rele-

vancia en el campo de la microscopía electrónica tridimensional pero se pueden hallar estudios en profundidad sobre todos ellos en [115, 64, 74].

Entre los algoritmos del primer grupo nos encontramos principalmente la inversión directa de la transformada de Fourier [29] o de Radon [127], y la retroproyección ponderada [126] (*WBP, Weighted Backprojection*). El primer y tercer algoritmos se basan en el teorema de la sección central analizado con anterioridad. Según este teorema cada imagen de proyección obtenida en el microscopio constituye una medida de la transformada de Fourier del volumen a reconstruir, por ello si colocamos apropiadamente dicha estimación en el espacio de Fourier tridimensional y hacemos la transformada inversa de Fourier obtendremos una estimación del volumen que arrojó las proyecciones obtenidas. La principal diferencia entre el método de la inversión directa de la transformada de Fourier y el de la retroproyección ponderada es que mientras que uno opera directamente en el espacio de Fourier el otro lo hace en el espacio de las proyecciones aunque la idea detrás de ambos funcionamientos es común. Existen multitud de variantes a estos dos métodos que buscan cuál es la mejor forma de interpolar aquellos valores del espacio de Fourier tridimensional que no han sido medidos por ninguna proyección, otros trabajan con transformadas de Fourier en coordenadas cilíndricas debido a que en dicha geometría pueden expresarse mejor ciertas características de los datos -como es el caso de los cristales helicoidales. Estos dos algoritmos son considerados actualmente el estándar tanto en la reconstrucción de partículas cristalizadas (en su versión de inversión directa de la transformada de Fourier) como en el caso de partículas aisladas (en su versión de retroproyección ponderada). Por su parte, la inversión de la transformada de Radon se basa en una propiedad dual a la dada por el teorema de la sección central y dada su reciente introducción en el campo de la microscopía electrónica aun no se encuentra muy extendida. Debemos destacar de estos métodos su carácter no iterativo, dados unos datos la respuesta del algoritmo es única y generalmente se produce en un tiempo relativamente corto. Sin embargo, a menudo la inclusión de restricciones en el proceso de reconstrucción definidas fácilmente en el espacio real no son de traducción inmediata a condiciones en el espacio transformado.

En el segundo grupo de algoritmos solemos encontrar la mayoría de los algoritmos de reconstrucción iterativos. Su principal característica es que trabajan en el espacio real y que realizan una aproximación gradual a la solución, por contra este acercamiento gradual supone un mayor coste en tiempo aunque la existencia de algoritmos que dan buenos resultados con una única iteración (como ART, *Algebraic Reconstruction Technique*, que constituye uno de los pilares de esta tesis) como de algoritmos fácilmente paralelizables como CAV (*Component averaging*)



supone una importante reducción del tiempo de cómputo acercando los algoritmos iterativos al nivel de los métodos transformados en cuanto a tiempo de ejecución se refiere. Los algoritmos basados en expansión del volumen solución permiten la inclusión de restricciones espaciales de manera más sencilla que los métodos transformados y es una de las razones por la que se ha elegido en esta tesis ART como algoritmo de reconstrucción. Habitualmente estos algoritmos de expansión minimizan un funcional en el que participa la discrepancia entre las proyecciones experimentales obtenidas y las proyecciones arrojadas por el volumen solución en esa misma dirección. Sin embargo, se pueden añadir términos adicionales a dicho funcional que minimicen algún aspecto que se considere importante como puede ser la varianza de la solución o términos que realzan los bordes basándose en gradientes. En esta línea encontramos métodos como ART [57], SART [5] (*Simultaneous Algebraic Reconstruction Technique*), SIRT [55] (*Simultaneous Iterative Reconstruction Technique*), CAV [19] (*Component AVeraging*) y BiCAV [17] (*Block-Iterative Component AVeraging*). Otros algoritmos como el de máxima entropía [85] maximizan la información contenida en el volumen reconstrucción. El principal inconveniente de los métodos iterativos es el aumento de la demanda computacional y la aparición de nuevos parámetros que deben ser optimizados a la resolución concreta del problema bajo estudio.

Para finalizar hemos de notar que los métodos de expansión en serie del volumen solución carecen de un fuerte impacto en la comunidad científica de microscopía electrónica tridimensional estando éste prácticamente copado por el uso de retroproyección ponderada (en el caso de partículas aisladas) o inversión directa del espacio de Fourier (en el caso de reconstrucción de cristales, virus y estructuras helicoidales).

## 2.2. Expansión en serie del volumen solución

### 2.2.1. Rejillas de expansión

Una extensa familia de algoritmos de reconstrucción basan su funcionamiento en la aproximación del volumen a reconstruir,  $f(\mathbf{r})$ , por una suma ponderada de funciones base más pequeñas desplazadas al lugar adecuado

$$f(\mathbf{r}) \approx \sum_i x_i \cdot b(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i)$$

siendo  $x_i$  los coeficientes de la expansión y normalmente el objetivo de los al-

goritmos de reconstrucción. La función base más conocida, aunque no la única, es el vóxel que se puede entender intuitivamente como un pequeño cubito y será definida más rigurosamente en el apartado 2.2.2. Así pues, la fórmula de expansión en serie nos indicaría que nuestro volumen es la suma de pequeños cubitos desplazados y cada uno relleno de una intensidad diferente determinada por los coeficientes  $x_i$ .

Cuando las posiciones ocupadas por la función base se distribuyen según una red conocida de antemano, también llamada rejilla de expansión, se pueden indicar los coeficientes de la expansión de forma acorde a la red. La rejilla de expansión es un conjunto de índices  $G = \{(i, j, k) \in \mathbb{Z}^3\}$ . Adicionalmente, el punto del espacio asociado a tal índice será

$$\mathbf{r}_{G(i,j,k)} = i \cdot \mathbf{g}_x + j \cdot \mathbf{g}_y + k \cdot \mathbf{g}_z \quad (2.4)$$

donde  $\mathbf{g}_x$ ,  $\mathbf{g}_y$  y  $\mathbf{g}_z$  forman una base, ortogonal o no, del espacio tridimensional y son intrínsecos a la definición de la red.

Así las cosas, el conjunto de coeficientes a determinar se limita a los que se encuentran en las posiciones indicadas por  $G$  e indicando los coeficientes de expansión se puede reescribir la fórmula de expansión en serie

$$f(\mathbf{r}) \approx \hat{f}(\mathbf{r}) = \sum_{(i,j,k) \in G} x_{(i,j,k)} \cdot b(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{G(i,j,k)})$$

Las redes más utilizadas de reconstrucción tridimensional son [65] (en todas las rejillas existe un parámetro  $g$  llamado tamaño relativo de rejilla que determina la separación entre funciones base adyacentes):

- **Cúbica** (*Cubic grid*):  
 $G = \{(i, j, k) \in \mathbb{Z}^3\}$  y tiene por vectores  $\mathbf{g}_x = g(1, 0, 0)^t$ ,  $\mathbf{g}_y = g(0, 1, 0)^t$  y  $\mathbf{g}_z = g(0, 0, 1)^t$ . Las regiones de Voronoi asociadas tienen forma de cubos por lo que suele ser la más empleada para la representación en vóxeles.
- **Cúbica centrada en la cara** (*FCC, Face Centered Cubic grid*):  
 $G = \{(i, j, k) \in \mathbb{Z}^3 : i + j + k \equiv 0 \pmod{2}\}$  y sus vectores de red son  $\mathbf{g}_x = g(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0)^t$ ,  $\mathbf{g}_y = g(\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2})^t$  y  $\mathbf{g}_z = g(0, \frac{1}{2}, \frac{1}{2})^t$ . La región de Voronoi para esta red es un dodecaedro rómbico (ver figura 2.5) y tiene la ventaja de que todas las regiones de Voronoi son vecinas compartiendo una cara del dodecaedro por lo que únicamente existe un tipo de vecindad.

- **Cúbica centrada en el cuerpo (BCC, Body Centered Cubic grid):**

$G = \{(i, j, k) \in \mathbb{Z}^3 : i \equiv j \equiv k \pmod{2}\}$  con vectores de red  $\mathbf{g}_x = g(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, -\frac{1}{2})^t$ ,  $\mathbf{g}_y = g(\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}, \frac{1}{2})^t$  y  $\mathbf{g}_z = g(-\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, \frac{1}{2})^t$ . Esta red es dual de la centrada en la cara y su región de Voronoi es un tronco octaédrico (ver figura 2.5). Su principal ventaja es que minimiza el número de muestras para cubrir una misma región que cualquiera de las otras dos rejillas.

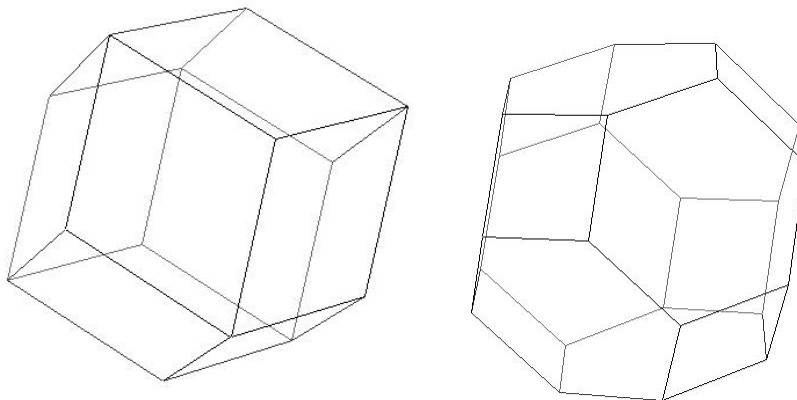


Figura 2.5: Regiones de Voronoi para las redes FCC (izquierda) y BCC (derecha).

En esta tesis se hace uso de la red BCC puesto que es la que minimiza el número de coeficientes a determinar y por tanto permite un mejor sobredimensionamiento del sistema de ecuaciones a resolver (ver sección 2.3.1). Aunque se han descrito rejillas de extensión infinita, a nivel de implementación se pueden restringir a una cierta región de interés,  $C \subset \mathbb{R}^3$

$$G_C = \left\{ (i, j, k) \in G : \mathbf{r}_{G(i,j,k)} \in C \right\}$$

### 2.2.2. Funciones de Kaiser-Bessel modificadas como base

Como ya hemos visto, una expansión en serie de un volumen se compone de dos partes fundamentales: el lugar donde se ubicarán las funciones base con sus apropiados coeficientes y las propias funciones base. En la sección anterior hemos estudiado las distintas posibilidades para localizar en el espacio las funciones base, y en este apartado concentraremos nuestro estudio en las funciones base a utilizar.

Tradicionalmente se ha venido usando una generalización tridimensional de la función pulso llamada vóxel cuya anchura,  $l$ , es un parámetro controlable.

$$\delta_l(x, y, z) = \begin{cases} 1 & x, y, z \leq \left| \frac{l}{2} \right| \\ 0 & \text{resto} \end{cases}$$

Esta función tiene la ventaja de tener una expresión muy sencilla y de ajustarse bastante bien a una rejilla cúbica simple. De hecho, la mayoría de los paquetes software que trabajan con volúmenes asumen que éste está expresado en esta base y rejilla.

Sin embargo, esta función tiene limitaciones al tratar de representar volúmenes de bordes suaves puesto que su propia definición se basa en un escalón, así los bordes no tienen más remedio que estar formados por abruptas transiciones en todo caso suavizadas por una disminución gradual de los coeficientes asociados. En términos de espacio de Fourier, la función vóxel tal y como se ha definido se puede expresar como la convolución de tres funciones *sinc* alineadas con cada uno de los ejes cartesianos del espacio de Fourier ( $R_x, R_y, R_z$ ). Ello significa que habrá espectro útil de la señal hasta una frecuencia considerable dando cuenta del salto abrupto que se produce en el espacio real. Otro inconveniente del vóxel como función base es su anisotropía, posee diferentes propiedades tanto en el espacio de Fourier como en el real dependiendo de la dirección desde la que lo observemos.

Como solución a todos estos problemas se ha propuesto el empleo de funciones suaves con simetría esférica, en concreto las funciones de Kaiser-Bessel modificadas o como son más conocidas, blobs [88, 104, 105]. Por el hecho de tener simetría esférica obviamos el problema de la anisotropía, mientras que por ser suaves se encuentran casi limitadas en banda. Además, poseen la propiedad de que su región de soporte es un conjunto acotado en  $\mathbb{R}^3$  lo cual limitará el tiempo de cálculo asociado a cualquier algoritmo basado en el uso de estas funciones.

La expresión generalizada de las funciones de Kaiser-Bessel tienen la siguiente expresión

$$b_n^m(r) = \begin{cases} \frac{\left(\sqrt{1-\left(\frac{r}{a}\right)^2}\right)^m I_m\left(\alpha\sqrt{1-\left(\frac{r}{a}\right)^2}\right)}{I_m(\alpha)} & 0 \leq r \leq a \\ 0 & \text{resto} \end{cases}$$

donde  $a$  es el radio en el espacio real del blob,  $\alpha$  es un factor de suavizamiento,  $m$  es el orden de la función de Bessel (el blob resulta ser derivable hasta orden  $m$ ),  $n$  es la dimensión del espacio en que se define (en nuestro caso  $n = 3$  puesto que

nos encontramos en  $\mathbb{R}^3$ ) e  $I_m(x)$  es la función modificada de primera especie de orden  $m$  de Bessel. El nombre de Kaiser se debe a que la función de Bessel se encuentra multiplicada por una ventana de Kaiser que la limita en el espacio. La figura 2.6 representa el corte de algunos blobs representativos.

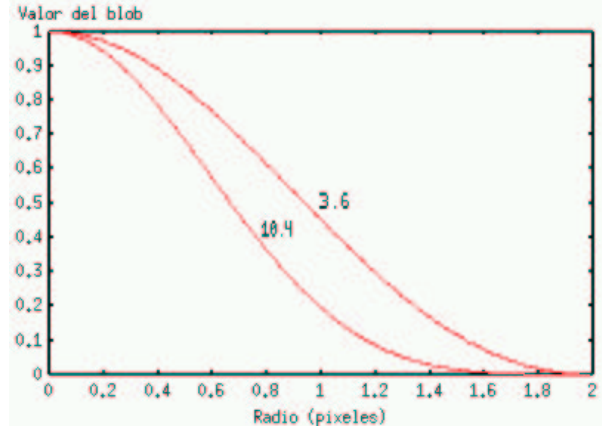


Figura 2.6: Perfil transversal de dos blobs tridimensionales de parámetros  $r = 2$ ,  $m = 2$  y  $\alpha = 3.6, 10.4$ . Nótese que la función blob tridimensional es esférica simétrica.

La transformada de Fourier de esta función viene dada por

$$B_n^m(R) = \begin{cases} \frac{(2\pi)^{n/2} a^n \alpha^m I_{n/2+m}(\sqrt{\alpha^2 - (2\pi a R)^2})}{I_m(\alpha) (\sqrt{\alpha^2 - (2\pi a R)^2})^{n/2+m}} & 2\pi a R \leq \alpha \\ \frac{(2\pi)^{n/2} a^n \alpha^m J_{n/2+m}(\sqrt{\alpha^2 - (2\pi a R)^2})}{I_m(\alpha) (\sqrt{\alpha^2 - (2\pi a R)^2})^{n/2+m}} & 2\pi a R > \alpha \end{cases}$$

donde  $J_n(x)$  es la función de Bessel de orden  $n$ . La figura 2.7 representa un corte a lo largo del eje  $\mathbf{R}_x$  de la amplitud de la transformada de Fourier tanto de los vóxeles de longitud 1 como de los blobs más utilizados en microscopía electrónica.

En cuanto a la proyección de un blob, al tratarse de una función esférico-simétrica no depende de la dirección de proyección sino tan sólo de la distancia del punto medido al centro de proyección del blob. Para  $m = 2$ , los blobs empleados en esta tesis, se tiene que la proyección de un blob tridimensional a una distancia  $s \in \mathbb{R}$  del centro vale

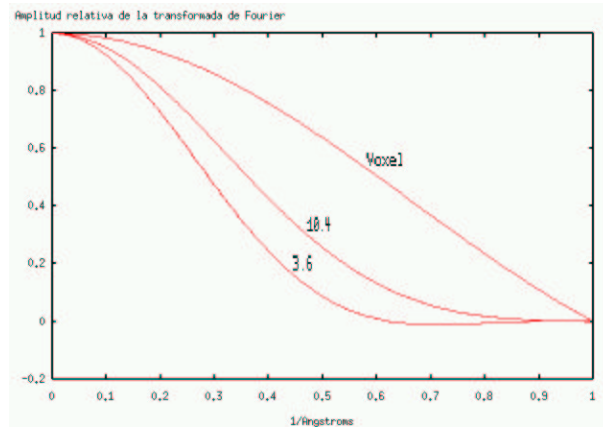


Figura 2.7: Perfil a lo largo del eje  $\mathbf{R}_x$  de la amplitud de la transformada de Fourier de un voxel y de los blobs más utilizados ( $r = 2$ ,  $m = 2$  y  $\alpha = 3.6$ ,  $10.4$ ).

$$p_3^2(s) = \begin{cases} \frac{2a}{\alpha} \left(1 - \left(\frac{s}{a}\right)^2\right) \frac{\frac{3}{\alpha^2 \left(1 - \left(\frac{s}{a}\right)^2\right) + 1} \sinh \alpha \sqrt{1 - \left(\frac{s}{a}\right)^2} - \frac{3}{\alpha \sqrt{1 - \left(\frac{s}{a}\right)^2}} \cosh \alpha \sqrt{1 - \left(\frac{s}{a}\right)^2}}{I_2(\alpha)} & 0 \leq s \leq a \\ 0 & \text{resto} \end{cases}$$

Desde el punto de vista de la implementación, esta característica permite el empleo de *lookup tables* para almacenar la proyección de un blob, logrando una gran eficiencia en los algoritmos de reconstrucción [105].

## 2.3. Algoritmos iterativos basados en expansión en serie

### 2.3.1. Planteamiento algebraico del problema tomográfico

El hecho de que la función solución,  $f(\mathbf{r})$ , puede ser aproximada,  $\hat{f}(\mathbf{r})$ , por una serie de funciones  $b(\mathbf{r})$ , desplazadas en el espacio a las posiciones determinadas por una rejilla  $G$  y ponderadas por distintos coeficientes,  $x_{(i,j,k)}$  (ver sección 2.2.1), implica que también la proyección en cualquier dirección,  $p_{\vec{\omega}, \psi}(\mathbf{s})$ , puede ser expresada por una suma en función de los coeficientes de la expansión en serie del volumen

$$\begin{aligned}
p_{\vec{\omega}, \psi}(\mathbf{s}) &= \int_{-\infty}^{\infty} f \left( E_{\vec{\omega}, \psi}^t \cdot \left( (\mathbf{s})_x, (\mathbf{s})_y, l \right)^t \right) dl \\
&\approx \int_{-\infty}^{\infty} \hat{f} \left( E_{\vec{\omega}, \psi}^t \cdot \left( (\mathbf{s})_x, (\mathbf{s})_y, l \right)^t \right) dl \\
&= \int_{-\infty}^{\infty} \left\{ \sum_{(i,j,k) \in G^X} x_{(i,j,k)} b \left( E_{\vec{\omega}, \psi}^t \cdot \left( (\mathbf{s})_x, (\mathbf{s})_y, l \right)^t - \mathbf{r}_{G(i,j,k)} \right) \right\} dl \\
&= \sum_{(i,j,k) \in G^X} \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} b \left( E_{\vec{\omega}, \psi}^t \cdot \left( (\mathbf{s})_x, (\mathbf{s})_y, l \right)^t - \mathbf{r}_{G(i,j,k)} \right) dl \right\} \\
&= \sum_{(i,j,k) \in G^X} x_{(i,j,k)} \cdot P_{(i,j,k), \mathbf{s}, \vec{\omega}, \psi}
\end{aligned}$$

donde  $P_{(i,j,k), \mathbf{s}, \vec{\omega}, \psi}$  es el valor de la proyección en la dirección  $\vec{\omega}, \psi$  sobre el píxel en  $\mathbf{s}$  del blob que se encuentra en la posición  $\mathbf{r}_{G(i,j,k)}$  (la figura 2.8 ilustra estos coeficientes). Ordenando lexicográficamente los coeficientes  $x_{(i,j,k)}$  y los píxeles de la proyección en vectores columna de  $M$  coeficientes y  $N$  píxeles respectivamente, se puede dar una representación más compacta en la que se incluya a todos los píxeles

$$\mathbf{p}_{\vec{\omega}, \psi} = P_{\vec{\omega}, \psi} \cdot \mathbf{x}$$

donde el coeficiente  $(n, m)$  de la matriz  $P_{\vec{\omega}, \psi}$  representa el valor de la proyección del blob  $m$  sobre el píxel  $n$  cuando se proyecta en la dirección  $\vec{\omega}, \psi$ .

Uniando, de nuevo lexicográficamente, todas las proyecciones se llega finalmente al sistema de ecuaciones que representa el conocimiento sobre el volumen  $f(\mathbf{r})$  obtenido a través de sus distintas proyecciones

$$\mathbf{p} = P \cdot \mathbf{x}$$

La solución para  $\mathbf{x}$  de este sistema nos dará la mejor estimación  $\hat{f}(\mathbf{r})$  del volumen a reconstruir. Con los tamaños habituales manejados en reconstrucción de partículas individuales en microscopía electrónica tenemos un sistema de ecuaciones formado por unas 5000 proyecciones (actualmente se han hecho reconstrucciones de hasta 70000 [53]) de tamaño 100x100, es decir, unos 50 millones de ecuaciones con 350000 incógnitas, por lo que no se pueden aplicar técnicas de resolución de ecuaciones que necesiten operar sobre la matriz de coeficientes  $P$  directamente. Veremos en la sección siguiente una técnica iterativa de resolución que cada vez trabaja con un pequeño subconjunto de las ecuaciones.

En general se dará el caso de que la matriz  $P$  no capture todas las características del volumen original de tal forma que si la solución real del sistema es el

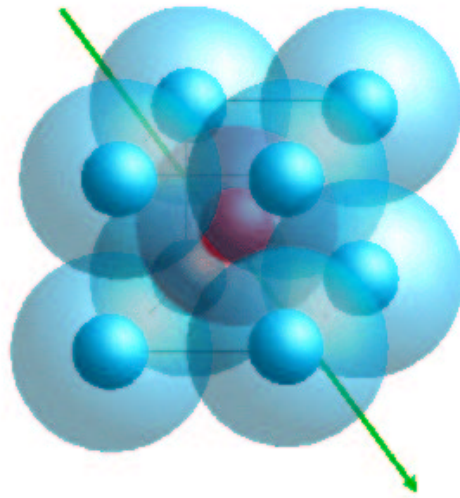


Figura 2.8: Proyección de un conjunto de blobs sobre un punto. Los coeficientes de la matriz de proyección se corresponden con las integrales de línea del rayo considerado con los blobs atravesados.

volumen  $\mathbf{x}^*$ , entonces la matriz  $P$  tan sólo sea capaz de determinar una parte de la misma mientras que la otra parte se encuentre especificada por el espacio ortogonal a  $P$ , el cual es imposible de ser encontrado por el simple conocimiento de  $P$  (ver sección 2.1.3).

$$\mathbf{x}^* = \mathbf{x}_P + \mathbf{x}_{P^\perp}$$

Para extraer información sobre la parte de la solución en el espacio ortogonal a  $P$  se necesita del concurso de técnicas no lineales e incorporación de información *a priori*. El empleo de una función base de expansión adecuada puede ayudar en esta tarea de extracción de información adicional.

El ruido en el sistema de ecuaciones puede plantearse a dos niveles: en la matriz de proyección  $P$  y en el conjunto de píxeles. El primero de los ruidos suele deberse a errores de alineamiento traslacional y asignación angular, mientras que el segundo se encuentra asociado a ruido aditivo, normalmente supuesto gaussiano, a la señal. La existencia de ruido fuerza el sistema de tal manera que no



existe una solución del mismo, por lo que a lo más que se puede aspirar es a una solución de mínimos cuadrados. Sin embargo, la solución de mínimos cuadrados cuando el nivel de ruido aditivo es alto también contiene gran cantidad de ruido por lo que deberemos encontrar otra vía de solución. El apartado siguiente muestra el algoritmo de resolución de sistemas de ecuaciones adoptado en esta tesis mientras que la sección 3.1.3 se dedica a la optimización de su respuesta.

### 2.3.2. Técnicas de reconstrucción algebraica (ART)

Las técnicas de reconstrucción algebraica son una amplia familia de algoritmos iterativos de reconstrucción. El nombre de algebraico es más un accidente histórico que una verdadera distinción sobre su funcionamiento puesto que son tan algebraicas como otras técnicas de reconstrucción. Las técnicas ART resuelven el problema tomográfico a través de resolver el sistema de ecuaciones planteado por la sección 2.3.1 por medio de un método ideado por Karcmarz en 1937 e introducido por primera vez en tomografía por Gordon en 1970 [57] denominado método de las proyecciones. En esta sección se tratará de dicho método y de su versión por bloques de forma genérica sin concretar en la resolución de ningún problema específico puesto que se trata de una técnica de la que se hará uso a lo largo de la tesis en diferentes contextos. Una descripción exhaustiva de este método y de diferentes variantes puede encontrarse en [64], mientras que su aplicación específica a la microscopía electrónica de transmisión con partículas individuales se describe en [98, 96].

Sea el sistema de ecuaciones  $A\mathbf{x} = \mathbf{b}$  ( $A \in \mathcal{M}_{M \times N}$ ,  $\mathbf{x} \in \mathcal{M}_{N \times 1}$ ,  $\mathbf{b} \in \mathcal{M}_{M \times 1}$ ) o más explícitamente

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & \cdots & a_{1N} \\ a_{21} & a_{22} & \cdots & a_{2N} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ a_{M1} & a_{M2} & \cdots & a_{MN} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_N \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} b_1 \\ b_2 \\ \vdots \\ b_M \end{pmatrix}$$

Cada ecuación  $a_{i1}x_1 + a_{i2}x_2 + \dots + a_{iN}x_N = \langle \mathbf{a}^i, \mathbf{x} \rangle = b_i$  representa la ecuación de un hiperplano en el espacio N-dimensional. El método de las proyecciones o simplemente ART aditivo parte de una solución,  $\mathbf{x}^{(0)}$ , inicial y la va modificando iterativamente hasta encontrar la solución final. Para ello en el paso  $k + 1$  se proyecta la solución obtenida en el paso  $k$  en la dirección definida por el hiperplano  $i(k)$  ( $i(k)$  es una función que elige en cada iteración el hiperplano sobre el

que proyectar de tal forma que en  $M$  iteraciones consecutivas se elijan  $M$  hiperplanos diferentes). Vemos, pues, que este método encaja en una familia mayor de algoritmos llamados de proyección ortogonal sucesiva (SOP, *Successive Orthogonal Projections* [20, Cap. 5]). La figura 2.9 muestra la secuencia de las tres primeras proyecciones en el caso de tener 3 ecuaciones para dos incógnitas. Sucesivamente se va proyectando la solución actual sobre el hiperplano correspondiente, en este caso 1, 2 y 3. Al disponer de tres hiperplanos un ciclo se termina al haber realizado tres iteraciones del algoritmo. Se pueden ejecutar tantos ciclos como se desee hasta alcanzar un determinado criterio de convergencia.

La proyección de un punto  $\mathbf{x}$  sobre un hiperplano  $H = \{\mathbf{x} \in \mathbb{R}^N : \langle \mathbf{a}, \mathbf{x} \rangle = b\}$  se define como

$$\mathcal{P}_H(\mathbf{x}) = \mathbf{x} + \frac{b - \langle \mathbf{a}, \mathbf{x} \rangle}{\|\mathbf{a}\|^2} \mathbf{a}$$

y la expresión formal del algoritmo ART se manifiesta como

$$\mathbf{x}^{(k+1)} = \mathbf{x}^{(k)} + \lambda_k \left( \mathcal{P}_{H_{i(k)}}(\mathbf{x}^{(k)}) - \mathbf{x}^{(k)} \right) \quad (2.5)$$

donde  $\lambda_k$  es un factor de relajación que controla la actualización de la solución actual y  $H_{i(k)}$  el hiperplano definido por  $\mathbf{a}^{i(k)}$  y  $b_{i(k)}$ .  $\lambda_k = 1$  produce la proyección sobre el hiperplano mientras que un valor de 0.1 hace que  $\mathbf{x}^{(k)}$  se mueva un 10 % de la distancia que lo separa del hiperplano en la dirección señalada por éste. Existen resultados sobre la convergencia de ART a la verdadera solución,  $\mathbf{x}^*$ , cuando  $\lambda_k \in (0, 2)$  [64, 20]. Por otra parte, cuando el sistema de ecuaciones es inconsistente, es decir, no existe solución se demuestra que cuando el número de iteraciones tiende a infinito y si se mantiene el orden de acceso a los hiperplanos entonces la secuencia de soluciones alcanza un patrón  $\dots, \mathbf{x}^{*M}, \mathbf{x}^{*1}, \mathbf{x}^{*2}, \dots, \mathbf{x}^{*M}, \mathbf{x}^{*1}, \mathbf{x}^{*2}, \dots$  periódico, donde  $\mathbf{x}^{*i}$  son puntos fijos en cada uno de los  $M$  hiperplanos [64].

Otro resultado importante relacionado con ART es que es un algoritmo que minimiza el funcional [64]

$$\|A\mathbf{x} - \mathbf{b}\|^2 + \mu \|\mathbf{x} - \mathbf{x}^{(0)}\|^2$$

es decir, busca el punto más cercano a la solución inicial que minimiza la potencia del error cuadrático medio en la solución del sistema. Si el punto inicial es  $\mathbf{x}^{(0)} = \mathbf{0}$  y hay varias soluciones del sistema entonces la solución a la que converge ART es la que tiene menor varianza.

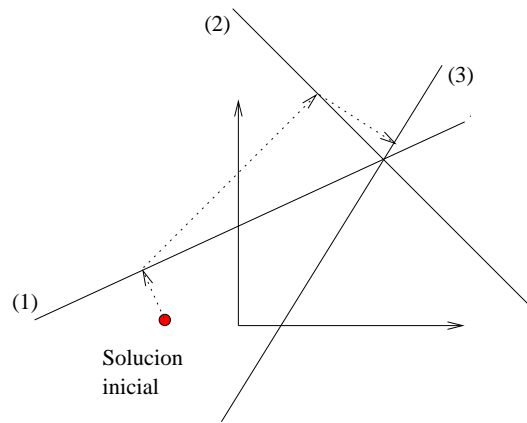


Figura 2.9: Ejemplo del método de las proyecciones para un conjunto de tres ecuaciones en un espacio bidimensional.

El hecho de que las micrografías sean extremadamente ruidosas se traduce en el hecho de que el sistema de ecuaciones planteado esté lejos de tener solución única. Es más, a pesar de la propiedad de mínima varianza asegurada para la solución de ART, esta solución presenta un alto nivel de ruido por lo que en la aplicación de tomografía en microscopía electrónica que nos ocupa se suele parar la ejecución del algoritmo después de un ciclo [98, 101, 8, 91]. El factor de relajación junto con el número de proyecciones juegan un papel fundamental en la calidad de la solución obtenida. En esta tesis se estudia su efecto conjunto en la sección 3.1.3.

Un segundo aspecto práctico a tener en cuenta es el coste computacional del algoritmo. El punto más costoso de todo el algoritmo es el cálculo del producto escalar  $\langle \mathbf{a}^{i(k)}, \mathbf{x}^{(k)} \rangle$ . Tal y como se ha presentado hasta ahora mismo el algoritmo, la solución  $\mathbf{x}^{(k)}$  es variada con cada ecuación presentada por lo que dicho producto debe calcularse tantas veces como ecuaciones e iteraciones haya. Sin embargo, dada la particular naturaleza del problema a resolver, se pueden agrupar las ecuaciones de tal forma que el coste de calcular al mismo tiempo los productos escalares de todas las ecuaciones de un grupo se reduzca considerablemente. Así, entramos de lleno en lo que se conocen como métodos iterativos por bloques (BIP, *Block-Iterative Projections*, [20, Cap. 5]). Si disponemos de un conjunto de ecuaciones de índices  $I = \{1, 2, \dots, M\}$  se realiza una partición de las mismas  $I = \bigcup_{n=1}^l I_b$ . En particular, el ART aditivo por bloques adopta la siguiente formulación

$$\mathbf{x}^{(k+1)} = \mathbf{x}^{(k)} + \lambda_k \sum_{i \in I(k)} w_i \left( \mathcal{P}_{H_i}(\mathbf{x}^{(k)}) - \mathbf{x}^{(k)} \right) \quad (2.6)$$

es decir, en cada iteración se suman las contribuciones particulares de cada una de las correcciones ponderadas correspondientes al bloque  $I(k)$ . Los pesos de ponderación deben ser tales que  $\sum_{i \in I(k)} w_i = 1$ , es decir, se trata de una media convexa, y es habitual tomar  $w_i = 1/\#\{I(k)\}$ , donde  $\#\{.\}$  representa al cardinal de un conjunto.

Este algoritmo por bloques comparte la velocidad de convergencia de ART, incluye parte de las ideas de los algoritmos simultáneos y permite un cálculo más veloz de las proyecciones por lo que combina de forma atractiva los principales factores a tener en cuenta.

A nivel de implementación se puede demostrar [105, 96] que el siguiente algoritmo refleja fielmente a ART por bloques

1. Seleccionar el subconjunto de ecuaciones  $A_{I(k)} \in \mathcal{M}_{\#\{I(k)\} \times N}$ ,  $\mathbf{b}_{I(k)} \in \mathcal{M}_{\#\{I(k)\} \times 1}$  formado por todas aquellas ecuaciones cuyo índice se encuentra en  $I(k)$ . La matriz  $A_{I(k)}$  recibe el nombre de operador hacia adelante (*forward operator*).
2. Aplicar el operador a la solución actual  $\hat{\mathbf{b}}_{I(k)} = A_{I(k)} \mathbf{x}^{(k)}$  y calcular al mismo tiempo el factor de normalización  $\tilde{\mathbf{a}}_{I(k)} = \text{diag}(A_{I(k)} A_{I(k)}^t)$ , donde el operador  $\text{diag}(\cdot)$  extrae la diagonal principal de una matriz en forma de vector columna.
3. Calcular el vector corrección según  $\boldsymbol{\varepsilon}_j = \lambda_k \frac{(\mathbf{b}_{I(k)})_j - (\hat{\mathbf{b}}_{I(k)})_j}{(\tilde{\mathbf{a}}_{I(k)})_j}$
4. Actualizar la solución actual como  $\mathbf{x}_j^{(k+1)} = \mathbf{x}_j^{(k)} + \sum_{i \in I(k)} w_i \boldsymbol{\varepsilon}_j a_{ij}$

El esquema operacional de ART por bloques está representado en la figura 2.10. El operador hacia atrás, representado en la figura como  $A_{I(k)}^{\text{"-1"}}$ , es el encargado de realizar el paso de actualización del algoritmo.

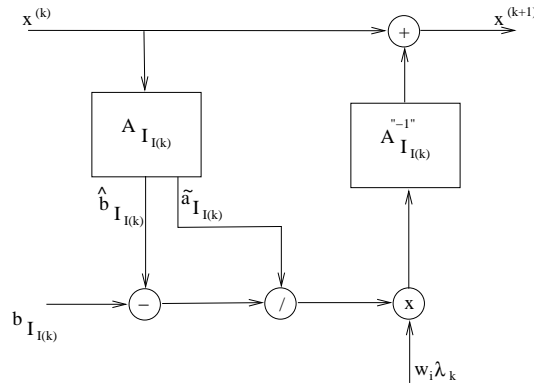


Figura 2.10: Diagrama funcional de ART por bloques.

### 2.3.3. Algoritmos

#### Centro de una imagen o volumen

Casi todos los planteamientos matemáticos utilizados en esta tesis entienden los volúmenes y las imágenes como funciones definidas en el espacio  $n$ -dimensional correspondiente a pesar de que se encuentren discretizadas por el muestreo según las rejillas descritas en la sección 2.2.1. Habitualmente se asume que dicha función está centrada de cierta forma en el origen  $\mathbf{0}$ . Este hecho permite que la función esté definida para coordenadas negativas lo cual no suele ser la práctica de implementación de la mayoría de los lenguajes de programación. Por ello se debe establecer un mecanismo de traducción de las coordenadas lógicas (aquellas dadas por el planteamiento matemático) y el físico (el determinado por el lenguaje de programación). El método elegido es una simple translación del origen de coordenadas al centro del *array* de dimensiones  $(X_{dim}, Y_{dim}, Z_{dim})$  que contiene el volumen de tal forma que

$$\mathbf{r}_{lógico} = \mathbf{r}_{físico} - \mathbf{O}$$

$$\mathbf{O} = \left( \text{int} \left( \frac{X_{dim}}{2} \right), \text{int} \left( \frac{Y_{dim}}{2} \right), \text{int} \left( \frac{Z_{dim}}{2} \right) \right)^t$$

$$\text{int}(x) = \text{sgn}(x) \lfloor |x| \rfloor$$

El origen elegido de esta forma está siempre situado en una coordenada entera y, por tanto, representable en cualquier lenguaje aunque tiene el inconveniente de que para tamaños pares está ligeramente desplazado de su posición como centro natural del *array*.

### Operador proyección del volumen de reconstrucción

Una partición natural del sistema de ecuaciones de proyección es por la dirección de la misma: todos aquellos hiperplanos que han sido definidos por una misma dirección de proyección forman uno de los subconjuntos  $I_b$  definidos en 2.3.2. Sin embargo, dado un blob de coeficiente  $\mathbf{x}_j$ , éste no participa en todas las ecuaciones del grupo sino tan sólo en unas pocas: aquellas en las que dicho blob proyecta. Es por ello que este bloque se vuelve a dividir en subbloques de tal modo que cada blob ve como bloque al subbloque en el que él participa. Los coeficientes  $a_{ij}$  corresponden a la proyección del blob  $j$  sobre el píxel  $i$ .

El operador hacia adelante de este proceso ART consiste en la proyección según la dirección  $\vec{\omega}, \psi$  de un volumen,  $\hat{f}(\mathbf{r})$ , definido por el muestreo con blobs,  $b(\mathbf{r})$  en una rejilla  $G$  sobre un plano  $p_{\vec{\omega}, \psi}(\mathbf{s})$ . El algoritmo a seguir será el siguiente:

1. Calcular la matriz de Euler,  $E_{\vec{\omega}, \psi}$  asociada a la dirección de proyección (ver sección 2.1.2)
2. Para todos los puntos de muestreo  $(i, j, k) \in G$  hacer
  - a) Calcular la posición en el espacio del punto  $(i, j, k)$ . Dicha posición recibe el nombre de  $\mathbf{r}_{(i, j, k)}$  y representa al centro del blob.
  - b) Proyectar el centro del blob,  $\mathbf{s}_{(i, j, k)} = H \cdot E_{\vec{\omega}, \psi} \cdot \mathbf{r}_{(i, j, k)}$
  - c) Calcular el rectángulo definido por  $\mathbf{s}^1, \mathbf{s}^2$  que inscribe a la proyección del blob en la proyección ortogonalizada
    - 1)  $\mathbf{s}_b = r(1, 1)^t$  donde  $r$  es el radio del blob
    - 2)  $\mathbf{s}^1 = \mathbf{s}_{(i, j, k)} - \mathbf{s}_b$
    - 3)  $\mathbf{s}^2 = \mathbf{s}_{(i, j, k)} + \mathbf{s}_b$

Dicho rectángulo comprende aquellos puntos tales que  $\{\mathbf{s} = (m, n) \in \mathbb{N}^2 : \mathbf{s}^1 \leq \mathbf{s} \leq \mathbf{s}^2\}$
  - d) Para todo punto del plano de proyección en el rectángulo definido en el paso anterior hacer
    - 1) Calcular la distancia a la proyección del centro del blob  $\mathbf{d} = \mathbf{s} - \mathbf{s}_{(i, j, k)}$
    - 2) Calcular la proyección de un blob a esa distancia,  $p$  (ver sección 2.2.2). Estos son los coeficientes  $a_{ij}$ .

- 3) Sumar  $p$  ponderado por el coeficiente del blob correspondiente,  $x_{(i,j,k)}$ , a la proyección en el lugar indicado por  $\mathbf{s}$ .

### Operador de paso a vóxeles

El paso a vóxeles de un volumen además de tener interés por sí mismo en cuanto a la compatibilidad con todos aquellos programas que trabajen con volúmenes expresados en esta base, constituye el operador hacia adelante de otro proceso ART relacionado con ecuaciones volumétricas (ver sección 3.5).

Formalmente esta operación consiste en el paso a vóxeles de un volumen,  $\hat{f}(\mathbf{r})$ , definido por el muestreo con blobs,  $b(\mathbf{r})$  sobre una rejilla  $G$  mientras que los vóxeles, de tamaño  $1 \times 1 \times 1$ , se encuentran distribuidos sobre una rejilla cúbica de lado 1,  $G_V$ . El cambio de la base y rejilla de muestreo se realiza como sigue:

1. Para todos los puntos de muestreo  $(i, j, k) \in G$  hacer
  - a) Calcular la posición en el espacio del punto  $(i, j, k)$ . Dicha posición recibe el nombre de  $\mathbf{r}_{(i,j,k)}$  y representa al centro del blob.
  - b) Calcular el cubo definido por  $\mathbf{r}^1, \mathbf{r}^2$  que inscribe al blob
    - 1)  $\mathbf{r}_b = r(1, 1, 1)^t$  donde  $r$  es el radio del blob
    - 2)  $\mathbf{r}^1 = \mathbf{r}_{(i,j,k)} - \mathbf{r}_b$
    - 3)  $\mathbf{r}^2 = \mathbf{r}_{(i,j,k)} + \mathbf{r}_b$

Dicho cubo comprende aquellos puntos tales que

$$\{\mathbf{r} = (m, n, o) \in G_V : \mathbf{r}^1 \leq \mathbf{r} \leq \mathbf{r}^2\}$$
  - c) Para todo punto en el cubo definido en el paso anterior hacer
    - 1) Calcular la distancia al centro del blob,  $\mathbf{d} = \mathbf{r} - \mathbf{r}_{(i,j,k)}$
    - 2) Calcular el valor de un blob a esa distancia,  $p$  (ver sección 2.2.2). Estos valores constituyen los coeficientes  $a_{ij}$  del sistema de ecuaciones de volumen (sección 3.5).
    - 3) Sumar  $p$  ponderado por  $x_{(i,j,k)}$  en el volumen de salida en el lugar indicado por  $\mathbf{r}$ .

# **Parte II**

## **Materiales y métodos**





# Capítulo 3

## Mejoras al proceso de reconstrucción basado en ART

### 3.1. Optimización del proceso de reconstrucción

#### 3.1.1. Reducción del espacio de reconstrucción

En el apartado 2.2.1 se explicaron las diferentes rejillas utilizables para la expansión en serie del volumen a reconstruir. Dichas rejillas definen la posición y el número de las funciones base que se emplearán para reconstruir el volumen tridimensional solución. En este punto debemos distinguir el hecho de que a lo largo de este trabajo se van a emplear dos tipos de expansiones en serie: normalmente el volumen debe ser expresado en una rejilla cúbica ocupada por vóxeles de tal forma que se facilite la interacción con otros programas no pertenecientes a nuestro paquete así como la posibilidad de aplicar ciertos algoritmos que son expresados de manera más sencilla con una definición en vóxeles; sin embargo, tal y como se ha expuesto en la sección 2.2.2, las ventajas desde el punto de vista de señal del empleo de blobs no son en absoluto despreciables.

Por regla general, se puede afirmar que en microscopía electrónica el objeto de interés, la macromolécula bajo estudio, se encuentra centrada y contenida dentro de una esfera cuyo radio,  $r$ , como máximo iguala a la longitud del semilado,  $l/2$ , de las proyecciones con las que se trabaja. Ver figura 3.1

Hasta ahora se venía reconstruyendo el volumen solución en el espacio correspondiente a un cubo de lado  $l$ . Sin embargo, en este trabajo el volumen a reconstruir estará siempre comprendido en una esfera de radio  $r$  centrada en dicho cubo de lado  $l$ . En el caso de tomar,  $r = l/2$ , la relación entre el volumen de interés

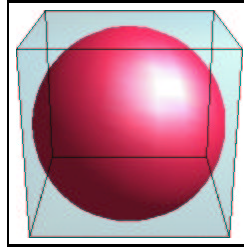


Figura 3.1: Esfera de radio  $l/2$  inscrita en un cubo de lado  $l$

antes y después de tal consideración toma el valor  $V_{cubo}/V_{esfera} = 6/\pi \approx 1,91$  o lo que es lo mismo, la esfera representa tan solo un 52 % del volumen del cubo.

Las implicaciones de velocidad de esta mejora son obvias, ya que la velocidad de cualquier proceso relacionado con un volumen expresado en serie es directamente proporcional al número de coeficientes de dicha expansión. Es decir, se obtendrá una reducción de la complejidad en torno al 48 % independientemente de la rejilla utilizada.

Una segunda ventaja que no queda tan patente es el aumento del número de ecuaciones por incógnita en el sistema de ecuaciones a resolver. Nótese que dicho aumento no implica directamente un incremento en el grado de determinación, condicionamiento y estabilidad numérica del sistema, aunque sí que debería ayudarlo. Suponiendo un conjunto de  $N$  proyecciones de lado  $l$  y una unidad de rejilla  $g$ , obtenemos que el número medio de ecuaciones por incógnita para una red cúbica es en el caso de reconstrucción en un cubo  $\frac{Nl^2}{(l/g)^3}$  y para una esfera de radio  $l/2$  vale  $\frac{N\pi(l/2)^2}{4/3\pi(l/2g)^3}$ . Dividiendo uno entre otro obtenemos  $2/3$ , es decir, el sistema de ecuaciones que reconstruye dentro de una esfera tiene, en media, 1.5 veces más ecuaciones por incógnita que el que lo hace en todo el cubo. Esto no significa que esté 1.5 veces más determinado o condicionado aunque estas variables sí deberían verse positivamente afectadas.

Es de reseñar que la reducción del espacio de reconstrucción ha sido posible gracias a trabajar con un método que opera en el espacio real, puesto que un método en el dominio de la transformada de Fourier es incapaz de imponer estas restricciones.

### 3.1.2. Optimización de los parámetros del blob

Los blobs han sido definidos en la sección 2.2.2 como las funciones base del espacio en que son expresados nuestros volúmenes. Sin embargo, aun quedan por seleccionar varios de los parámetros de los blobs, en concreto, su radio y factor de suavidad. En este apartado se determinan las reglas para elegir dichos parámetros libres en función de las características espectrales de la señal a reconstruir y de la frecuencia de muestreo. El criterio de optimalidad empleado es el de un menor tiempo de cómputo en el algoritmo de reconstrucción.

Según Matej *et al.* [104, 105] una vez fijados los parámetros de los blobs  $a$ ,  $\alpha$  la red BCC que evita el *aliasing* en el origen tiene una separación entre muestras de  $g_{BCC}(a, \alpha) = \frac{\sqrt{8}}{2R_0(a, \alpha)}$  donde  $R_0(a, \alpha) = \frac{\sqrt{\alpha^2 + 6,9879^2}}{2\pi a}$  es la frecuencia del primer cero en la transformada de Fourier del blob y  $a$  está expresada en Angstroms. Utilizando esta rejilla sin *aliasing* podemos medir los errores de representación de los volúmenes según dos criterios distintos: uno que mida el error en los niveles de intensidad dentro de un volumen con densidad constante [105] y otro que nos indique el error cometido en las normales a una esfera representada en blobs [54]. En las figuras 3.2 y 3.3 tenemos una representación de isocurvas para ambos casos en un margen suficientemente amplio de valores (para estas curvas el radio del blob está expresado en píxeles y no en Angstroms). Estudiando ambas superficies desde el punto de vista de error mínimo se llega a la conclusión de que una elección con  $(\frac{a}{T_m}, \alpha) \in [1.5, 4] \times [11, 14]$  tendría una buena actuación según ambos criterios ( $T_m$  es el periodo de muestreo empleado en la digitalización de la imagen, es decir, el tamaño del píxel). De esta forma, hemos reducido significativamente el espacio de búsqueda.

Sin embargo, todavía no se ha seleccionado ningún blob en concreto sino una región. Se pueden añadir dos criterios más: el primero, que la atenuación del blob a la frecuencia máxima esperada en la señal ( $1/T_s$ , donde  $T_s$  está expresada en Angstroms) tenga un valor predeterminado ( $\eta$ ), y el segundo, que los algoritmos de reconstrucción tengan una complejidad de cálculo mínima.

La primera de las condiciones la podemos expresar como

$$\eta = \frac{W_n^m(1/T_s)}{W_n^m(0)} = \frac{I_{n/2+m}(\sqrt{\alpha^2 - (2\pi a/T_s)^2})}{I_{n/2+m}(\alpha)} \left( \frac{\alpha}{\sqrt{\alpha^2 - (2\pi a/T_s)^2}} \right)^{n/2+m}$$

la cual fijada  $T_s$  determina una curva en el espacio  $(\frac{a}{T_m}, \alpha)$ .

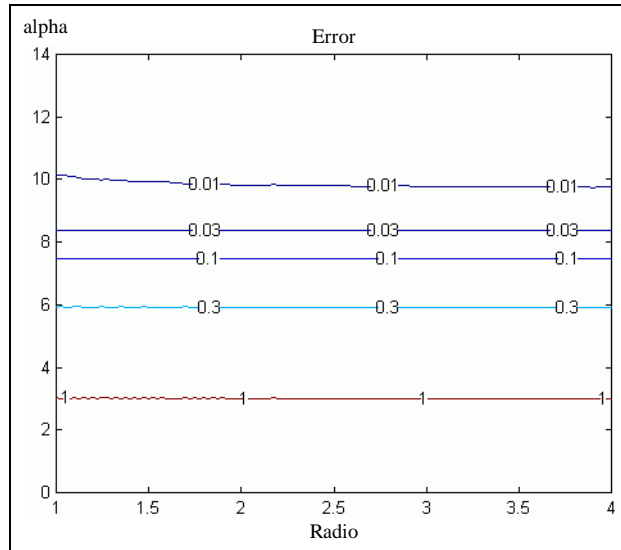


Figura 3.2: Error según el criterio de homogeneidad de densidades [105]

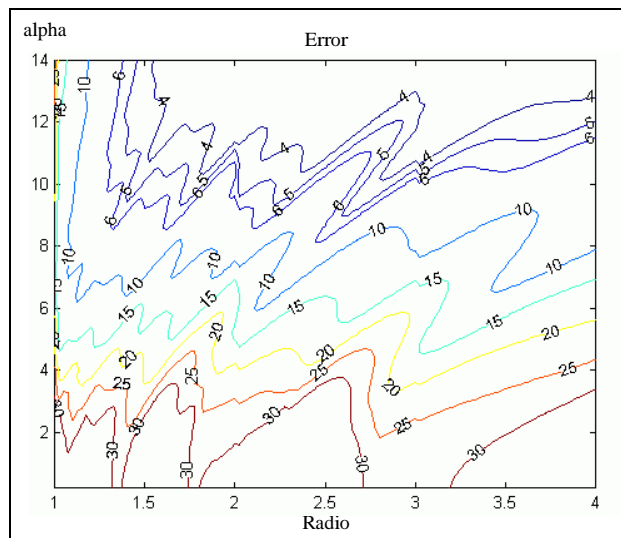


Figura 3.3: Error según el criterio de exactitud en las normales [54]

La complejidad del algoritmo de reconstrucción está directamente relacionada con el área proyectada por volumen, es decir, la suma de las áreas particulares de cada uno de los blobs. Suponiendo un volumen cúbico de  $N$  vóxeles de lado, la cantidad de blobs necesarios para representarlo es  $(N/\Delta_{BCC}(a, \alpha))^3$  y el área de la proyección de todos estos blobs  $(N/\Delta_{BCC}(a, \alpha))^3 (2a)^2$ . Así, nuestro problema de selección del blob se reduce a minimizar  $(N/\Delta_{BCC}(a, \alpha))^3 (2a)^2$  sujeto a  $\eta = \frac{W_n^m(1/T_s)}{W_n^m(0)}$  y  $(a, \alpha) \in [1, 5, 4] \times [11, 14]$ .

La siguiente tabla recoge algunos parámetros típicos para las condiciones reales encontradas en microscopía electrónica de partículas aisladas. Nótese que para ciertas combinaciones de frecuencia de muestreo y frecuencia máxima esperada es imposible alcanzar la atenuación requerida dentro de la región restringida.

$\eta$	$T_s(\text{Å})/T_m(\text{Å})$	$a(\text{pix})$	$\alpha$	$\Delta_{BCC}(\text{pix})$	$1/R_o(\text{Å})$
0.9	2	-	-	-	-
0.9	2.5	-	-	-	-
0.9	3	-	-	-	-
0.9	3.5	-	-	-	-
0.9	4	-	-	-	-
0.8	2	-	-	-	-
0.8	2.5	-	-	-	-
0.8	3	-	-	-	-
0.8	3.5	1.50	11.49	1.42	$0.70T_m$
0.8	4	1.69	11.00	1.23	$0.81T_m$
0.7	2	-	-	-	-
0.7	2.5	-	-	-	-
0.7	3	1.60	11.03	1.30	$0.77T_m$
0.7	3.5	1.86	11.00	1.12	$0.90T_m$
0.7	4	2.13	11.00	0.97	$1.03T_m$
0.6	2	-	-	-	-
0.6	2.5	1.59	11.02	1.31	$0.77T_m$
0.6	3	1.90	11.00	1.09	$0.92T_m$
0.6	3.5	2.22	11.00	0.93	$1.07T_m$
0.6	4	2.54	11.00	0.82	$1.22T_m$

Las figuras 3.4 y 3.5 muestran un ejemplo de las diferentes atenuaciones y complejidad computacional para los diferentes blobs de la región óptima.

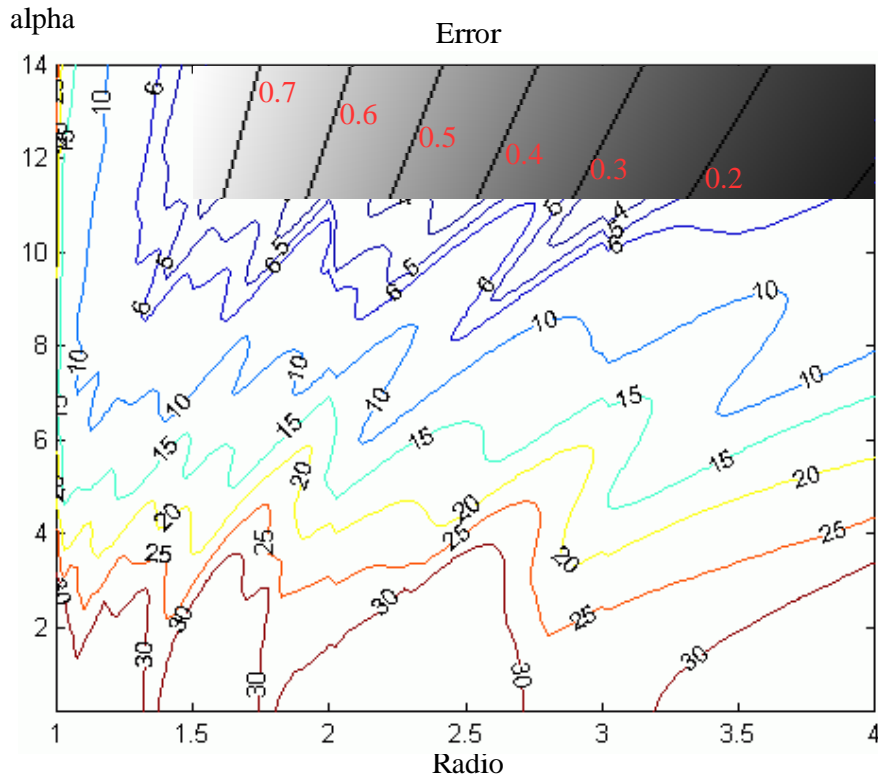


Figura 3.4: Atenuación para una relación  $T_s/T_m = 3$ . En la gráfica del error en las normales de una esfera expresada en blobs se ha superpuesto una imagen cuyo nivel de gris representa el coste computacional asociado al blob con los parámetros especificados por las correspondientes coordenadas de abscisas y ordenadas. Sobre esta imagen sobreimpresa se han representado isolíneas de atenuación constante a la frecuencia máxima de señal dada por  $T_s/T_m = 3$ , el valor de la atenuación se encuentra junto a la línea.

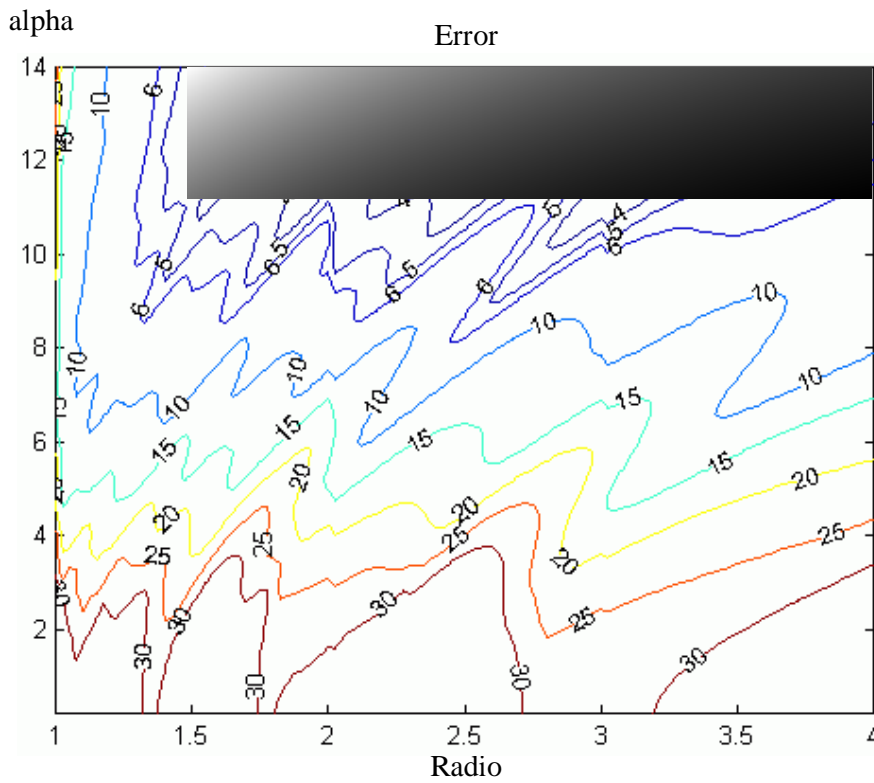


Figura 3.5: Coste computacional para  $T_s/T_m = 3$ : la densidad de gris es proporcional al número de operaciones.



### **3.1.3. Optimización de los parámetros libres del algoritmo de reconstrucción ART**

Durante el proceso de reconstrucción el usuario debe seleccionar una serie de parámetros que afectarán al resultado final obtenido. Los parámetros del blob ya han sido seleccionados en la sección 3.1.2, sin embargo, aún queda un parámetro muy importante, el factor de relajación de ART (sección 2.3.2), para el cual, en principio, no se da más indicación que el que debe encontrarse entre 0 y 2 para asegurar la convergencia del algoritmo [64, 20]. Sin embargo, es de prever que dicho parámetro influya decisivamente en la calidad de las reconstrucciones dependiendo de factores tales como el número de iteraciones, número de imágenes tratadas, tamaño y distribución angular de las mismas, masa total del volumen a reconstruir y nivel de ruido.

En este apartado nos ocuparemos de la selección óptima desde un punto de vista estadístico del factor de relajación para diferentes condiciones del resto de las variables. En primer lugar se desarrolla una metodología que mediante la simulación del proceso de reconstrucción permita extraer información sobre el mismo. A continuación se definen observadores numéricos, llamados figuras de mérito (FOM), que hacen la función de métrica de tal forma que podemos decidir desde un determinado punto de vista si una reconstrucción es mejor que otra. El siguiente paso consiste en la definición de un protocolo que permita escoger el valor del parámetro que más nos interese para la consecución de una tarea dada. Por último, se aborda el problema del estudio de la variabilidad del parámetro bajo estudio frente a las demás variables.

Como se ha indicado con anterioridad, el parámetro a optimizar es el factor de relajación de ART, mientras que el resto de las variables (número de iteraciones, número de imágenes, tamaño y distribución angular de las mismas, masa a reconstruir y nivel de ruido) definen el contexto de variabilidad de dicho parámetro.

### **3.1.4. Simulaciones**

En la práctica habitual de la reconstrucción tridimensional de espécimen estudiados por microscopía electrónica resulta difícil reconocer si una reconstrucción es mejor que otra, sobre todo si las diferencias son muy sutiles, dado que no se conoce cuál es el volumen perfecto al cual la reconstrucción obtenida debería parecerse. Por este motivo se hace necesario el uso de simulaciones, que partiendo de un volumen conocido, nos permitan decidir sobre la bondad de una reconstrucción dada. Esta aproximación ya ha sido utilizada con éxito en [52, 103, 98].

De este modo, la secuencia para hacer una sola simulación sería la siguiente:

1. **Elegir un volumen inicial:** éste representa nuestra solución perfecta, las diferentes reconstrucciones son mejores en tanto que son más parecidas a él.
2. **Elegir una geometría de proyección:** es decir, decidir desde dónde se van a tomar las diferentes proyecciones así como su número.
3. **Simular el proceso de generación de proyecciones:** en este paso se construye un conjunto de proyecciones que reproduzca de alguna manera el proceso de formación de imágenes dentro del microscopio o aquellas partes del proceso de particular interés. En este punto tendremos que definir la cantidad y naturaleza del ruido añadido.
4. **Simular el procesamiento bidimensional previo:** aquí deberemos preocuparnos por reproducir los procesos de alineamiento traslacional, rotacional, normalización, filtrado, enmascarado, ... que normalmente preceden a la reconstrucción tridimensional
5. **Realizar una reconstrucción con las proyecciones procesadas:** el resultado de este paso es equivalente al volumen reconstruido de la macromolécula bajo estudio con que normalmente se termina en un caso puramente experimental. En esta etapa es donde entran en juego los parámetros libres del algoritmo de reconstrucción.
6. **Evaluación de los resultados:** al disponer de la solución perfecta podemos determinar el grado de exactitud alcanzado por el proceso en conjunto, y en particular por la elección de los parámetros libres.

En apartados posteriores tendremos la oportunidad de analizar más en detalle los pasos de evaluación (sección 3.1.5) y tratamiento estadístico de los resultados de múltiples simulaciones (sección 3.1.6). Por el contrario, analicemos en este momento el resto de los pasos más en profundidad.

El volumen inicial suele denominarse *phantom* y puede estar formado por cualquier tipo de volúmenes, aunque debería tener alguna relación con el caso particular que nos ocupa. En este sentido, se pueden utilizar proteínas cuya estructura se conoce a alta resolución. Este tipo de *phantoms* tiene la ventaja de que modelan bien la naturaleza de los volúmenes que luego se van a reconstruir experimentalmente, sin embargo, se corre el peligro de hacer las medidas demasiado

dependientes del *phantom* concreto utilizado además de no disponer de muchas medidas de similaridad (ver apartado 3.1.5 correspondiente a las figuras de mérito) entre volúmenes cuyo valor viene definido vóxel a vóxel. Un segundo conjunto de *phantoms* que se puede emplear consiste en la definición matemática de un conjunto de construcciones geométricas (cubos, cilindros, conos y esferas). En este caso las densidades dentro de las figuras son constantes por lo que no se modela tan bien la naturaleza variable de las proteínas pero, por el contrario, se dispone de una gran riqueza de medidas de similaridad y se pueden variar los parámetros de las figuras tanto como se desee con lo que estaríamos independizando las medidas de la masa concreta del volumen utilizado.

Para la optimización de los parámetros libres del algoritmo de reconstrucción se ha optado por *phantoms* geométricos, mientras que para el estudio de las diferentes mejoras añadidas al algoritmo se usan ambos tipos de *phantoms* puesto que nos interesa conocer el impacto de las mismas al nivel más profundo posible.

En concreto, para la optimización del factor de relajación de ART se ha empleado una familia de *phantoms* consistente en un conjunto de cuatro dobles parejas de cilindros colocados en posición vertical cuyos radios, alturas y separación entre cilindros eran escogidas aleatoriamente. La figura 3.6 muestra uno de tales *phantoms*.

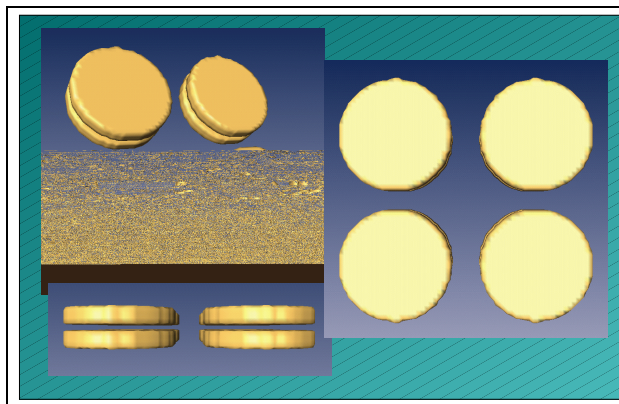


Figura 3.6: *Phantom* tipo de una familia compuesta a base de elementos geométricos

En cuanto a la geometría de proyección se debe elegir aquella distribución angular que mejor represente al caso en estudio. Al mismo tiempo, también se debe incluir el concepto de aleatoriedad en la elección de las direcciones concretas de proyección con la intención de independizar en la medida de lo posible los

resultados de una realización particular distribución angular. La idea es elegir un conjunto aleatorio de direcciones de proyección tal que cumpla los requisitos de la distribución angular deseada (inclinación cónica aleatoria, inclinación de eje simple, uniforme, ...).

Por lo que a la simulación del proceso de formación de imagen respecta debe ser capaz de reproducir dos niveles de ruido diferentes según se trate de tinción negativa o criomicroscopía. Asimismo, se debe poder incluir el efecto de la función de transferencia del microscopio (CTF).

La simulación del procesamiento bidimensional debe poder incluir operaciones simples sobre imágenes tales como normalización, filtrado o enmascarado, pero también debe ser capaz de simular el proceso de alineamiento rotacional y traslacional. Estos últimos pueden ser fácilmente modelados por medio de la adición de un ruido gaussiano de media cero a los parámetros que definen tanto la posición central de la imagen como su dirección de proyección.

El siguiente paso consiste en la aplicación de un algoritmo de reconstrucción al conjunto de proyecciones obtenidas por las etapas anteriores. Los parámetros de reconstrucción pueden ser fijos o aleatorios dentro de una región [102, 137]. Con esta segunda opción, independizaremos el estudio del comportamiento del algoritmo con respecto a pequeñas variaciones de los parámetros libres. En la sección 3.1.6 se muestra cómo no se puede hablar de un parámetro óptimo sino de una región óptima, con lo que la elección de dicho parámetro de forma aleatoria dentro de esta región adquiere un significado adicional.

Por último hay que evaluar el volumen reconstruido frente al *phantom* inicial y asegurarse que dicha evaluación es significativa y no fruto de la casualidad, pero estas consideraciones serán objeto de las secciones a continuación.

### 3.1.5. Evaluadores numéricos: Figuras de Mérito

La comparación objetiva de volúmenes reconstruidos frente a un modelo dado responde a la necesidad de una evaluación de la actuación de diferentes algoritmos de reconstrucción o de un mismo algoritmo utilizado bajo distintas condiciones. La metodología basada en observadores numéricos (Figuras de Mérito, FOM) ha sido ampliamente validada tanto en entornos de tomografía médica [103] como en microscopía electrónica [98, 137].

Se han desarrollado dos familias de Figuras de Mérito con cometidos diferentes: una llamada de *consistencia estructural* y otra de *separabilidad estructural*. La consistencia estructural se centra en la correspondencia entre los niveles de densidad de los vóxeles en la reconstrucción y el modelo, mientras que la sepa-

rabilidad estructural cuantifica lo fácil o difícil que sería diferenciar el objeto en estudio del fondo.

En conjunto hay 25 observadores numéricos que nos ayudarán a determinar la bondad de una reconstrucción. La metodología de comparación entre los conjuntos de figuras de mérito correspondiente a dos situaciones diferentes será objeto de estudio de la siguiente sección, mientras que en éste se realiza una descripción pormenorizada de cada uno de los observadores.

### Figuras de Mérito de consistencia estructural

Los evaluadores numéricos de consistencia estructural miden las discrepancias entre los niveles de densidad observados en la reconstrucción obtenida y el *phantom* modelo. Para ello se realizan medidas locales y globales sobre los niveles medios de gris, rangos y desviaciones típicas en determinadas regiones que analizaremos con detalle más adelante. También se puede medir el error en términos absolutos cometido punto a punto o realizar comparaciones globales basadas en la medida de la resolución alcanzada, información mutua o covarianza.

Antes de proceder a la formalización de esta familia de observadores definamos la notación necesaria. Sea  $R$  el conjunto de los vóxeles contenidos en la región de interés y  $N_R$  su cardinal (los vóxeles están numerados de 1 a  $N_R$ ). El voxel número  $i$  de la región  $R$  en el *phantom* se nota como  $p_{R,i}$  mientras que en la reconstrucción  $r_{R,i}$ . Las medias y desviaciones típicas de los valores de densidad dentro de la región  $R$  dentro del *phantom* y la reconstrucción se denominan  $\mu_{p,R}$ ,  $\mu_{r,R}$ ,  $\sigma_{p,R}$  y  $\sigma_{r,R}$  respectivamente, mientras que los valores máximos y mínimos se escriben como  $M_{p,R}$ ,  $M_{r,R}$ ,  $m_{p,R}$  y  $m_{r,R}$ .

La definición de las diferentes Figuras de Mérito con esta notación son las siguientes:

- **Error cuadrático medio:** Esta medida evalúa la diferencia entre ambos volúmenes punto a punto dando mayor importancia a los errores grandes.

$$scL2(R) = 1 - \frac{1}{N_R} \sum_{i=1}^{N_R} \left( \frac{p_{R,i} - r_{R,i}}{2} \right)^2$$

- **Error absoluto medio:** Esta medida también evalúa la diferencia entre ambos volúmenes punto a punto pero dando igual peso a todos los errores.

$$scL1(R) = 1 - \frac{1}{N_R} \sum_{i=1}^{N_R} \left| \frac{p_{R,i} - r_{R,i}}{2} \right|$$

- **Error en el valor medio:** Diferencia entre el valor medio en las dos regiones correspondientes.

$$sc\mu(R) = 1 - \frac{1}{2} |\mu_{p,R} - \mu_{r,R}|$$

- **Error en la desviación típica:** Diferencia entre las desviaciones típicas en las dos regiones correspondientes.

$$sc\sigma(R) = 1 - |\sigma_{p,R} - \sigma_{r,R}|$$

- **Error en el rango de la señal:** Diferencia entre el rango de señal, definido como el comprendido entre el mínimo y el máximo de los niveles de gris en la región estudiada.

$$sc\Delta(R) = 1 - \frac{1}{2} (|M_{p,R} - M_{r,R}| + |m_{p,R} - m_{r,R}|)$$

Este conjunto de medidas pueden efectuarse bien sobre todo el volumen ( $V$ , *Volume*), bien sobre el fondo ( $B$ , *Background*) o sobre los diferentes objetos de interés ( $F$ , *Foreground*).

Un segundo conjunto de observadores de consistencia estructural realiza medidas globales, a saber:

- **Detección de emborronamiento:** Con esta figura de mérito se trata de identificar aquellas reconstrucciones para las que el fondo más cercano a los objetos de interés tienen errores mayores. Para ello, se pondera el error cometido punto a punto en el fondo por su distancia más corta a un objeto de interés.

$$scbl = 1 - \frac{1}{N_B} \sum_{i=1}^{N_B} \frac{1}{d_i} \left( \frac{p_{B,i} - r_{B,i}}{2} \right)^2$$

- **Detección de nuevas masas:** Es frecuente encontrar la aparición de pequeñas masas artefactuales alejadas de lo que es el objeto bajo estudio. Con esta figura de mérito se trata de reconocer aquellas reconstrucciones en las que no aparecen dichas masas.

$$scap = 1 - \frac{1}{N_B} \sum_{i=1}^{N_B} d_i \left( \frac{p_{B,i} - r_{B,i}}{2} \right)^2$$

- **Comparación de la transformada de Radon:** Bajo determinadas condiciones de la distribución angular, es posible que el volumen reconstruido se encuentre elongado a lo largo de una determinada dirección  $\vec{\omega}$ . Comparando las transformadas de Radon del *phantom* ( $\mathcal{TR}\{p, \vec{\omega}\}$ ) y de la reconstrucción ( $\mathcal{TR}\{r, \vec{\omega}\}$ ) a lo largo de la dirección elongada se pueden detectar estas elongaciones. Se puede pensar en esta medida como la comparación de la media de los niveles de gris contenidos en  $K$  planos perpendiculares a la dirección de la transformada en los dos volúmenes.

$$scrt = 1 - \frac{1}{K} \sum_{i=1}^K |\mathcal{TR}\{p, \vec{\omega}\}(i) - \mathcal{TR}\{r, \vec{\omega}\}(i)|$$

- **Coefficiente de correlación:** Esta medida estadística proporciona una idea de la similaridad entre dos conjuntos de datos apareados. Estableciendo una correspondencia punto a punto entre ambos volúmenes podemos estudiar la correlación entre los dos conjuntos.

$$sc\rho = \frac{\frac{1}{N_V} \sum_{i=1}^{N_V} (p_{V,i} - \mu_{p,V})(r_{V,i} - \mu_{r,V})}{\frac{1}{N_V} \sum_{i=1}^{N_V} (p_{V,i} - \mu_{p,V})^2 \frac{1}{N_V} \sum_{i=1}^{N_V} (r_{V,i} - \mu_{r,V})^2}$$

- **Información mutua:** La información mutua es una medida de distancia entre imágenes muy utilizada en otras aplicaciones [123] y que encuentra sus raíces en conceptos de teoría de la información. La idea es comparar los volúmenes a nivel de función densidad de probabilidad, o en su defecto una aproximación de ella como puede ser el histograma normalizado ( $H_p$ ,  $H_r$  y  $H_{pr}$  respectivamente para el *phantom*, reconstrucción y distribución conjunta con  $N_{H_p}$ ,  $N_{H_r}$  y  $N_{H_p} \times N_{H_r}$  divisiones cada uno).

$$scinf = \frac{\frac{1}{N_{H_p} N_{H_r}} \sum_{i=1}^{N_{H_p}} \sum_{j=1}^{N_{H_r}} (-H_{pr}(i, j) \log(H_{pr}(i, j)))}{\frac{1}{N_{H_p}} \sum_{i=1}^{N_{H_p}} (-H_p(i) \log(H_p(i))) \frac{1}{N_{H_r}} \sum_{i=1}^{N_{H_r}} (-H_r(i) \log(H_r(i)))}$$

- **Resolución alcanzada:** En microscopía electrónica tridimensional la resolución suele entenderse [47] como la concordancia en el espacio de frecuencias entre dos volúmenes reconstruidos con conjuntos de imágenes independientes. En particular, la llamada Correlación de Capas de Fourier (*Fourier Shell Correlation*, FSC) se define como

$$FSC(\mathbf{R}, \Delta\mathbf{R}) = \frac{\sum_{(\mathbf{R}, \Delta\mathbf{R})} \mathcal{FT}\{p\}(\mathbf{R}) \mathcal{FT}^*\{r\}(\mathbf{R})}{\sqrt{\sum_{(\mathbf{R}, \Delta\mathbf{R})} |\mathcal{FT}\{p\}|^2 \sum_{(\mathbf{R}, \Delta\mathbf{R})} |\mathcal{FT}\{r\}|^2}}$$

donde  $\mathcal{FT}\{v\}$  es la transformada de Fourier del volumen  $v$ ,  $\mathbf{R}$  es la coordenada de frecuencia espacial,  $\Delta\mathbf{R}$  es el ancho de de la capa, y  $*$  denota al complejo conjugado. El valor esperado de FSC cuando se aplica con ruido blanco es de  $FSC_{crit} = \frac{1}{\sqrt{N_{(\mathbf{R},\Delta\mathbf{R})}}}$  [151], es decir el inverso de la raíz cuadrada del número de coeficientes de la transformada de Fourier que se encuentran dentro de la capa, por lo que lo normal es definir la resolución alcanzada como aquel valor de  $\mathbf{R}$  tal que  $FSC(\mathbf{R},\Delta\mathbf{R}) \leq K \cdot FSC_{crit}$ , donde  $K$  es un valor a elegir entre 2 y 5 [47].

### Figuras de Mérito de separabilidad estructural

La separabilidad estructural se refiere a la facilidad con que un método de segmentación basado únicamente en la densidad de gris de los vóxeles podría separar el fondo del objeto de interés [137]. Para ello se estudian las distribuciones estadísticas de los niveles de gris en diferentes zonas. Suponiendo que se trabaja con *phantoms* formados por dobles cilindros, se puede dividir el espacio en cuatro regiones (ver figura 3.7). Con la misma notación utilizada en la sección anterior, y llamando  $I$  al conjunto de vóxeles en la región más interior,  $O$  a los que se encuentran dentro del objeto en la zona más exterior y  $S$  a los que estando en el fondo están más cerca del objeto, podemos definir las siguientes medidas de separabilidad:

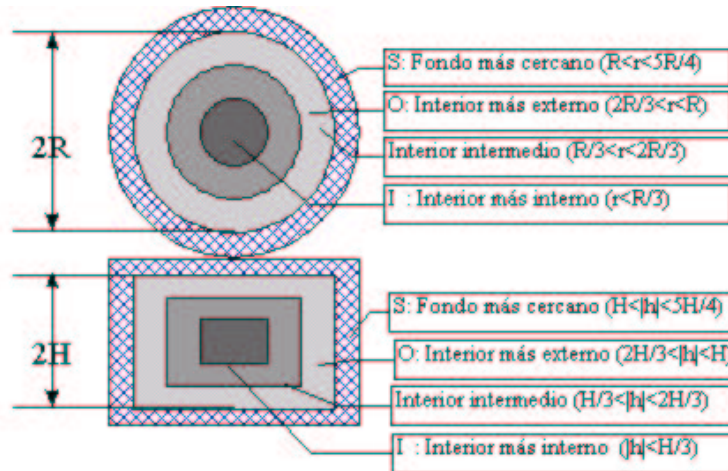


Figura 3.7: Descomposición de las diferentes zonas de un *phantom* de doble cilindro



- **Detectabilidad de la zona más interior:** Esta medida se basa en el estadístico t de Student para diferencia de medias [152] ya que el planteamiento es conocer si la media de la zona interior es diferente de la media del fondo más cercano.

$$hsin = \frac{|\mu_I - \mu_S|}{\sqrt{\frac{\sigma_I^2}{N_I} + \frac{\sigma_S^2}{N_S}}}$$

- **Detectabilidad de la zona más exterior:** Al igual que la anterior se determina la diferencia entre las medias de la zona más exterior del *phantom* con la del fondo que está más cerca. Estas dos regiones son colindantes por lo que esta información tiene especial relevancia en cuanto a la segmentación.

$$hsbr = \frac{|\mu_O - \mu_S|}{\sqrt{\frac{\sigma_O^2}{N_O} + \frac{\sigma_S^2}{N_S}}}$$

- **Error de detectabilidad:** El error de detectabilidad determina la probabilidad de que un algoritmo de segmentación basado únicamente en la relación entre los niveles de gris cometa un error de clasificación. Para ello se mide la probabilidad,  $dt_{err}$ , de que un voxel del fondo se pueda atribuir a la distribución de los puntos de la característica y viceversa [152]. En esta medida juega un papel fundamental el nivel de densidad en que ambas distribuciones se cruzan según se muestra en la figura 3.8. En concreto, el valor de esta FOM se calcula únicamente en la reconstrucción (no tiene sentido hacerlo en el *phantom* puesto que sus distribuciones son  $\delta$ 's y carecen de error de clasificación) y su expresión vale

$$hsdt = 1 - dt_{err}$$

- **Resolución vertical:** Dada la particular estructura de los *phantoms* utilizados puede definirse una figura de mérito basada en los valores de densidad encontrados en tres planos diferentes según se muestra en la figura 3.9. Construyamos la variable aleatoria  $p = \frac{1}{2}(p_{1i} + p_{2i} - 2p_{3i})$  donde  $p_{1i}$ ,  $p_{2i}$  y  $p_{3i}$  representan a valores de gris en cada uno de los planos. Suponiendo que  $p_{1i} \approx p_{2i}$  entonces esta variable toma un valor máximo cuando  $p_{1i} \approx p_{2i} \gg p_{3i}$  y mínimo cuando  $p_{1i} \approx p_{2i} \approx p_{3i}$ . Se ha propuesto como medida del apuntamiento de esta distribución el estadístico

$$hsvr = \frac{\mu_{\pi_1} + \mu_{\pi_2} - 2\mu_{\pi_3}}{\frac{1}{2}\sqrt{\sigma_{\pi_1}^2 + \sigma_{\pi_2}^2 + 4\sigma_{\pi_3}^2}}$$

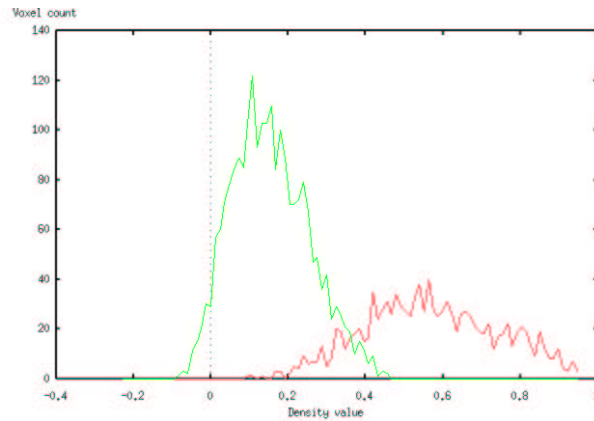


Figura 3.8:  $dt_{err}$  se define como la probabilidad de error de clasificación atendiendo únicamente a las distribuciones de los niveles de densidad del fondo y la característica.

siendo  $\mu_{\pi_i}$  y  $\sigma_{\pi_i}^2$  la media y varianza de las densidades en el plano  $\pi_i$ . Desde el punto de vista de reconstrucción de los *phantoms* bajo estudio interesa que  $hsvr$  tome el valor mayor posible.

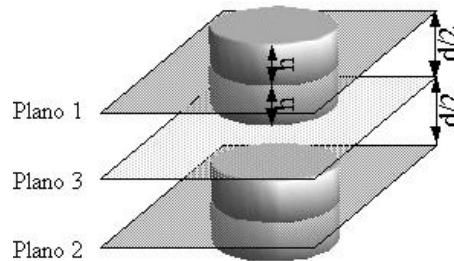


Figura 3.9: Definición de los planos utilizados para la resolución vertical.

### 3.1.6. Metodología de optimización de parámetros

Inicialmente los parámetros libres en el algoritmo de reconstrucción son aquellos que definen el blob (radio, orden, factor de suavidad), la rejilla (separación entre muestras), el factor de relajación de ART ( $\lambda$ ) y el número de iteraciones ( $n$ ). Hemos visto cómo el blob y la rejilla vienen determinados por consideraciones de resolución y complejidad computacional, aunque no así los otros dos parámetros. En esta sección nos ocuparemos de dicha cuestión.

Por motivos de velocidad y dado que se obtienen habitualmente muchas más ecuaciones que incógnitas, aunque dichas ecuaciones sean inconsistentes debido al ruido, se realizará una única iteración de ART. Experiencias previas [98, 96, 101, 91, 8] demuestran que en el caso de reconstrucción de partículas aisladas en microscopía electrónica suele ser suficiente. Existe otro motivo para no iterar muchas veces en ART y es que la secuencia de soluciones a la que tiende (ver sección 2.3.2) incorpora gran parte del ruido de las imágenes ya que pretende minimizar el error cuadrático medio entre las proyecciones teóricas y las experimentales.

Aproximaciones anteriores [52, 103, 102, 96, 137] tratan de buscar el comportamiento óptimo del algoritmo con respecto a una función de entrenamiento ( $tFOM$ ) basada exclusivamente en una única figura de mérito ( $FOM$ ). Esta búsqueda puede hacerse considerando dicha función de entrenamiento de forma determinista ([52, 103, 102, 96]) o aleatoria ([137]). El principal inconveniente de estos métodos es la elección de la figura de mérito a optimizar: la selección de una sola  $FOM$  de entrenamiento desecha mucha otra información contenida en otras  $FOMs$ . De hecho, como mostraremos a lo largo de la sección, existen dos tendencias predominantes y contrapuestas entre sí en el comportamiento de las  $FOMs$  en relación a  $\lambda$ : una que mide la calidad de la reconstrucción del fondo y otra en la que la calidad de las características es preferida. Tradicionalmente ([98, 96, 137]) se ha elegido el error cuadrático medio dentro de las características ( $scL_2(F)$ ) como  $FOM$  a optimizar, la cual responde únicamente a la segunda de las tendencias traduciéndose en un serio problema de insensibilidad al ruido.

En esta tesis se propone el empleo de toda la información disponible en las  $FOMs$  en la búsqueda de  $\lambda$  para cada una de las iteraciones. El algoritmo propuesto es el siguiente:

1. Realizar una serie de reconstrucciones para cada una de los posibles puntos de interés ( $\lambda_j$ )
2. Evaluar cada una de las reconstrucciones obteniendo un conjunto de realizaciones para cada  $FOM$  y cada punto de interés ( $FOM_i(\lambda_j)$ )
3. Analizar estadísticamente de los resultados obtenidos (cada  $FOM$  constituye una variable)
  - a) Eliminación de elementos no representativos (*outliers*)
  - b) Eliminación de aquellas variables que no lograron determinar con cierta exactitud el valor medio de la  $FOM$  para todas las  $\lambda_j$

- c) Eliminación de variables no correlacionadas con  $\lambda$
- d) Agrupación de las *FOMs* por correlación y elección de un representante de clase
- e) Análisis del comportamiento de cada *FOM* con respecto a  $\lambda$  y agrupamiento de las *FOMs* respecto al mismo
- f) Análisis factorial: reducción de la dimensionalidad de cada grupo por medio de análisis de componentes principales
- g) Combinación de los distintos factores de cada grupo en un único observador numérico
- h) Elección de la región óptima por medio de contrastes de hipótesis sobre la igualdad de las medias para cada comportamiento

La serie de reconstrucciones deberá mostrar una variabilidad suficiente y representativa del caso bajo estudio para evitar situaciones de sesgo estadístico. Habitualmente se suelen variar de una reconstrucción a la siguiente la realización del *phantom* (en cada reconstrucción se escoge un *phantom* diferente de los pertenecientes a una determinada familia), la realización de la geometría de recolección de datos (las proyecciones varían su posición en el espacio aunque en general se conserva una determinada propiedad de la geometría de recolección), y la realización del ruido (tanto a nivel de píxeles como de ruido traslacional y angular). De esta forma obtenemos un conjunto de volúmenes (de cardinalidad  $N$ ) para cada  $\lambda_j$ . Posteriormente se procede a la evaluación de la calidad (sección 3.1.5) de cada uno de ellos, consiguiendo así  $N$  medidas para cada una de las *FOMs* y cada  $\lambda_j$ .

A continuación se aplica un análisis estadístico sobre los resultados obtenidos. Se comienza por eliminar aquellos volúmenes que no son representativos de las distribuciones de cada una de las *FOMs*, para este cometido pueden ser de utilidad las representaciones por pares de *FOM* así como representaciones de los histogramas correspondientes. Así mismo, se eliminan del análisis aquellas variables para las que para cada  $\lambda_j$  no se ha alcanzado una determinada resolución del valor medio ( $r\%$ ) con una confianza de  $\alpha$ . Si se puede asumir normalidad en la *FOM* estudiada para  $\lambda_j$ , dicho test se reduce a comprobar [152] que  $\frac{t_{1-\alpha/2;N} \frac{s_{FOM}}{\sqrt{N}}}{\bar{x}_{FOM}} < \frac{r}{100}$  donde  $t_{1-\alpha/2;N}$  es el valor para el que una t-Student de  $N$  grados de libertad cumple que  $Pr\{t > t_{1-\alpha/2;N}\} = \alpha/2$ ,  $\bar{x}_{FOM}$  y  $s_{FOM}$  son estimadores de la media y desviación típica respectivamente de dicha *FOM*. En caso de no

poder asumir normalidad en los datos, en virtud del teorema de Cauchy [108] se puede escribir  $\frac{\frac{1}{\sqrt{\alpha}} \frac{s_{FOM}}{\sqrt{N}}}{\bar{x}_{FOM}} < \frac{r}{100}$ .

Continuaremos eliminando aquellas variables cuya correlación con  $\lambda$  es menor que un umbral ( $cth_\lambda$ ) ya que este nivel bajo de correlación indica que la *FOM* con esta propiedad es casi independiente del conjunto de  $\lambda$ 's seleccionado. En este punto consideraremos las correlaciones cruzadas entre todas las *FOMs* supervivientes, este análisis nos revelará la existencia de duplicidad o redundancia en la información ofrecida por las diferentes *FOMs*. Este paso es necesario para estabilizar numéricamente el análisis de componentes principales. De modo que se define una clase equivalente de *FOMs* como aquel conjunto de ellas tal que todos sus elementos están correlacionados con todos en más de un cierto umbral ( $cth_{gr}$ ). De entre todos los elementos de una clase equivalente elegiremos como representante de clase a aquel que muestre menor correlación con el resto de variables no pertenecientes al grupo.

Ahora se dividirán las *FOMs* supervivientes en tantos grupos distintos ( $G$ ) como comportamientos se observen con respecto a  $\lambda$ , veremos más adelante (secciones 5.1 y 5.5) que pueden presentarse distintos tipos de comportamientos. En particular casi siempre nos encontramos con dos: *FOMs* crecientes con  $\lambda$  y *FOMs* decrecientes. Esta clasificación en tendencias es similar a la realizada en el paso anterior: una *FOM* puede adherirse a un grupo si su correlación media con el grupo es superior a un umbral  $cth_{tendencia}$ .

La clasificación en  $T$  tendencias supone una partición,  $\pi = \bigcup_{t=1}^T \pi_t$ ,  $\pi_t = \{FOM_{1_t}, FOM_{2_t}, \dots\}$  del conjunto de *FOMs*. El cálculo de esta partición está sujeto a la maximización del funcional  $f(\pi) = \sum_{\pi_t \in \pi} S(\bar{r}_{\pi_t}) + \lambda H(\#\pi)$  donde  $S(x) = \frac{1}{1+e^{-ax}}$  es la función sigmoide,  $\bar{r}_{\pi_t}$  es la correlación media de los integrantes de la tendencia  $\pi_t$ ,  $\lambda$  es un factor de ponderación entre los dos criterios a maximizar y  $H(\#\pi)$  representa la entropía del número de *FOMs* asociadas a cada tendencia. Este funcional pretende minimizar el número de tendencias reconocidas a través de la entropía mientras que se mantiene un grado máximo de correlación en el interior de las mismas.

En este instante nos encontramos con una serie de tendencias de *FOMs* con diferentes comportamientos con varias *FOMs* asignadas a cada uno de ellos. Es de prever que dentro de cada grupo haya información redundante por lo que aplicaremos un análisis factorial para determinar la cantidad de variables "independientes" presentes en cada uno. Para dicho análisis realizaremos una descomposición ortogonal en componentes principales (PCA, [33]) quedándonos con las primeras  $F$  componentes más representativas (aquellas que explican un  $th_{gr}$  de la varianza

total del grupo). Llamemos  $gr_i$  a la componente  $i$  del grupo  $gr$  analizado, la cual explica un  $100w_i\%$  de la varianza. Podemos combinar las diferentes componentes en un único observador numérico para el grupo de  $FOMs$ ,  $gr = \sum_{i=1}^F w_i gr_i$ , de tal forma que resuma la tendencia generalizada de las  $FOMs$  pertenecientes al grupo.

Por último realizaremos una búsqueda de la zona óptima de  $\lambda$  estudiando las medias de la nueva  $FOM$  de grupo a cada  $\lambda_j$  y sus diferencias estadísticamente significativas, buscaremos un compromiso entre aquellas  $FOMs$  que tienden a crecer con  $\lambda$  y las que tienden a disminuir. Una variable que puede ayudarnos en este sentido es  $condensed_{FOM} = \sum_{g=1}^G (gr_g \sum_{i=1}^F w_i gr_i)$ .

En la sección 5.1 se muestra un ejemplo de aplicación de este algoritmo de optimización.

### 3.1.7. Variabilidad de los parámetros libres

Según se ha visto hasta el momento, el principal parámetro libre del algoritmo de reconstrucción considerado, ART, es el factor de relajación  $\lambda$ . Hasta ahora se ha desarrollado una metodología que permite seleccionar dicho parámetro de entre un conjunto de valores para el cual la actuación del algoritmo es óptima desde un punto de vista en el que se consideran todas las figuras de mérito a un mismo tiempo. Este conjunto se ha seleccionado tratando de independizarlo de factores tales como el phantom utilizado, la geometría exacta de recolección de datos (aunque no de su familia), y realizaciones de ruido tanto a nivel de niveles de densidad como de error rotacional y traslacional.

Sin embargo, dicho factor de relajación aún puede depender de otras variables tales como la naturaleza de las imágenes tratadas (relación señal a ruido, estructura de correlación de dicho ruido, ...), el número de ellas y su tamaño. La técnica estadística conocida como análisis de varianza (ANOVA, *Analysis of Variance*) será la empleada en la tarea de determinar si existen diferencias entre los rangos asociados a cada situación. Para ello se realizarán 3 análisis de varianza (uni-, bi- y tri-factorial) sobre cada uno de los límites superior e inferior del rango correspondiente. Después de este análisis seremos capaces de responder a las siguientes preguntas:

- ¿Depende  $\lambda$  del número de imágenes, su tamaño o su naturaleza?
- ¿Hay combinaciones de variables que influyen significativamente sobre el rango?

- ¿Pueden reducirse el tamaño de las imágenes con su número a una sola variable que dé cierta cuenta del grado de determinación del sistema de ecuaciones tal y como se hizo en la sección 3.1.1?

En caso de no haber diferencia entre los diferentes valores de las variables estudiadas, el propio análisis ANOVA nos proporcionará un rango consenso, mientras que en caso de haberlo se aplicará un análisis de regresión no lineal que determine el rango a utilizar en cada caso. A continuación se expone de modo genérico la metodología a utilizar tanto durante el análisis ANOVA como en el de regresión.

### Análisis ANOVA

Las premisas del análisis ANOVA son que los datos son independientes entre sí, que provienen de una o varias distribuciones normales aunque todas ellas comparten la misma varianza poblacional (homocedasticidad) [152]. Asumiendo que dichas condiciones son válidas en los casos de estudio que nos competen, el análisis ANOVA trata de resolver el siguiente problema:

*Dada una variable aleatoria,  $X$ , de la que se realizan  $N$  observaciones para la que se prevé una dependencia con un conjunto de variables deterministas a las que denominaremos  $A, B, C, \dots$  cada una con un conjunto de valores diferentes  $n_A, n_B, n_C, \dots$  determinar aquellas variables o combinaciones de ellas de las que efectivamente depende.*

La idea de ANOVA es la de descomponer la varianza de la variable  $X$  en sus diferentes fuentes, permitiendo un análisis posterior sobre la significación estadística de la dependencia con dicha fuente y el contraste de hipótesis sobre la igualdad de los efectos de cada uno de los tratamientos (nombre que recibe cada uno de los niveles de las diferentes variables). Plantearemos por su utilidad en esta tesis el caso ANOVA tri-factorial, su simplificación a dos factores o uno es trivial, tan sólo hay que eliminar los términos y subíndices que carezcan de sentido.

El análisis ANOVA propone que el nivel medido en la realización  $m$  de  $X$  para un nivel  $a_i$  de la variable  $A$ ,  $b_j$  de  $B$  y  $c_k$  de  $C$  responde al siguiente modelo

$$x_{ijkm} = \mu + a_i + b_j + c_k + (ab)_{ij} + (ac)_{ik} + (bc)_{jk} + (abc)_{ijk} + e_{ijkm}$$

o lo que es lo mismo, un nivel medio  $\mu$  al que se le adicionan una serie de términos que responden únicamente al estado de una determinada combinación

de variables y un error aleatorio de potencia constante aunque desconocida. Cada combinación de variables se conoce como una celda y habitualmente el número de observaciones de la variable  $X$  en cada celda es constante.

Para la resolución del modelo se emplearán las siguientes definiciones

$$\begin{aligned} x_{i..} &= \frac{1}{N_{i..}} \sum_{j,k,m} x_{ijkm} & x_{.j.} &= \frac{1}{N_{.j.}} \sum_{i,k,m} x_{ijkm} & x_{..k} &= \frac{1}{N_{..k}} \sum_{i,j,m} x_{ijkm} \\ x_{ij.} &= \frac{1}{N_{ij.}} \sum_{k,m} x_{ijkm} & x_{i.k} &= \frac{1}{N_{i.k}} \sum_{j,m} x_{ijkm} & x_{.jk} &= \frac{1}{N_{.jk}} \sum_{i,m} x_{ijkm} \\ \bar{x} &= \frac{1}{N_{ijkm}} \sum_{i,j,k,m} x_{ijkm} & x_{ijk} &= \frac{1}{N_{ijk}} \sum_m x_{ijkm} \end{aligned}$$

donde los  $N$  representan el número de términos de cada una de las sumas. De esta suerte, los parámetros del modelo quedan como

$$\begin{aligned} \hat{\mu} &= \bar{x} \\ \hat{a}_i &= x_{i..} - \bar{x} \\ \hat{b}_j &= x_{.j.} - \bar{x} \\ \hat{c}_k &= x_{..k} - \bar{x} \\ \widehat{(ab)}_{ij} &= x_{ij.} - x_{i..} - x_{.j.} + \bar{x} \\ \widehat{(bc)}_{jk} &= x_{.jk} - x_{.j.} - x_{..k} + \bar{x} \\ \widehat{(ac)}_{ik} &= x_{i.k} - x_{i..} - x_{..k} + \bar{x} \\ \widehat{(abc)}_{ijk} &= x_{ijk} - x_{ij.} - x_{.jk} - x_{i.k} + x_{i..} + x_{.j.} + x_{..k} - \bar{x} \end{aligned}$$

Y finalmente la descomposición de la varianza se puede realizar de acuerdo a la siguiente tabla



Variable	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)
Total	$N_{ijkm} \sum_{i,j,k,m} (x_{ijkm} - \hat{x})^2$	$N_{ijkm}$
A	$N_{ijkm} \sum_i (\hat{a}_i)^2$	$n_A - 1$
B	$N_{ijkm} \sum_j (\hat{b}_j)^2$	$n_B - 1$
C	$N_{ijkm} \sum_k (\hat{c}_k)^2$	$n_C - 1$
AB	$N_{ijkm} \sum_{i,j} ((\widehat{ab})_{ij})^2$	$gl(A)gl(B)$
BC	$N_{ijkm} \sum_{j,k} ((\widehat{bc})_{jk})^2$	$gl(B)gl(C)$
AC	$N_{ijkm} \sum_{i,k} ((\widehat{ac})_{ik})^2$	$gl(A)gl(C)$
ABC	$N_{ijkm} \sum_{i,j,k} ((\widehat{abc})_{ijk})^2$	$gl(A)gl(B)gl(C)$
Error	$SC(Total) - SC(A) - SC(B) - SC(C) - SC(AB) - SC(BC) - SC(AC) - SC(ABC)$	$gl(Total) - gl(A) - gl(B) - gl(C) - gl(AB) - gl(BC) - gl(AC) - gl(ABC)$

Para determinar si hay o no diferencias en los tratamientos producidos por la variable o combinación de variables  $Y$  ( $H_0 : \forall i Y_i = 0$ ) se comprueba si

$$\frac{SC(Y)/gl(Y)}{SC(Error)/gl(Error)} \geq F_{1-\alpha;gl(Y),gl(Error)}$$

donde  $F_{1-\alpha;gl(Y),gl(Error)}$  es el valor de una distribución F de Snedecor con  $(gl(Y), gl(Error))$  grados de libertad tal que  $Pr\{f \leq F_{1-\alpha;gl(Y),gl(Error)}\} = 1 - \alpha$ , admitiendo la existencia de diferencias para los tratamientos de  $Y$  si se cumple la condición anterior.

En caso de haber diferencias significativas se aplica el test de Scheffé, el cual acepta la hipótesis de que dos tratamientos,  $Y_i$  y  $Y_j$  son iguales ( $H_0 : Y_i - Y_j = 0$ ) si

$$|Y_i - Y_j| \leq \sqrt{gl(Y)F_{1-\alpha;gl(Y),gl(Error)} \cdot 2 \frac{SC(Error)/gl(Error)}{N_{ijk.}}}$$

y la rechaza en caso contrario. El término  $N_{ijk.}$  representa al número de repeticiones de la variable  $X$  para cada celda y en este test se asume que es una constante.

En caso de aceptarse la hipótesis de que no hay diferencias entre los tratamientos, entonces se puede afirmar con confianza  $1 - \alpha$  que la variable  $X$  se encuentra en el intervalo de radio  $t_{1-\alpha;gl(Total)-1} \sqrt{\frac{SC(Total)}{gl(Total)-1}}$  alrededor de  $\mu$ , donde

$t_{1-\alpha;gl(Total)-1}$  es el valor de la  $t$  de Student de  $gl(Total) - 1$  grados de libertad tal que  $Pr\{|t| \leq t_{1-\alpha/2;gl(Total)-1}\} = 1 - \alpha$

### Análisis de regresión

El método de análisis anterior es el más adecuado para determinar las dependencias de la variable  $X$ . A pesar de plantear un modelo de dependencia lineal de  $X$  con las variables  $A$ ,  $B$  y  $C$  no supone ninguna estructura sobre los términos  $a_i$ ,  $b_j$  y  $c_k$ , lo cual es bueno si los niveles elegidos representan la totalidad de los valores posibles para las variables. En caso de que no sea así, por ejemplo, que la variable  $A$  pueda tomar un continuo de valores, entonces el análisis de regresión nos proporciona un método de estimación para la variable  $X$  en función de los valores de las variables  $A$ ,  $B$  y  $C$ .

El modelo clásico empleado por el análisis de regresión lineal es

$$x_{ijkm} = \mu + a \cdot A + b \cdot B + c \cdot C + e_{ijkm} = \theta \cdot (A, B, C)^t + e_{ijkm}$$

en el que no se consideran interacciones. Sin embargo, se puede adoptar una regresión no lineal basada en una función cualquiera de parámetros  $\theta = (a, b, c, \dots)$  tal que

$$x_{ijkm} = f_{\theta}(A, B, C) + e_{ijkm}$$

En cualquier caso, los coeficientes del modelo se resuelven por mínimos cuadrados. El caso lineal tiene como solución  $\hat{\theta} = (V^t V)^{-1} V^t X$  donde  $V$  representa el conjunto de valores conocidos de las variables independientes y  $X$  es un vector columna con los valores conocidos de la variable dependiente. El caso no lineal es más complejo, no tiene solución única y en general se resuelve por un método de minimización para el error cuadrático medio. En esta tesis se ha empleado el método de Newton [20]. La descomposición de la varianza para esta regresión puede verse en la siguiente tabla ANOVA

Variable	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)
Total	$\sum_{i,j,k,m} (x_{ijkm} - \bar{x})^2$	$N_{ijkm}$
Regresión	$\sum_{i,j,k,m} (\hat{x}_{ijkm} - \bar{x})^2$	$\dim(\theta) - 1$
Error	$SC(Total) - SC(Regresion)$	$gl(Total) - gl(Regresion)$

Suele reportarse sobre la utilidad del ajuste por medio del coeficiente  $R^2 = 1 - \frac{SC(Error)}{SC(Total)}$  que representa el porcentaje de la varianza de la variable  $X$  explicada por la regresión. El intervalo de confianza de significación  $\alpha$  para  $\hat{x}_{ijkm}$  está centrado en el valor dado por la regresión y tiene un radio igual a

$$z_{1-\alpha} \sqrt{\frac{SC(Error)}{gl(Error)} + \frac{SC(Regresion)}{gl(Regresion)}}$$

[33] donde  $z_{1-\alpha}$  es el valor de una distribución normal tal que  $Pr\{|z| \leq z_{1-\alpha}\} = 1 - \alpha$ .

## 3.2. Orden de las proyecciones

ART, como cualquier otro algoritmo iterativo, muestra diferentes comportamientos según el orden de los datos de entrada, en este caso las proyecciones. Es decir, dependiendo de cuál sea el esquema de introducción se obtendrá una mejor o peor reconstrucción. Se han propuesto diferentes estrategias de ordenación cuando la geometría de las proyecciones es conocida [66, 59] y ambas basan su fortaleza en la presentación de las proyecciones de la manera más ortogonal posible. En esta línea se centra la presente sección, se tratará de determinar el criterio óptimo de ortogonalidad.

Tal y como se demuestra en la sección 2.1.2 dados tres ángulos de Euler cualquiera  $(\phi, \theta, \psi)$ , se puede determinar la posición de un sistema de coordenadas interno al plano de proyección con ejes  $\mathbf{p}_x, \mathbf{p}_y, \mathbf{p}_z$ . La dirección de proyección viene determinada únicamente por  $\mathbf{p}_z$ , mientras que los otros dos ejes proporcionan la orientación de la proyección en el plano.

La estrategia de ordenación seguida en este trabajo es la siguiente:

1. Seleccionar una proyección cualquiera al azar entre las  $N$  posibles como la primera
2. Elegir la proyección  $n$  como aquella que maximiza un criterio de optimalidad respecto a su ortogonalidad con las  $n - 1$  anteriormente elegidas

mientras que el criterio de optimalidad elegido es

$$\min_n \sum_{i=\max\{n-L, 0\}}^{n-1} \langle \mathbf{p}_z^{(i)}, \mathbf{p}_z^{(n)} \rangle$$

donde  $L$  es un número entero menor que  $N$ ,  $\langle \cdot, \cdot \rangle$  representa al producto escalar entre vectores, y  $\mathbf{p}_z^{(i)}$  es el vector de proyección de la imagen que ocupa el lugar  $i$ . En otras palabras, este criterio trata de maximizar la ortogonalidad entre la proyección número  $n$  y las  $L$  anteriores. En la sección 5.2 se estudia el valor óptimo de  $L$ .

### 3.3. Normalización de las proyecciones

El conjunto de proyecciones utilizado para la reconstrucción de un espécimen puede llegar a tener varios miles de partículas provenientes de diferentes micrografías, las cuales han sufrido distintas condiciones de exposición en el microscopio, revelado y digitalización. El efecto de estas diferencias resulta en ligeras diferencias entre el contraste de las micrografías. Incluso dentro de una misma micrografía se pueden observar variaciones importantes de contraste como se puede ver en la figura 3.10.

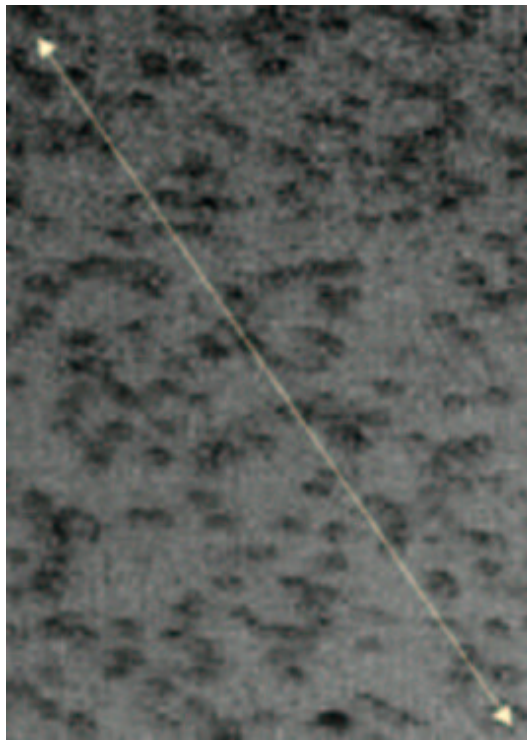


Figura 3.10: La flecha marca un gradiente de contraste dentro de una micrografía.

Un modelo lineal para estas variaciones de contraste postula que

$$p_{medida}(\mathbf{s}) = a(p_{ideal}(\mathbf{s}) + n(\mathbf{s})) + b$$

siendo  $a$  y  $b$  diferentes para cada una de las proyecciones. Se ha realizado un estudio con 15 micrografías de un mismo espécimen tomadas en condiciones similares y susceptibles de ser combinadas en un proceso de reconstrucción tridimensional. Asumiendo que la cantidad de señal frente al ruido es muy bajo en una micrografía completa, es decir,  $micrografía(\mathbf{s}) \approx an(\mathbf{s}) + b$  y que el ruido originalmente tenía media 0 y potencia 1 (no hay ninguna razón para pensar que el nivel de ruido entre estas micrografías deba ser significativamente diferente y la elección de estos valores no supone una pérdida de generalidad) se tiene que los parámetros  $a$  y  $b$  se ajustan a una gaussiana cuya desviación típica es un 3.9 % del valor medio para  $a$  y 3.7 % para  $b$ . Es decir, después de digitalizar ya nos encontramos con una variación entre micrografías entre el 3.5 % y 4 % sin tener en cuenta las variaciones internas a la micrografía.

En microscopía electrónica tridimensional se proponen métodos de normalización que aquí nombraremos como A [146] y B [128] junto con dos nuevos propuestos a los que llamaremos C y D. En la formulación de cada uno de ellos denotaremos como  $\bar{p}_i$  al valor medio de la imagen  $p_i$  y como  $\sigma_i$  a su desviación típica

Método	$p_{normalizada}(\mathbf{s})$
A	$\frac{p_{medida}(\mathbf{s}) - \bar{p}_{medida}}{\sigma_{medida}}$
B	$\frac{p_{medida}(\mathbf{s}) - \bar{p}_{medida}}{p_{fondo}}$
C	$\frac{p_{medida}(\mathbf{s}) - \bar{p}_{fondo}}{\sigma_{fondo}}$
D	$\frac{p_{medida}(\mathbf{s}) - \bar{p}_{fondo}}{\bar{p}_{medida} - \bar{p}_{fondo}}$

La imagen marcada como *fondo* es un subconjunto de la proyección medida en la que sólo se consideran aquellos píxeles que constituyen el fondo de la misma (dada la baja relación señal a ruido existente no es sencillo realizar una segmentación fiable, pero sin embargo, sí es muy fácil determinar una región en la que con total seguridad no hay partícula). En esta región se asume que  $\mu_{fondo} = \mu_n = 0$  y  $\sigma_{fondo}^2 = \sigma_n^2$ .

Un criterio de la bondad de cada uno de los métodos es su habilidad para eliminar la dependencia de la imagen normalizada con los parámetros  $a$  y  $b$  de la transformación. Para ello estudiaremos la media y varianza tanto de la imagen normalizada como de su fondo. Los resultados de este estudio se resumen en la siguiente tabla

Imagen	Media	Varianza	Media del fondo	Varianza del fondo
$p_{ideal}(s)$	$\mu_{ideal}$	$\sigma_{ideal}^2$	0	0
$p_{medida}(s)$	$a\mu_{ideal} + b$	$a^2(\sigma_{ideal}^2 + \sigma_n^2)$	$b$	$a^2\sigma_n^2$
A	0	1	$-\frac{\mu_{ideal}}{\sqrt{\sigma_{ideal}^2 + \sigma_n^2}}$	$\frac{\sigma_n^2}{\sigma_{ideal}^2 + \sigma_n^2}$
B	0	$\frac{(\mu_a^2 + \sigma_a^2)(\sigma_{ideal}^2 + \sigma_n^2)}{\mu_b^2}$	$-\frac{\mu_a\mu_{ideal}}{\mu_b} - \frac{\mu_a\mu_{ideal}\sigma_b^2}{\mu_b^3}$	$\frac{\mu_a^2\mu_{ideal}^2}{\mu_b^2} \left( \frac{\mu_n^2\sigma_n^2 + (\mu_a^2\mu_{ideal}^2 + \sigma_n^2)\sigma_a^2}{\mu_a^2\mu_{ideal}^2} + \frac{\sigma_b^2}{\mu_b^2} \right)$
C	$\frac{\mu_{ideal}}{\sigma_n}$	$\frac{\sigma_{ideal}^2 + \sigma_n^2}{\sigma_n^2}$	0	1
D	1	$\frac{\sigma_{ideal}^2 + \sigma_n^2}{\mu_n^2}$	0	$\frac{\sigma_n^2}{\mu_{ideal}^2}$

donde se ha hecho uso del hecho de que para dos variables aleatorias independientes  $\mu_{x,y} = \mu_x\mu_y$ ,  $\sigma_{x,y}^2 = \mu_x^2\sigma_y^2 + \mu_y^2\sigma_x^2 + \sigma_x^2\sigma_y^2$ , [109]. Sin embargo el cociente de dos variables aleatorias independientes y normales es una función de Cauchy centrada en el origen [119, pág. 138] para la que no existen ni la media ni la varianza.

A pesar de ello se han utilizado las aproximaciones genéricas  $\mu_{\frac{x}{y}} \approx \frac{\mu_x}{\mu_y} - \frac{\sigma_{xy}}{\mu_y^2} + \frac{\mu_x\sigma_y^2}{\mu_y^3}$ ,

$$\sigma_{\frac{x}{y}}^2 \approx \frac{\mu_x^2}{\mu_y^2} \left( \frac{\sigma_x^2}{\mu_x^2} + \frac{\sigma_y^2}{\mu_y^2} - 2\frac{\sigma_{xy}}{\mu_x\mu_y} \right).$$

Vemos que las normalizaciones A, C y D son capaces de eliminar toda dependencia de la imagen normalizada con la transformación lineal, no siendo así para B. Desde el punto de vista de normalización puramente A y C tendrían propiedades semejantes y D sería teóricamente el mejor de los cuatro, sin embargo, por motivos que veremos a continuación no puede ser utilizado con la profusión que se desearía. Por otra parte, tanto C como D permiten la imposición de restricciones de positividad sobre el volumen (ver sección 3.5.2).

Llegado este es importante realizar varias puntualizaciones sobre los diferentes métodos de normalización

1. Todas descansan en la posibilidad de medir exactamente los estadísticos de la imagen o el ruido, lo cual es imposible. No obstante se puede alcanzar una precisión adecuada si se dispone de un cierto número mínimo de píxeles incluso en las mediciones sobre el fondo.
2. Tanto la normalización A como la C miden la potencia bien de la imagen bien del ruido. Sin embargo, ambas variables dependen de la función de transferencia del microscopio (ver sección 3.6). De hecho, ésta fue la principal motivación para el diseño de la normalización tipo B. La consecuencia de esta dependencia es que imágenes provenientes de micrografías afectadas por funciones de transferencia bien distintas serán colocadas por las normalizaciones A y C en marcos numéricos diferentes influyendo negativamente sobre el resultado final de la reconstrucción. No obstante, se puede corregir este efecto maligno por medio de un factor de escala fácilmente medible que relacione las potencias entre las funciones de transferencia de las dos micrografías.
3. La validez de la hipótesis de que el ruido tiene siempre la misma potencia es cuestionable en cuanto que el ruido es dependiente de la masa que los electrones encuentran en su camino y por este motivo es previsible que si un espécimen está inclinado tenga un nivel de ruido diferente a si no lo está. Una cuantificación de este hecho está todavía pendiente por lo que esta nota no pasa de ser una llamada de atención sobre el uso que se haga de la normalización.
4. El principal problema con la normalización D es que divide por un factor muy cercano a 0 ya que las medias del fondo y de la imagen son bastante similares debido a la baja relación señal a ruido. Por este motivo se ha comprobado experimentalmente el efecto de amplificación del ruido provocado por una división por un número cercano a 0 en algunas imágenes en las que por motivos aleatorios se estima dicha diferencia de forma especialmente desafortunada.
5. Por último, como norma de uso se puede afirmar que si las variaciones en la función de transferencia son mayores que las variaciones en los parámetros de la transformación lineal, entonces una normalización tipo B es más adecuada, y en caso contrario se deberá aplicar una normalización tipo C.

### 3.4. Imposición de restricciones de simetría

Multitud de macro-moléculas presentan conformaciones simétricas o cuasi-simétricas en su estado natural. Las primeras responden a la polimerización de un monómero que actúa como elemento básico de configuración [8], mientras que las segundas se deben a la unión de diferentes estructuras muy parecidas entre sí aunque no exactamente iguales [91]. Sin embargo, en este segundo caso se puede suponer que la partícula es simétrica hasta un determinado grado de resolución.

Debido a la baja relación señal a ruido existente en las micrografías con las que habitualmente se trabaja, una restricción de simetría supone la aportación relativa de una gran información *a priori*. El uso que comúnmente se hace [101, 91, 8] de esta información se limita a simetrizar el volumen solución una vez concluido el proceso de reconstrucción. Sin embargo, en esta tesis se propone un empleo distinto. La existencia de elementos de simetría en el volumen implica la equivalencia de las proyecciones que se relacionan entre sí por dichos elementos de simetría, de esta forma dada una determinada proyección desde un punto de vista, automáticamente se conocen otra serie de proyecciones tomadas desde lugares diferentes. Este enfoque aumenta la cantidad de proyecciones introducida al algoritmo de reconstrucción por lo que la calidad de la solución mejora tanto más cuanto mayor sea la falta de información sobre el mismo.

Es de resaltar que la correcta introducción de la simetría en ART ha posibilitado tanto la aplicación de este algoritmo a la reconstrucción de virus icosaédrico (un ejemplo se muestra en la sección 5.8) como la mejora de los resultados obtenidos (como por ejemplo los mostrados en 5.7).

En este apartado se estudia la formalización de los elementos de simetría puntual, y posteriormente se proporciona el método de cálculo de las proyecciones equivalentes.

#### Elementos de simetría puntual

Por regla general, se dice que un volumen,  $f(\mathbf{r})$ , tiene simetría si  $f(\mathbf{r}) = f(S\mathbf{r})$  para alguna matriz  $S$  diferente de la identidad tal que todos los autovalores de  $S$  tengan módulo unidad [157]. Dado que una matriz tiene los mismos autovalores que su forma canónica de Jordan [90], se pueden analizar los diferentes tipos de simetría analizando las diferentes posibilidades de matrices de Jordan con autovalores de módulo unidad. La tabla 3.1 recoge todas las posibilidades así como los nombres que reciben cada una de las simetrías.



Forma canónica de Jordan	Autovalores	Tipo de simetría
$\begin{pmatrix} \cos(\alpha) & -\sin(\alpha) & 0 \\ \sin(\alpha) & \cos(\alpha) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$	$e^{j\alpha}, e^{-j\alpha}, 1$	Rotación respecto al eje $\vec{z}$
$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}$	1, 1, -1	Reflexión respecto a un plano de vector director $\vec{z}$
$\begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$	-1, -1, 1	Reflexión respecto al eje $\vec{z}$
$\begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}$	-1, -1, -1	Reflexión respecto al origen
$\begin{pmatrix} \cos(\alpha) & -\sin(\alpha) & 0 \\ \sin(\alpha) & \cos(\alpha) & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}$	$e^{j\alpha}, e^{-j\alpha}, -1$	Rotación respecto al eje $\vec{z}$ y reflexión respecto al plano perpendicular al mismo eje
$\begin{pmatrix} -\cos(\alpha) & -\sin(\alpha) & 0 \\ \sin(\alpha) & -\cos(\alpha) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$	$-e^{j\alpha}, -e^{-j\alpha}, 1$	Rotación respecto al eje $\vec{z}$ y reflexión respecto al mismo eje
$\begin{pmatrix} -\cos(\alpha) & -\sin(\alpha) & 0 \\ \sin(\alpha) & -\cos(\alpha) & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}$	$-e^{j\alpha}, -e^{-j\alpha}, -1$	Rotación respecto al eje $\vec{z}$ y reflexión respecto al origen

Cuadro 3.1: Matrices de simetría puntual

Los ejes de rotación se dice que tienen orden  $n$  cuando  $n$  es el menor entero para el que  $S^n = S$  lo que se traduce en que el volumen es simétrico cuando gira respecto a dicho eje  $360/n$  grados.

### Alineamiento de un eje con Z

Será ésta una operación fundamental para la consecución de los elementos de simetría necesarios, consiste en determinar un cambio de base tal que la expresión de un vector unitario  $\vec{v}$  en la nueva base sea  $(0, 0, 1)^t$ . La base buscada formada por los vectores  $\vec{x}', \vec{y}', \vec{z}'$  debe ser ortonormal y debe cumplir que

$$\begin{aligned} \vec{x}' \times \vec{y}' &= \vec{z}' \\ \vec{y}' \times \vec{z}' &= \vec{x}' \\ \vec{z}' \times \vec{x}' &= \vec{y}' \end{aligned} \quad (3.1)$$

La matriz de cambio de base que cumple estas condiciones es

$$A_{\vec{v} \rightarrow \vec{z}} = \begin{cases} \begin{pmatrix} 0 & 0 & -1 \\ 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \end{pmatrix} & \vec{v} = \vec{x} \\ \begin{pmatrix} \sqrt{((\vec{v})_y)^2 + ((\vec{v})_z)^2} & -\frac{(\vec{v})_x(\vec{v})_y}{\sqrt{((\vec{v})_y)^2 + ((\vec{v})_z)^2}} & -\frac{(\vec{v})_x(\vec{v})_z}{\sqrt{((\vec{v})_y)^2 + ((\vec{v})_z)^2}} \\ 0 & \frac{(\vec{v})_z}{\sqrt{((\vec{v})_y)^2 + ((\vec{v})_z)^2}} & -\frac{(\vec{v})_y}{\sqrt{((\vec{v})_y)^2 + ((\vec{v})_z)^2}} \\ (\vec{v})_x & (\vec{v})_y & (\vec{v})_z \end{pmatrix} & \vec{v} \neq \vec{x} \end{cases}$$

Nótese que por tratarse de una base ortonormal, la inversa de la matriz de cambio de base coincide con su transpuesta.

### Generación de simetrías arbitrarias

Cualquier tipo de simetría, salvo la reflexión respecto al origen, se puede expresar como una combinación de una matriz,  $S_{\vec{z}}$ , de las expuestas en la tabla 3.1, junto con el cambio de base apropiado para alinear el vector,  $\vec{v}$  que define el eje de simetría con el eje  $\vec{z}$ . De este modo la matriz correspondiente queda definida como

$$S_{\vec{v}} = A_{\vec{v} \rightarrow \vec{z}}^t \cdot S_{\vec{z}} \cdot A_{\vec{v} \rightarrow \vec{z}}$$

### Subgrupo de simetría

Cada elemento de simetría de los comentados hasta este punto determina una única vista equivalente para cada proyección. Sin embargo, el hecho de que un volumen muestre simetría según diferentes elementos o incluso un único elemento, como pueden ser las simetrías por rotación, puede aprovecharse para aumentar aún más el número de vistas. De este modo, por ejemplo, si un volumen presenta simetría rotacional de orden 8 respecto al eje  $\vec{z}$  y por reflexión respecto al plano  $\vec{x}\vec{y}$ , entonces no solamente se pueden obtener  $(8 - 1) + (2 - 1)$  proyecciones equivalentes sino  $8 \cdot 2 - 1$ .

En general se puede decir que

*Si un volumen posee varios elementos de simetría  $S_1, S_2, \dots, S_n$  entonces cualquier elemento del subgrupo generado por ellos y la operación multiplicación de matrices, es elemento de simetría del citado volumen.*

La demostración de este teorema es evidente. Este teorema se utiliza para construir un conjunto mayor de simetrías que las estrictamente proporcionadas por el usuario. Por ejemplo, los virus de simetría icosaédrica (ver figura 3.11) poseen 15 ejes de rotación de orden 2, 10 ejes de rotación de orden 3 y 6 ejes de rotación de orden 5. Por lo tanto, para cada vista obtenida en el microscopio presentan otras 59 vistas equivalentes. Cuando el virus es colocado en una posición tal que los tres ejes coordenados  $\vec{x}$ ,  $\vec{y}$  y  $\vec{z}$  coinciden con respectivos ejes de rotación de orden 2, se puede generar el subgrupo de simetría con tan sólo tres elementos de simetría, a saber, un eje de rotación de orden 2 alrededor del eje  $(0, 0, 1)$ , un eje de rotación de orden 5 alrededor del eje  $(\cos(31,717474^\circ), \sin(31,717474^\circ), 0)$  y un eje de rotación de orden 3 alrededor de  $(\cos(20,905157^\circ), \sin(20,905157^\circ), 0)$ .

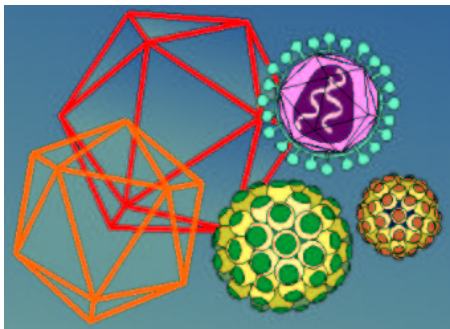


Figura 3.11: Ejemplos de diversos tipos de estructuras de virus icosaédricos.

### Cálculo de proyecciones equivalentes

Tal y como se demostró en la sección 2.1.2, la dirección de proyección determinada por tres ángulos de Euler  $(\phi, \theta, \psi)$  especifica una base del espacio  $\mathbb{R}^3$  en el que el plano de proyección se encuentra definido por los ejes  $\vec{e}_x$  y  $\vec{e}_y$ , mientras que la dirección de proyección viene determinada por  $\vec{e}_z = \vec{\omega}$ . La matriz de cambio de base está recogida por  $E_{\vec{\omega}, \psi}$  (ver sección 2.1.2)

Si la proyección del volumen  $f(\mathbf{r})$  viene dada por

$$p_{\vec{\omega}, \psi}(\mathbf{s}) = \int_{-\infty}^{\infty} f \left( E_{\vec{\omega}, \psi}^t \cdot \left( (\mathbf{s})_x, (\mathbf{s})_y, l \right)^t \right) dl$$

entonces la existencia de simetría puntual implica otra proyección equivalente en la dirección determinada por

$$\begin{aligned} p_{\vec{\omega}, \psi}(\mathbf{s}) &= \int_{-\infty}^{\infty} f \left( E_{\vec{\omega}, \psi}^t \cdot \left( (\mathbf{s})_x, (\mathbf{s})_y, l \right)^t \right) dl \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} f \left( S \cdot E_{\vec{\omega}, \psi}^t \cdot \left( (\mathbf{s})_x, (\mathbf{s})_y, l \right)^t \right) dl \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} f \left( E_{\vec{\omega}', \psi'}^t \cdot \left( (\mathbf{s})_x, (\mathbf{s})_y, l \right)^t \right) dl \\ &= p_{\vec{\omega}', \psi'}(\mathbf{s}) \end{aligned}$$

donde  $E_{\vec{\omega}', \psi'}^t = S \cdot E_{\vec{\omega}, \psi}^t$  y, por tanto,

$$E_{\vec{\omega}', \psi'} = E_{\vec{\omega}, \psi} \cdot S^t$$

Este razonamiento es correcto. Sin embargo debe notarse que la nueva base para la que  $E_{\vec{\omega}', \psi'}$  es la matriz de cambio no tiene por qué cumplir las ecuaciones dadas por 3.1, las cuales son fundamentales para que se trate de una verdadera matriz de Euler. En concreto, la matriz resultante es una matriz de Euler para las rotaciones y las reflexiones respecto al origen, y no lo es para las reflexiones respecto a un plano o una recta. La razón es que en estos dos últimos casos 1 ó 2 vectores base han cambiado su orientación relativa al resto. Para conseguir que la matriz resultante vuelva a ser una matriz de Euler basta con cambiar de signo la orientación de los vectores que ya habían cambiado su orientación. La dirección de proyección no varía y el ángulo  $\psi'$  sí que se ve afectado positivamente, es decir, ajustando perfectamente la proyección original que de otro modo tan sólo consigue una versión especular. De este modo la nueva matriz de Euler queda definida por

Tipo de simetría	$L$
Rotación respecto a un eje Reflexión respecto al origen Rotación y reflexión respecto al origen	$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$
Reflexión respecto a un plano Rotación y reflexión respecto a un plano	$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}$
Reflexión respecto a un eje Rotación y reflexión respecto a un eje	$\begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$

Cuadro 3.2: Matrices de simetría puntual

$$E_{\vec{\omega}, \psi'} = L \cdot E_{\vec{\omega}, \psi} \cdot S^t \quad (3.2)$$

donde la matriz  $L$  viene dada en la tabla 3.2. Con esta nueva matriz los elementos de simetría puntual se caracterizan por el par  $(L, S) \in \mathbb{M}_{3 \times 3}^2$  y la operación multiplicación para la generación del subgrupo de simetría se define como  $(L_1, S_1) \cdot (L_2, S_2) = (L_1 \cdot L_2, S_1 \cdot S_2)$ .

Por último, utilizando los algoritmos proporcionados en 2.1.2 pueden recuperarse los ángulos de Euler asociados a la nueva proyección.

### Simetrías con desplazamiento

En el caso particular de que la proteína a reconstruir adopte una estructura regular en el espacio formando un cristal (ver capítulo 4) pueden aparecer simetrías asociadas no sólo a la propia simetría puntual de la macromolécula en cuestión sino a la especial disposición espacial adquirida. En este sentido se dice que la celda unidad a su vez también presenta una simetría la cual está restringida a unas pocas posibilidades llamadas grupos de Bravais [3]. Estas restricciones están relacionadas con el hecho de que la celda unidad debe encajar con celdas unidad adyacentes para recubrir completamente el espacio. Los elementos de simetría en cristalografía pueden recibir el mismo tratamiento que la simetría puntual. No obstante, en cristalografía se presenta un tipo especial de simetría sobre el cristal como conjunto,  $\tilde{f}(\mathbf{r})$  (ver ecuación 4.1), cuando  $\tilde{f}(\mathbf{r}) = \tilde{f}(S(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0))$ . Desarrollando del mismo modo que para la simetría puntual se llega a que

$$\begin{aligned}
 p_{\vec{\omega}, \psi}(\mathbf{s}) &= \int_{-\infty}^{\infty} f \left( E_{\vec{\omega}, \psi}^t \cdot \left( (\mathbf{s})_x, (\mathbf{s})_y, l \right)^t \right) dl \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} f \left( S \left( \cdot E_{\vec{\omega}, \psi}^t \cdot \left( (\mathbf{s})_x, (\mathbf{s})_y, l \right)^t - \mathbf{r}_0 \right) \right) dl \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} f \left( S \cdot E_{\vec{\omega}, \psi}^t \cdot \left( (\mathbf{s})_x - (\mathbf{s}_0)_x, (\mathbf{s})_y - (\mathbf{s}_0)_y, l \right)^t \right) dl \\
 &= p_{\vec{\omega}', \psi'}(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)
 \end{aligned}$$

donde la dirección  $\vec{\omega}', \psi'$  se sigue calculando a través de la matriz de Euler de la ecuación 3.2 y  $\mathbf{s}_0 = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix} \cdot E_{\vec{\omega}, \psi} \cdot \mathbf{r}_0$ . Es decir, las simetrías con desplazamiento siguen las pautas de las simetrías puntuales pero añaden a la caracterización un vector bidimensional de desplazamiento  $(L, S, \mathbf{s}_0)$ .

### 3.5. Ecuaciones a nivel volumétrico

En el capítulo 2 hemos visto cómo las proyecciones de un volumen se traducen en un sistema de ecuaciones que debe cumplir la expansión en serie del mismo. ART no es sino un método para resolver dicho sistema. Sin embargo, las proyecciones del volumen no constituyen el único conjunto de restricciones imponibles a su expansión en serie, puesto que existe otro conjunto de ecuaciones que este volumen debe cumplir para poder representar fielmente a una verdadera macromolécula. Estas nuevas condiciones hacen referencia a la positividad de la densidad molecular, al volumen ocupado por la proteína o su región de soporte. Son éstas restricciones con una fuerte carga de información *a priori*, y pueden suponer importantes mejoras de la reconstrucción, como se verá en el capítulo 5 de aplicaciones. A lo largo de esta sección se expondrán en primer lugar los fundamentos conceptuales para el planteamiento de dichos sistemas de ecuaciones adicionales, junto con un algoritmo de resolución, para luego pasar a distintos tipos de restricciones abordables con esta nueva herramienta.

#### 3.5.1. Planteamiento de las ecuaciones volumétricas

Todas estas nuevas restricciones se basan en un conjunto de ecuaciones que se definen en el espacio de reconstrucción muestreado en vóxeles. Dado que el

muestreo utilizado en esta tesis se realiza con blobs, deberemos traducir dicho conjunto de ecuaciones en vóxeles a otro conjunto de ecuaciones expresadas en el espacio de los blobs.

Sea el volumen  $f(\mathbf{r})$  el volumen a reconstruir y

$$\begin{aligned}\hat{f}_b(\mathbf{r}) &\approx \sum_{(i,j,k) \in G_b} x_{b,(i,j,k)} b \left( \mathbf{r} - \mathbf{r}_{G_{b,(i,j,k)}} \right) \\ \hat{f}_v(\mathbf{r}) &\approx \sum_{(i,j,k) \in G_v} x_{v,(i,j,k)} v \left( \mathbf{r} - \mathbf{r}_{G_{v,(i,j,k)}} \right)\end{aligned}$$

dos expansiones en serie de dicho volumen (ver sección 2.2) una en blobs,  $\hat{f}_b(\mathbf{r})$ , y otra en vóxeles,  $\hat{f}_v(\mathbf{r})$ . Si sobre una cierta región  $\mathcal{Z} \subset \mathbb{R}^3$  conocemos el valor de los coeficientes de la expansión en vóxeles entonces se puede plantear el sistema de ecuaciones

$$\sum_{(i',j',k') \in G_b} x_{b,(i',j',k')} b \left( \mathbf{r} - \mathbf{r}_{G_{b,(i',j',k')}} \right) = x_{v,(i,j,k)} v \left( \mathbf{r} - \mathbf{r}_{G_{v,(i,j,k)}} \right) \quad \forall (i,j,k) \in G_v / \mathbf{r}_{G_{v,(i,j,k)}} \in \mathcal{Z} \quad (3.3)$$

Estas ecuaciones vienen representadas gráficamente en la figura 3.12, a partir del plano representado los vóxeles tienen valor conocido y los blobs deben adecuar su intensidad de tal forma que el resultado final adopte en  $\mathcal{Z}$  los valores predeterminados.

Este sistema de ecuaciones puede resolverse por medio de ART (ver sección 2.3.2) donde los coeficientes  $a_{ij}$  representan el valor del blob  $j$  sobre el voxel  $i$ . El operador hacia adelante será aquel que realiza el paso de blobs a vóxeles evaluado únicamente en aquellos puntos pertenecientes a  $\mathcal{Z}$ , ver sección 2.3.3.

### 3.5.2. Imposición de restricciones de positividad

La función reconstruida,  $f(\mathbf{r})$ , corresponde a una estimación volumétrica de la distribución espacial del potencial electrostático, el cuál a su vez se encuentra directamente relacionado con la densidad de masa de la partícula bajo estudio. Es decir, de cierta manera implícita el valor  $f(\mathbf{r})$  se encuentra íntimamente relacionado con la distribución espacial de masa. Por consiguiente, al ser la masa una magnitud positiva, la siguiente inecuación es inmediata

$$f(\mathbf{r}) \geq 0 \quad \forall \mathbf{r} \in \mathbb{R}^3 \quad (3.4)$$

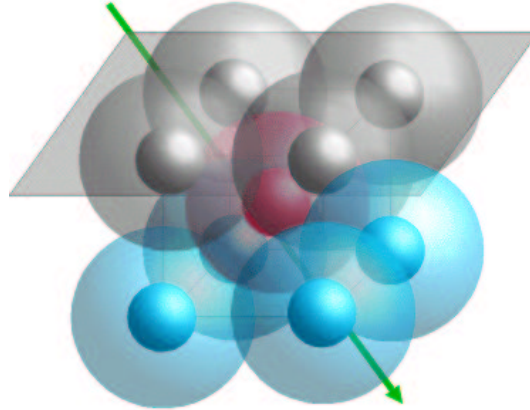


Figura 3.12: Representación esquemática de las ecuaciones de volumen junto con las ecuaciones de proyección.

Ésta supone una fuerte restricción sobre el conjunto de las soluciones al sistema de ecuaciones de proyección, pero para poder añadir esta información *a priori* al sistema debemos asegurarnos de que todos los pasos del proceso de reconstrucción han sido consecuentes con la propiedad física de positividad de la masa, siendo especialmente importante el proceso de normalización asociado. Este punto nos lleva a considerar de nuevo la normalización de las imágenes que ya se vió en el apartado 3.3.

Si la función tridimensional es positiva, entonces sus proyecciones sin ruido tienen una media positiva. Así mismo, al añadir ruido de media cero, la media del conjunto sigue siendo positiva (aunque no así los píxeles individuales que pueden resultar negativos por efecto del ruido). Es decir, si la función a reconstruir debe ser positiva en todo punto debemos excluir las normalizaciones A y B expuestas en el apartado 3.3. quedándonos como única candidata la C, ya que D quedaba excluida por motivos de estabilidad de la solución. La normalización tipo C deja la media del fondo a 0 lo cual es compatible con el hecho de que la media del ruido es nula. De este modo, hemos comprobado que una normalización tipo C permite imponer restricciones de positividad sobre el volumen.

Dichas restricciones se impondrán por medio del sistema de ecuaciones definido por 3.3, a saber:

$$x_{v,(i,j,k)} = 0 \quad \forall (i,j,k) / \mathbf{r}_{G_{v,(i,j,k)}} \in Z = \{ \mathbf{r}_{G_{v,(i,j,k)}} : \hat{f}_b(\mathbf{r}_{G_{v,(i,j,k)}}) < 0 \} \quad (3.5)$$



En la práctica se puede entender la positividad como la puesta a cero de aquellos vóxeles que en un momento dado del proceso de reconstrucción tienen un valor negativo. La mayor dificultad viene del hecho de que la reconstrucción se realiza en blobs y no en vóxeles por lo que se utiliza el sistema de ecuaciones de volumen como método de pasar a blobs la propiedad requerida a los vóxeles.

### 3.5.3. Imposición de restricciones de volumen

Habitualmente es fácil conocer aproximadamente el volumen ocupado por la macromolécula bajo estudio, bien porque se conozca con exactitud su peso molecular bien porque posea una secuencia peptídica identificada. Este segundo caso se puede reducir al primero realizando una estimación del peso medio de cada aminoácido ( $\approx 110(Da/aa)$ ) [116]. Conocida la masa de la proteína se puede calcular su volumen por medio de la densidad media estimada para proteínas cuyo valor es  $\approx 1,33(gr/cm^3) \Rightarrow \approx 1,207(\text{Å}^3/Da)$  [116]. De este modo hemos calculado el volumen del espécimen bajo estudio en  $\text{Å}^3$ , para pasarlo a vóxeles necesitamos conocer el periodo de muestreo,  $T_m(\text{Å}/pixel)$ , de las imágenes supuesto el mismo en todas las micrografías. Esta última asunción es de particular importancia puesto que la magnificación de las imágenes en el microscopio electrónico está directamente relacionada con el desenfoque por lo que imágenes con diferentes desenfoques pueden tener diferentes magnificaciones y habrá que prestar especial atención al hecho de no mezclar imágenes con distintas escalas espaciales.

De estas forma, una molécula de masa  $M$  o con  $AA$  aminoácidos ocupará un volumen en vóxeles,  $V$ , dado por

$$V \approx \frac{AA \cdot 110 \cdot 1,207}{T_m^3}$$

$$V \approx \frac{M \cdot 1,207}{T_m^3}$$

Asumiendo un 20 % máximo de error en la determinación del periodo de muestreo, nuestro volumen real se encontrará entre  $[\frac{1}{1,2^3}V, \frac{1}{0,8^3}V] \approx [0,58V, 1,95V]$ , es decir, debemos emplear un factor de seguridad cercano a 2 en nuestra estimación del volumen total como información *a priori* al algoritmo de reconstrucción. A pesar de esta sobrevaloración del volumen la información aportada para la reconstrucción es muy valiosa y restringe fuertemente el conjunto de posibles soluciones.

La forma de introducir esta nueva información en el proceso de reconstrucción será otra vez a través de las ecuaciones a nivel de volumen que son

$$x_{v,(i,j,k)} = 0 \quad \forall (i,j,k) / \mathbf{r}_{G_{v,(i,j,k)}} \in \mathcal{Z} = \{ \mathbf{r}_{G_{v,(i,j,k)}} : \hat{f}_b(\mathbf{r}_{G_{v,(i,j,k)}}) < z_{th} \} \quad (3.6)$$

donde  $z_{th}$  es un valor tal que  $\# \left\{ (i,j,k) / \hat{f}_b(\mathbf{r}_{G_{v,(i,j,k)}}) \geq z_{th} \right\} = V$ .

A nivel práctico se resume a decir que a la hora de aplicar esta restricción se ponen a 0 todos los vóxeles salvo los que tengan los  $V$  valores más altos.

### 3.5.4. Imposición de restricciones de superficie

Este tercer tipo de información *a priori* aporta información sobre la región de soporte de la función a reconstruir desde el punto de vista de la superficie. En otras palabras, introduce el conocimiento biológico sobre la superficie de la macromolécula a reconstruir. Esta información puede ser obtenida por medio de otros tipos de técnicas de adquisición experimental de datos, como puede ser la microscopía de fuerzas atómicas (*Atomic Force Microscopy, AFM* [38]) o el sombreado metálico (*metal shadowing* [134, 135]) realizado dentro del microscopio electrónico de transmisión o bien a través de operaciones puramente de procesamiento de señal como puede ser la umbralización y posterior dilatación de la superficie obtenida [124, Cap. 15]. En cualquiera de los dos casos se proporciona información extra al algoritmo de reconstrucción, tanto más útil cuanto más precisa sea esta información o cuanto más escasa sea la información procedente únicamente de las ecuaciones de proyección.

En la sección 2.1.3 se mostró cómo las diferentes proyecciones van rellenando el espacio de la transformada de Fourier correspondiente al volumen a reconstruir. Según la naturaleza de la distribución angular con la que se trabaje puede ser que se pierda alguna región relativamente extensa de la transformada de Fourier del objeto. Esta situación puede ser modelada desde el punto de vista de señal como un inventariado en el espacio de Fourier por una función tal que tan sólo deja pasar aquellas frecuencias del objeto que se encuentren presentes en las transformadas de Fourier bidimensionales de alguna de las proyecciones

$$\hat{f}(\mathbf{R}) = f(\mathbf{R}) \cdot W_{\text{distribución}}(\mathbf{R})$$

La imposición de una restricción de superficie equivale al inventariado en el espacio real de la función solución lo que se traduce en el espacio de Fourier como

$$\hat{f}'(\mathbf{R}) = (f(\mathbf{R}) \cdot W_{\text{distribución}}(\mathbf{R})) \star W_{\text{superficie}}(\mathbf{R})$$

donde  $\star$  representa al operador convolución. Es decir, la superficie, o mejor dicho su interior, añadirá información nueva en aquellas zonas en las que  $W_{\text{distribución}}$  la había eliminado. Si la mayor parte de la información de la superficie cubre una zona del espacio de Fourier ya conocida, entonces la mejora no será significativa. En particular, en los casos en que la falta de información en el espacio de Fourier se localiza en una región cónica o en forma de cuña, la superficie que más información proporciona es la que es "perpendicular" a la dirección principal del eje de dicho cono o cuña. La figura 3.13 muestra una superficie simulada para un *phantom* de bacteriorodopsina [58], esta superficie da una información máxima cuando el cono o cuña perdida se encuentra a lo largo del eje vertical

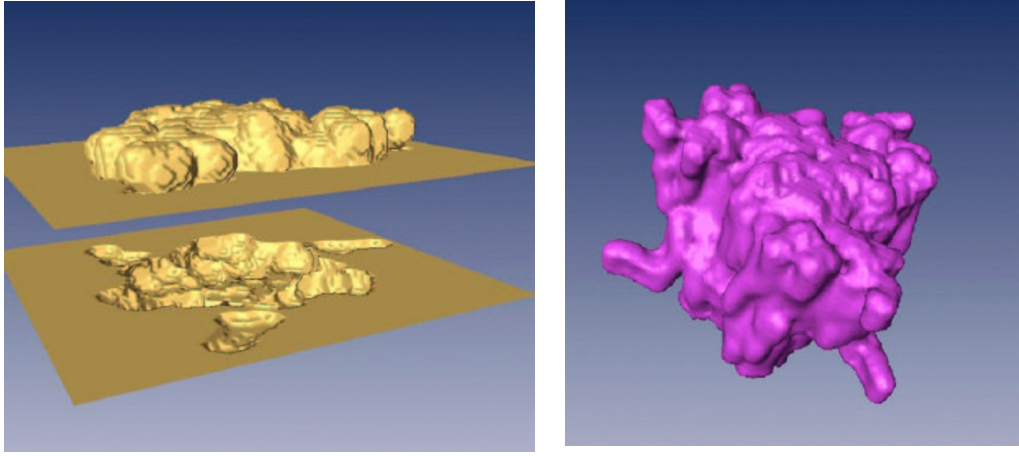


Figura 3.13: Ejemplo de superficie simulando los resultados de un microscopio de fuerzas atómicas (AFM) estudiando la bacteriorodopsina.

Es sencillo determinar el conjunto de restricciones a aplicar durante la reconstrucción cuando trabajamos en una representación discreta en la que las funciones base son vóxeles, puesto que de lo que se trata es de llevar a 0 todos aquellos vóxeles que caigan en el exterior de la superficie

$$x_{v,(i,j,k)} = 0 \quad \forall (i,j,k) / \mathbf{r}_{G_{v,(i,j,k)}} \in \mathcal{Z} = \{\mathbf{r}_{G_{v,(i,j,k)}} : G_{v,(i,j,k)} \notin W_{\text{superficie}}(\mathbf{r})\} \quad (3.7)$$

En este punto se debe plantear la cuestión de cómo de ajustada debe encontrarse la superficie para proporcionar una información óptima. Por un lado parece obvio que una restricción demasiado alejada del borde real no añadirá ninguna información, por otro en principio se desconoce si existe algún límite para acercar la superficie al volumen dado el carácter discreto de éste. Un estudio detallado sobre este punto se realiza en la sección 5.4.

Ahora es el momento de plantearnos la obtención de las superficies y su colocación correcta en el volumen. Como se comentó al comienzo de este apartado dichas superficies pueden provenir o de técnicas físicas adicionales o de técnicas, generalmente no lineales, de procesado de señal. Abordaremos en los siguientes apartados ambas posibilidades.

### Superficies de origen físico

La información *a priori* suministrada al algoritmo de reconstrucción provienen de alguna otra técnica de microscopía, como por ejemplo la microscopía de fuerzas atómicas o el sombreado metálico. Independientemente de cuál sea su origen nos encontramos con una superficie que por regla general no coincide ni en posición, orientación, escala y periodo de muestreo con el volumen al que se pretende aplicar. Por este motivo, debe diseñarse un mecanismo de alineamiento, escalado y registro de la superficie con el volumen, como se muestra en la figura 3.14. El propuesto en esta tesis se basa en la optimización de algún funcional que refleja el desalineamiento existente entre la superficie y el volumen. Tres funciones distintas han sido estudiadas: una de ellas propuesta anteriormente por la literatura, como es la correlación bidimensional, y las otras dos de nueva creación, correlación tridimensional y ajuste de gradientes.

Dada una superficie  $S(\mathbf{s})$ , un volumen  $V(\mathbf{r})$  y un conjunto de parámetros  $\theta = (\phi, s_x, s_y, a_x, a_y, z_{min}, z_{max})$  se define la transformación de ajuste como la rotación por  $\phi$ , desplazamiento por  $s_x$  y  $s_y$ , cambio de muestreo por  $a_x$  y  $a_y$  y de altura hasta situarse entre  $z_{min}$  y  $z_{max}$  de la superficie con respecto al volumen. Los parámetros de cambio de periodo de muestreo, rotación y traslación son recogidos por una única matriz de transformación afín  $A_\theta$ . De esta forma pueden calcularse el alzado de la superficie y la proyección del volumen en la zona de interés determinada por  $\theta$ .

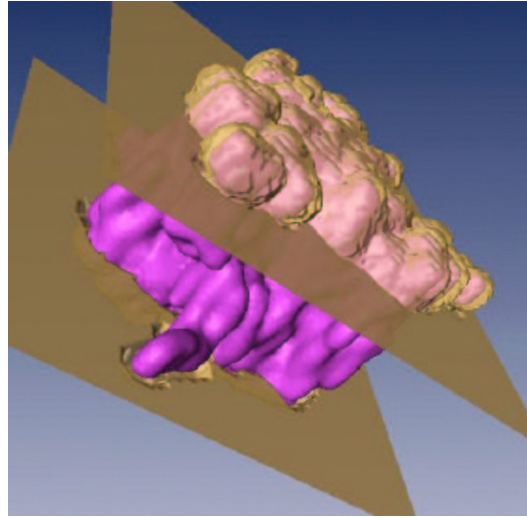


Figura 3.14: Ejemplo de ajuste de una superficie tipo AFM al volumen de la bacteriorodopsina.

$$S_{escalada}(\mathbf{s}) = z_{min} + \frac{z_{max} - z_{min}}{S_{max} - S_{min}} (S(\mathbf{s}) - S_{min})$$

$$V_S(\mathbf{r}) = \begin{cases} 1 & (\mathbf{r})_z < S_{escalada} \left( A_{\theta}^{-1} \begin{pmatrix} (\mathbf{r})_x \\ (\mathbf{r})_y \end{pmatrix} \right) \\ 0 & \text{resto} \end{cases}$$

$$S_V(\mathbf{s}) = \sum_{z=z_{min}}^{z_{max}} V \left( \left( A_{\theta}^{-1} \mathbf{s} \quad z \right)^t \right)$$

La función de ajuste a optimizar puede ser:

1. Maximizar la correlación bidimensional entre  $S_V$  y  $S_{escalada}$ , como se propone en [34]
2. Maximizar la correlación tridimensional entre  $V$  y  $V_S$
3. Maximizar la suma de los productos escalares de los gradientes a  $V$  y  $V_S$  evaluados en cada punto de la superficie.

Las características de aplicación a datos concretos de los tres métodos será objeto de estudio de la sección 5.4.

### Superficies de origen algorítmico

Este otro tipo de superficies es bastante más sencillo de generar puesto que se basan en la introducción de operadores no lineales que reflejan el conocimiento del usuario sobre la superficie del volumen reconstruido. La secuencia de operaciones propuesta en esta tesis comprende operaciones de inventariado en el espacio real, umbralización y cierre morfológico [124, Cap. 15] hasta conseguir un objeto compacto que englobe al 100 % de la masa [47]. Posteriormente se dilata morfológicamente una o dos veces dicha superficie. La superficie dos veces dilatada no aporta tanta información como la que se ajustase perfectamente al volumen, pero se debe respetar un cierto margen de seguridad por el hecho de que el verdadero volumen a reconstruir es desconocido.

#### 3.5.5. Solución inicial

El algoritmo de reconstrucción ART, como cualquier otro algoritmo iterativo, tiene una fuerte dependencia con la solución inicial proporcionada. En la sección 2.3.2 se indicó que ART tiende a minimizar un funcional en el que está implicada la distancia euclídea del vector solución al sistema con la solución inicial. Habitualmente se ha tomado  $\mathbf{x}^{(0)} = \mathbf{0}$  con una doble intención: primero, indicar al algoritmo nuestro desconocimiento sobre la solución y segundo, escoger la solución con menor varianza de todas esperando recoger así la menor cantidad de ruido posible.

No obstante, en un paso avanzado de la reconstrucción sí que podemos proporcionar al algoritmo parte de información vía solución inicial. Es decir, se pueden aplicar técnicas de procesamiento de imágenes a una reconstrucción dada de forma que incorporemos información *a priori* e iniciar el siguiente paso de reconstrucción a partir del volumen modificado.

Normalmente las condiciones *a priori* podrán ser aplicadas sobre un volumen descrito en vóxeles mientras que la entrada al algoritmo de reconstrucción debe estar expresada en blobs. En este sentido resulta de utilidad resolver el conjunto de ecuaciones especificado en 3.3. De este modo vemos que la definición de dicho sistema también puede ayudar en una tarea en principio distinta de para la que fueron diseñadas.



parte de la información contenida en un punto de la imagen es debida a la diferencia de fase entre los distintos electrones que alcanzan dicho punto en el plano de formación de la imagen y otra parte se debe a la diferencia en el número de electrones recogidos en regiones contiguas de la micrografía. El primero de los efectos da lugar al llamado contraste de fase mientras que el segundo al contraste de amplitud.

El contraste de amplitud es complejo de modelar puesto que depende de la deflexión sufrida por los electrones y de los choques inelásticos con las partículas a su paso. La tendencia actual es la de minimizar su efecto sobre las imágenes obtenidas por medio de filtros físicos que discriminan las partículas en función de su energía [131, 83, 162, 129].

En este momento focalizaremos nuestra atención sobre el contraste de fase, efecto al que se debe la mayor parte de la información útil de una micrografía.

Bajo las suposiciones de interacción débil y elástica, el microscopio electrónico de transmisión puede ser modelado por medio de la teoría de sistemas lineales. De este modo, el comportamiento del microscopio como instrumento que impone una deformación en la imagen queda reducido al conocimiento de una respuesta al impulso (conocida en el campo como *Point Spread Function, PSF*) o su equivalente en el espacio de Fourier, la función de transferencia (también llamada *Contrast Transfer Function, CTF*).

### Contraste de fase

En este apartado se presenta un modelo matemático de formación de la imagen dentro del microscopio y se señalan cuáles son las variables que influyen en su degradación. Para la demostración de cada uno de los resultados nos referimos a la bibliografía indicada.

Los electrones que viajan por el interior del tubo del microscopio son considerados en su calidad de onda, cuya velocidad y longitud de onda vienen determinadas por su energía, que a su vez es producida por la diferencia de potencial aplicada entre el ánodo y el cátodo del microscopio. A lo largo de su trayectoria, los electrones son "enfocados" por medio de una lente electromagnética (ver figura 1.2). En realidad, la lente no es otra cosa que una bobina que genera un campo magnético que modifica la trayectoria del haz de electrones concentrándolo en un único punto o foco. Dependiendo de que el plano de formación de la imagen se encuentre por encima o por debajo del plano focal se habla de imágenes sobre foco o subenfocadas, respectivamente, y la distancia entre ellos se denomina desenfoque ( $\Delta f$ , por convención, un desenfoque negativo corresponde a una imagen



subenfocada).

Si un electrón está sometido a una diferencia de potencial  $U$  adquiere una velocidad  $v$  tal que  $\frac{1}{2}m_e v^2 = q_e U$ , donde  $m_e$  y  $q_e$  son la masa y la carga del electrón. Según la mecánica relativista, la longitud de onda asociada a una partícula con esa velocidad es  $\lambda = h/mv$ , donde  $h$  es la constante de Planck.

Se demuestra [47, 163] que en estas condiciones un electrón que viaja en la dirección  $\mathbf{u}$  llega al plano de imagen con una variación de fase  $\chi(\mathbf{u}) = \pi \Delta f \lambda |\mathbf{u}|^2$ . De esta forma, la onda que se propaga en la dirección  $\mathbf{u}$  puede expresarse en el plano de imagen por medio de la función  $\Psi_{im}(\mathbf{u}) = e^{i\chi(\mathbf{u})}\psi_i(\mathbf{u})$  siendo  $\psi_i$  la onda de entrada.

En el plano de formación de imagen, en cada punto  $\mathbf{r}$  se produce la combinación de las ondas asociadas a todos los electrones incidentes

$$\Psi_{im}(\mathbf{r}) = \sum_{\mathbf{u}} \Psi_{im}(\mathbf{u}) e^{-2\pi i(\mathbf{u} \cdot \mathbf{r})}$$

de la que tan sólo se puede registrar su intensidad  $I(\mathbf{r}) = |\Psi_{im}(\mathbf{r})|^2$ . Tomando la transformada de Fourier de la imagen recién calculada llegamos a

$$I(\mathbf{R}) = \mathcal{FT}\{I(\mathbf{r})\} = \Psi_{im}(\mathbf{R}) \star \Psi_{im}^*(\mathbf{R})$$

Desarrollando la convolución y bajo la condición de interacción débil, según la cual la onda no dispersada,  $\Psi(\mathbf{0})$ , es mucho mayor que las dispersadas,  $\Psi(\mathbf{u})$ , podemos despreciar todos aquellos términos que no dependan de la onda no dispersada, con lo cual tenemos la primera aproximación de la transformada de Fourier de la imagen obtenida como combinación lineal de las funciones de onda asociadas a los electrones

$$I(\mathbf{R}) \approx \Psi_{im}^*(\mathbf{0})\Psi_{im}(\mathbf{R}) + \Psi_{im}(\mathbf{0})\Psi_{im}^*(-\mathbf{R})$$

Haciendo consideraciones físicas sobre la naturaleza de onda del electrón y su relación con el espécimen en estudio, y suponiendo que para una muestra suficientemente delgada se puede asumir que  $\Psi_{im}(\mathbf{0}) \approx 1 \approx \Psi_{im}^*(\mathbf{0})$  y que el número de electrones que sufren 3 o más dispersiones a lo largo de su trayectoria es despreciable, se puede llegar a la siguiente expresión

$$I(\mathbf{R}) \approx (\sin(\chi(\mathbf{R})) - Q_0 \cos(\chi(\mathbf{R}))) F(\mathbf{R})$$

donde  $Q_0$  refleja de alguna forma la fracción de electrones que sufren dos dispersiones frente a los que tan sólo se dispersan una vez [163] y que según estudios [142, 143], para las muestras habitualmente utilizadas en el procesamiento

de partículas individuales, adquiere un valor entre 0.19 y 0.35 en el caso de tinción negativa [47, Cap. 2.II] y en torno a 0.07 para criomicroscopía [143]. Aunque debemos ser conscientes que dicho valor depende del tipo de material que se introduzca en el microscopio.

De este modo, hemos llegado a la expresión más simple de la función de transferencia del microscopio electrónico

$$CTF(\mathbf{R}) = \sin(\chi(\mathbf{R})) - Q_0 \cos(\chi(\mathbf{R})) \quad (3.8)$$

La figura 3.15 muestra el perfil radial de una función de transferencia como la prescrita por la fórmula anterior. Son de destacar diferentes aspectos: primero, las muy bajas frecuencias son prácticamente eliminadas, esto implica que se perderán los valores absolutos de las imágenes; segundo, en los cruces por cero se pierde absolutamente toda la información a dicha frecuencia; tercero, la modulación no es uniforme a lo largo de todo el espectro ya que encontramos zonas de fuerte atenuación frente a otras que mantienen toda su amplitud; y cuarto, la inversión de signo de la propia CTF invierte el sentido de la fase de la señal a diferentes frecuencias. Esto implica que a determinadas frecuencias la proteína se proyecta como un valor claro sobre fondo oscuro, y a otras como un valor oscuro sobre fondo claro.

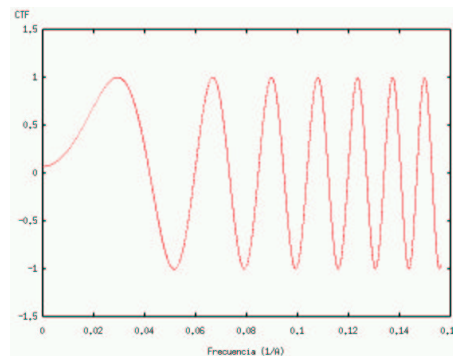


Figura 3.15: Corte radial de una función de transferencia de MET ideal con tensión 100kV, 5.6mm de aberración esférica y  $-15000\text{\AA}$  de desenfoque.

Por otro lado, recordemos que, aparte de las simplificaciones debidas a la interacción débil de los electrones con la muestra y al pequeño espesor de la misma, el microscopio ha sido modelado como un instrumento ideal. Sin embargo, el microscopio electrónico, lejos de ser un instrumento ideal, introduce numerosas limitaciones a la máxima frecuencia alcanzable así como modulaciones adicionales

que suelen ser modeladas como una envolvente que acompaña a cada una de las funciones de onda particulares de cada electrón  $\psi_{im}(\mathbf{R}) = E(\mathbf{R})e^{i\chi(\mathbf{R})}\psi_i(\mathbf{R})$ . A continuación se estudian los efectos de las diferentes limitaciones:

- **Aberración esférica:** Ésta se produce por los distintos desenfoques que presenta una lente (ya sea magnética u óptica) en función de la distancia al centro de la misma con que los diferentes rayos incidentes la atraviesan. Valores típicos para este parámetro,  $C_s$ , se encuentran entre 1 y 5 mm. Su efecto se modela como la inclusión de un término adicional en la función de modulación

$$\chi(\mathbf{R}) = \pi\Delta f\lambda|\mathbf{R}|^2 + \frac{\pi C_s\lambda^3}{2}|\mathbf{R}|^4$$

- **Aberración cromática:** Se debe a las diferencias de velocidad entre los electrones por pequeñas inestabilidades en la tensión aplicada. Razonablemente  $C_a$  puede tomar valores comprendidos entre 1 y 5 mm. Su efecto se distribuye en dos envolventes diferentes que se consideran a continuación: envolvente de coherencia temporal y de estabilidad de la lente.
- **Coherencia temporal:** Esta característica mide la dispersión de la energía de los electrones emitidos,  $\Delta U$ , normalmente por debajo de los 2 eV. Se modela como una envolvente de expresión

$$E_{temporal}(\mathbf{R}) = e^{-\frac{(\frac{1}{4}\pi C_a\lambda\frac{\Delta U}{U})^2|\mathbf{R}|^4}{\log(2)}}$$

Este efecto es equivalente a la dispersión de los valores de desenfoque en torno a un valor nominal. El ancho para el que la dispersión es la mitad (*halfwidth*), suponiendo que siguiese una gaussiana toma el valor

$$\Delta\Delta f = \frac{1}{\sqrt{8\log(2)}}C_a\left(\frac{\Delta U}{U}\right)$$

- **Estabilidad de la lente:** Otro aspecto a considerar es la estabilidad de la corriente en el bobinado de la lente. Su inestabilidad provoca la rotación del plano de imagen. Se admiten variaciones máximas de hasta 10ppm ( $\Delta I/I$ ). Su efecto es el mismo que aumentar el parámetro de estabilidad de la energía de los electrones emitidos,  $\frac{\Delta U}{U}$ , con un término aditivo de valor  $2(\Delta I/I)$  en la fórmula de la envolvente de coherencia temporal expuesta con anterioridad.

- **Apertura angular de la lente:** Este valor representa la variación del paralaje del haz electrónico con respecto a la vertical. Es un factor claramente limitante de la resolución a alcanzar con el microscopio. Suele representarse por el semiángulo de apertura,  $\alpha$ , valor que debe encontrarse por debajo de 1 mrad. La envolvente asociada adopta la forma

$$E_{angular}(\mathbf{R}) = e^{-\pi^2 \alpha^2 (C_s \lambda^2 |\mathbf{R}|^3 + \Delta f |\mathbf{R}|)^2}$$

- **Desplazamiento mecánico longitudinal:** Se trata de un desplazamiento perpendicular al plano focal debido a inestabilidades mecánicas. En principio los microscopios son sistemas muy estables mecánicamente por lo que este desplazamiento debería ser bastante pequeño. Si llamamos  $\Delta F$  a dicho parámetro, entonces la envolvente correspondiente vale

$$E_{longitudinal}(\mathbf{R}) = J_0(\pi \Delta F \lambda |\mathbf{R}|^2)$$

donde  $J_0$  es la función de Bessel de primera especie y orden 0 [125, Cap.6].

- **Desplazamiento mecánico transversal:** Este desplazamiento,  $\Delta R$ , se debe a derivas que sufre la muestra con el tiempo debidas tanto a fenómenos de desplazamiento físico de la rejilla portamuestra, como a fenómenos electrostáticos que se producen en la superficie de la rejilla. Su efecto sobre la función de transferencia se modela por

$$E_{transversal}(\mathbf{R}) = sinc(|\mathbf{R}| \Delta R)$$

- **Astigmatismo:** El astigmatismo es consecuencia de una focalización asimétrica del haz. El efecto es una asimetría en la modulación frecuencial modelable como un par de desenfoques diferentes, mínimo y máximo,  $\Delta f_m$  y  $\Delta f_M$ , formando  $90^\circ$  entre ellos y el ángulo,  $\theta$ , entre el eje de mínimo desenfoque y el eje  $X$  del espacio de frecuencias. Debido a este fenómeno se pasa de una CTF clásica basada en círculos concéntricos a otra con elipses orientadas concéntricas. A efectos de formulación, el astigmatismo es un desenfoque direccional

$$\Delta f(\mathbf{R}) = sgn(\Delta f_M) \sqrt{(\Delta f_m \cos(\angle \mathbf{R} - \theta))^2 + (\Delta f_M \sin(\angle \mathbf{R} - \theta))^2}$$

- **Diámetro de apertura de la lente:** En el interior del microscopio electrónico, debajo del plano focal, se encuentra un diafragma metálico de forma circular y radio  $\mathbf{R}_A$  (llamado apertura de difracción) que excluye a todos los electrones que caen fuera del mismo. Su efecto sobre la función de transferencia es un filtrado paso bajo abrupto con frecuencia de corte  $\mathbf{R}_A$

$$E_{\text{apertura}}(\mathbf{R}) = \begin{cases} 1 & |\mathbf{R}| < |\mathbf{R}_A| \\ 0 & |\mathbf{R}| > |\mathbf{R}_A| \end{cases}$$

Para finalizar este apartado, la figura 3.16 nos muestra una función de transferencia completa con todas las imperfecciones consideradas, así como un corte a lo largo del eje  $X$  de la misma y de la función de transferencia correspondiente a un instrumento perfecto.

### Modelo completo de formación de la imagen

A la vista de los apartados anteriores, y bajo las suposiciones de interacción débil y elástica, se puede modelar el microscopio electrónico de transmisión como un sistema lineal, de tal forma que la imagen que se obtiene finalmente es la suma de la proyección del objeto de interés afectada por la función de transferencia más ruido afectado y sin afectar por la CTF [47, 92, 93]

$$I_{\text{medida}} = CTF \star (I_{\text{ideal}} + n_b) + n_a$$

que por teoría de sistemas lineales [37] tiene una densidad espectral de potencia

$$S_{I_{\text{medida}}}(\mathbf{R}) = |CTF(\mathbf{R})|^2 (S_{I_{\text{ideal}}}(\mathbf{R}) + S_{n_b}(\mathbf{R})) + S_{n_a}(\mathbf{R})$$

Suele ser hipótesis de trabajo habitual que  $n_b$  es un ruido blanco gaussiano de potencia  $\sigma_{n_b}^2$  [47, 92, 93], mientras que no existe un modelo bien definido para  $n_a$ . En esta tesis supondremos que tiene una distribución en frecuencia exponencial negativa aunque dejaremos su forma exacta para el momento del ajuste de la función de transferencia.

El espectro del espécimen bajo estudio es desconocido en principio, y teniendo en cuenta su pequeño tamaño en relación a la totalidad de la micrografía y de la baja relación señal a ruido existente (valores habituales inferiores a 0.33), podemos aproximar la densidad espectral de la micrografía por

$$S_{I_{\text{medida}}}(\mathbf{R}) \approx |CTF(\mathbf{R})|^2 \sigma_{n_b}^2 + S_{n_a}(\mathbf{R}) \quad (3.9)$$

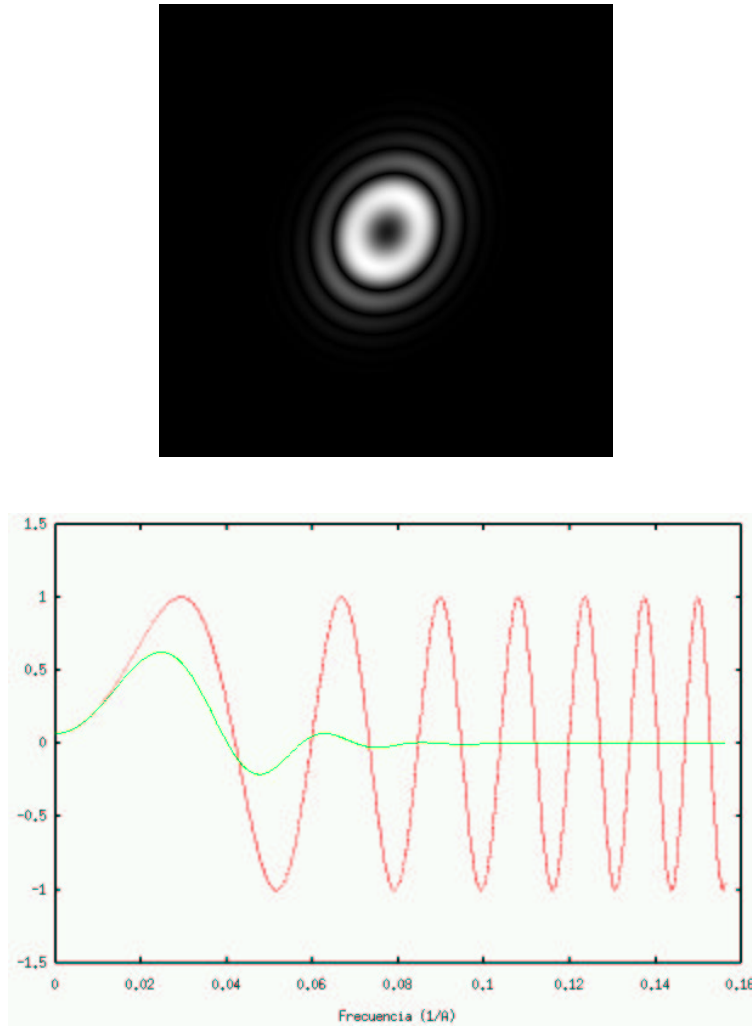


Figura 3.16: Arriba: CTF típica en la que se han considerado todas las limitaciones del microscopio descritas anteriormente. Abajo: Corte a lo largo del eje  $\mathbf{R}_x$  de la función de transferencia mostrada arriba y de la misma función sin imperfecciones.

Éste será el modelo que utilizemos para determinar la CTF a partir del espectro de la micrografía en los apartados siguientes. Sin embargo, antes de pasar adelante debemos puntualizar que la función de transferencia puede no ser única para toda la micrografía sino que depende fuertemente del desenfoque y éste a su vez de la altura existente entre el espécimen y el plano de formación de imagen por lo que en imágenes en las que se haya utilizado un ángulo de inclinación no nulo se dará el caso de variaciones en el desenfoque de partículas según su posición dentro de la muestra.

La solución a este problema consiste en subdividir la micrografía en distintas regiones dentro de las cuales se pueda despreciar el efecto de la variación de desenfoque. Cada una de dichas regiones sería sometida a una estimación de CTF.

### Estimación clásica de la densidad espectral de potencia

Es evidente que el estimador de la densidad espectral de potencia más sencillo es el periodograma, que para una imagen  $I(x, y)$  de tamaño  $N_x \times N_y$  se define como [37, 43]

$$\hat{S}_I^{PER}(\mathbf{R}) = \frac{1}{N_x N_y} |I(\mathbf{R})|^2$$

Sus propiedades como estadístico son [37, 43, 69]

$$E \{ \hat{S}_I^{PER}(\mathbf{R}) \} = S_I(\mathbf{R})$$

$$Var \{ \hat{S}_I^{PER}(\mathbf{R}) \} \approx S_I^2(\mathbf{R})$$

Sin embargo, como se puede comprobar, tiene el inconveniente de que posee una gran varianza (ver fig 3.17), por lo que el ajuste de cualquier curva a esta estimación se hace poco menos que imposible.

Existen diversas formas de suavizar el periodograma, entre ellas el promediado de periodogramas [37, 89, 79]. La idea es la de estimar los distintos periodogramas de  $K$  subáreas de la imagen original, asumiendo que son todos realizaciones de una misma variable aleatoria, por lo que su media debe encontrarse más cercana al verdadero valor.

$$\hat{S}_I^{AVPER}(\mathbf{R}) = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K \hat{S}_{I_k}^{PER}(\mathbf{R})$$

$$E \{ \hat{S}_I^{AVPER}(\mathbf{R}) \} = S_I(\mathbf{R})$$

$$\text{Var} \left\{ \hat{S}_I^{AVPER}(\mathbf{R}) \right\} \approx \frac{1}{K} \text{Var} \left\{ \hat{S}_I^{PER}(\mathbf{R}) \right\}$$

La figura 3.18 muestra el promediado de periodogramas asociado a la misma micrografía que la mostrada en la figura 3.17. Aunque el resultado es notoriamente superior, aun nos encontramos con un nivel de ruido suficiente que dificulta el ajuste de una función de transferencia basada en parámetros físicos. Sin embargo, la mejora obtenida en la varianza del estimador se realiza a costa de una disminución de la resolución alcanzada en el espacio de Fourier. Por este motivo se recurre a una técnica más potente de estimación espectral como es el modelado paramétrico ARMA explicado en el siguiente apartado con el que se consigue un baja varianza de estimación sin un coste sustancial sobre la resolución para los tamaños de imágenes manejados en microscopía.



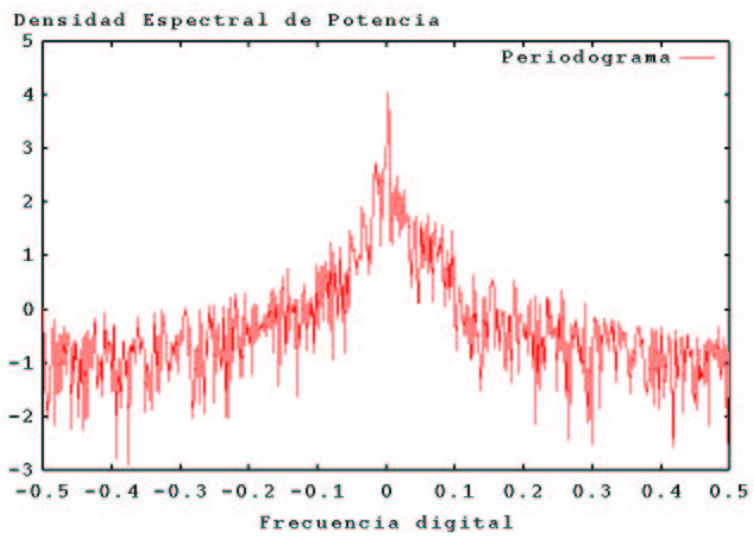
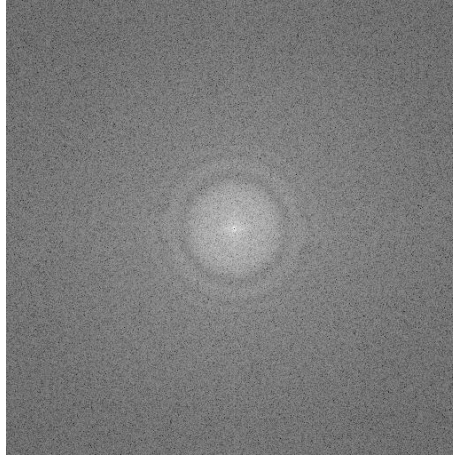


Figura 3.17: Periodograma típico en tinción negativa así como un corte del mismo.

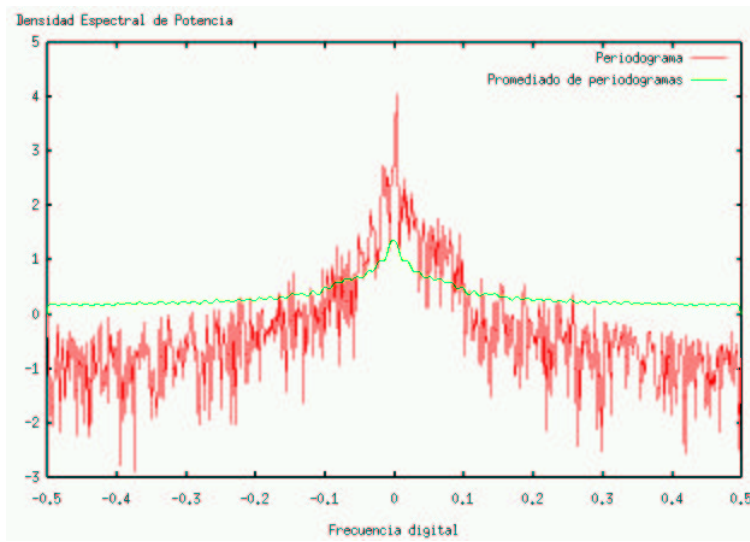
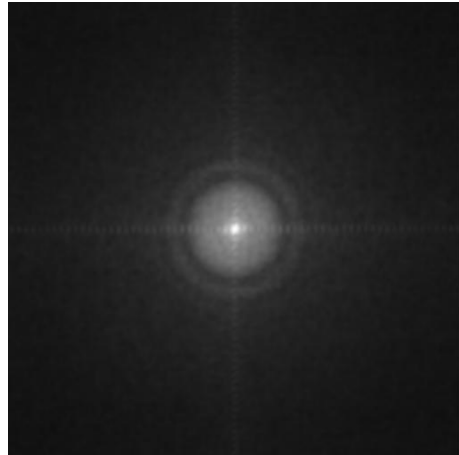


Figura 3.18: Promediado de periodogramas típico en tinción negativa así como un corte del mismo.

### Estimación paramétrica ARMA de la densidad espectral de potencia

La estimación espectral paramétrica se ha perfilado como una herramienta muy poderosa frente a la estimación espectral clásica [37, 69, 94, 39] debido a sus propiedades estadísticas y a la relativamente poca información necesaria para su cálculo. En el grupo de trabajo en el que se ha desarrollado esta tesis se han realizado comparaciones entre los modelos AR y el promediado de periodogramas [43] y en este trabajo se ha extendido la aproximación al empleo de modelos ARMA, ya que se habían observado ciertas inestabilidades en el modelo AR puro. El modelo ARMA considerado en esta tesis se encuentra recogido en [77] aunque los modelos ARMA y el modelado espectral en general son estudiados en [73, 37, 89, 80, 79, 69, 23].

Sea una imagen  $I(\mathbf{s}) (\mathbf{s} \in L \subset \mathbb{R}^2)$  considerada como un proceso aleatorio bidimensional, estacionario, con función de correlación  $R_I(\mathbf{r})$  y densidad espectral

$$S_I(\mathbf{z}) = \sum_{\mathbf{r} \in \mathbb{R}^2} R_I(\mathbf{r}) \mathbf{z}^{\mathbf{r}}$$

donde  $\mathbf{z} = e^{-2\pi j \mathbf{r}}$  y  $(z_x, z_y)^{(r_x, r_y)} = z_x^{r_x} z_y^{r_y}$ . Asumiendo que la densidad espectral se puede expresar como el cociente de dos polinomios

$$S_I(\mathbf{z}) = \nu \frac{B(\mathbf{z})}{A(\mathbf{z})} = \nu \frac{1 - \sum_{\mathbf{r} \in N_A} a_{\mathbf{r}} \mathbf{z}^{\mathbf{r}}}{1 + \sum_{\mathbf{r} \in N_B} b_{\mathbf{r}} \mathbf{z}^{\mathbf{r}}} \quad (3.10)$$

siendo  $A$  y  $B$  polinomios centrosimétricos, es decir,  $a_{\mathbf{r}} = a_{-\mathbf{r}}$  y  $b_{\mathbf{r}} = b_{-\mathbf{r}}$ , así como los conjuntos finitos  $N_i \subset L$  ( $\mathbf{r} \in N_i \Rightarrow -\mathbf{r} \in N_i, \mathbf{0} \notin N_i, N_A \cap N_B = \emptyset$ ),  $\nu$  es un factor de ganancia global. Se demuestra [77] que bajo esta formulación se puede escribir

$$I(\mathbf{s}) = \sum_{\mathbf{r} \in N_A} a_{\mathbf{r}} I(\mathbf{s} + \mathbf{r}) + \sqrt{\nu} e(\mathbf{s})$$

donde  $e(\mathbf{s})$  es un ruido correlado, de media 0 y densidad espectral  $S_e(\mathbf{z}) = A(\mathbf{z})B(\mathbf{z})$  (nótese que dicho ruido no puede ser reemplazado por una representación finita de media móvil excitada por un ruido blanco, como en su análogo unidimensional, puesto que en general  $\sqrt{A(\mathbf{z})B(\mathbf{z})}$  no es un polinomio de orden finito).

El algoritmo seguido para el cálculo de cada uno de los coeficientes es el descrito a continuación:

1. Calcular los coeficientes de correlación necesitados en los sistemas de ecuaciones planteados en los pasos 2, 3 y 4.

$$\hat{R}_I(\mathbf{r}) = \frac{1}{M_S - 1} \sum_{\mathbf{s}} I(\mathbf{s}) I(\mathbf{s} + \mathbf{r})$$

donde  $\mathbf{s}$  toma todos los valores admisibles para cada  $\mathbf{r}$  y  $M_S$  es el número de dichos valores

2. Resolver en los  $\hat{a}_{\mathbf{r}_j}$  el siguiente sistema de ecuaciones lineales

$$\hat{R}_I(\mathbf{t}_i) = \sum_{\mathbf{r}_j \in N_A} \hat{a}_{\mathbf{r}_j} (\hat{R}_I(\mathbf{t}_i + \mathbf{r}_j) + \hat{R}_I(\mathbf{t}_i - \mathbf{r}_j)) \quad \forall \mathbf{t}_i \in N_A$$

3. Resolver para  $\hat{v}$  la ecuación sustituyendo los valores de  $\hat{a}_{\mathbf{r}_j}$  calculados en el paso anterior

$$\hat{R}_I(\mathbf{0}) = 2 \sum_{\mathbf{r}_j \in N_A} \hat{a}_{\mathbf{r}_j} (\hat{R}_I(\mathbf{r}_j)) + \hat{v}$$

4. Resolver el siguiente sistema de ecuaciones lineales para los  $\hat{b}_{\mathbf{s}_i}$  en las que el resto de las variables son todas conocidas

$$\hat{R}_I(\mathbf{s}_i) = \sum_{\mathbf{r}_j \in N_A} \hat{a}_{\mathbf{r}_j} (\hat{R}_I(\mathbf{s}_i + \mathbf{r}_j) + \hat{R}_I(\mathbf{s}_i - \mathbf{r}_j)) + \hat{v} \hat{b}_{\mathbf{s}_i} \quad \forall \mathbf{s}_i \in N_B$$

5. Calcular la densidad espectral de potencia de la señal de entrada por medio de la fórmula 3.10

Es de reseñar que los sistemas de ecuaciones planteados por el modelo AR-MA se encuentran muy cerca de la singularidad, por lo que deben desecharse métodos clásicos de resolución de sistemas de ecuaciones para pasar a técnicas más sofisticadas [125, Cap.2]. En esta tesis se ha empleado SVD (*Singular Value Decomposition*, SVD) en la que se aplica un umbral para evitar autovalores de la matriz de coeficientes demasiado pequeños.

El algoritmo original no define unas regiones  $N_A$  y  $N_B$  fijas, sino que tan sólo impone un conjunto de restricciones que debe cumplir. En el presente trabajo se han elegido regiones cuadradas de lado  $p$  para el soporte AR y de lado  $q$  para el MA, tal y como se muestran en la figura 3.19. La elección de la extensión adecuada de las distintas regiones de soporte será el objeto del apartado 5.3

Para finalizar, la figura 3.20 muestra una comparación entre las estimaciones espectrales para el periodograma, promediado de periodogramas y estimación ARMA. De la gráfica se puede ver que la estimación ARMA ajusta mejor al periodograma aunque con mucha menor variación en cada frecuencia, incluso mucho menor que la correspondiente al promediado de periodogramas.

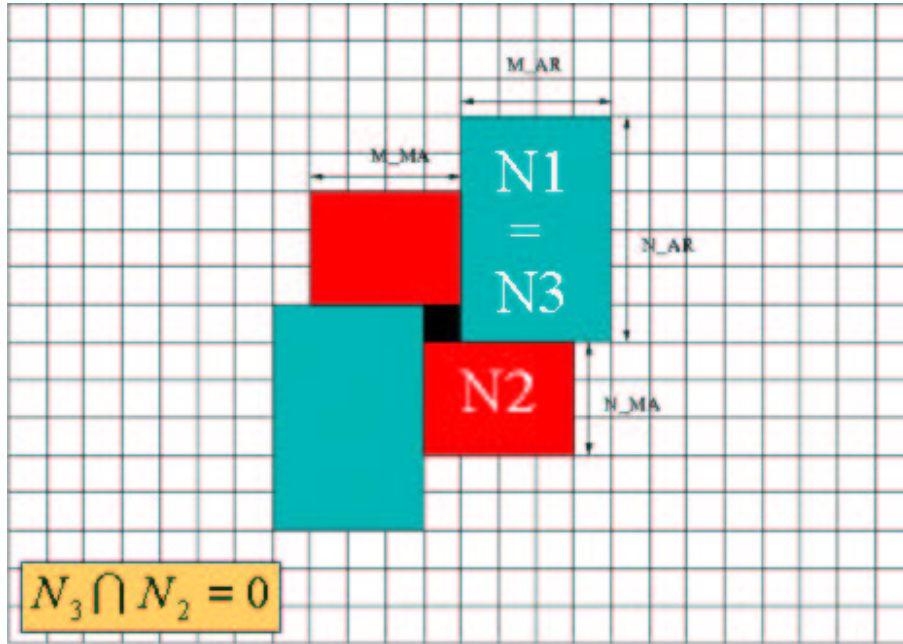


Figura 3.19: Regiones de soporte,  $N_A$  y  $N_B$ , para el cálculo del modelo ARMA

### Ajuste de un modelo de función de transferencia

Hasta este punto se ha desarrollado una técnica, modelado paramétrico ARMA, que permite la identificación experimental de la densidad espectral de potencia de una micrografía. Paralelamente se ha planteado un modelo de formación de la imagen basado en la ecuación 3.9. En este momento se plantea la conveniencia de utilizar explícitamente el modelo de formación de imagen propuesto, determinando experimentalmente los valores de aquellos parámetros físicos de tal forma que se ajuste de la mejor forma posible la densidad espectral de potencia.

En el modelo de la ecuación 3.9 no se especifica cuál debe ser la expresión del ruido. A falta de un modelo físico adecuado se propone una función que permita un ajuste de alta calidad. En este sentido se ha empleado

$$S_{n_a}(\mathbf{R}) = b + K_g e^{-\frac{(R_U - R_{U0})^2}{2S_{gU}^2} - \frac{(R_V - R_{V0})^2}{2S_{gV}^2}} + K_s e^{-\frac{\sqrt{|R_U|}}{S_{sU}} - \frac{\sqrt{|R_V|}}{S_{sV}}} \quad (3.11)$$

donde  $R_U = R_X \cos(\theta_a) + R_Y \sin(\theta_a)$ ,  $R_V = -R_X \sin(\theta_a) + R_Y \cos(\theta_a)$  y  $\theta_a$  es un ángulo tal que permite un ruido de fondo astigmático.

Así, pues, se trata de un problema de minimización en 24 parámetros (10 para el ruido de fondo y 14 para el modelo físico de CTF). A pesar de las restricciones

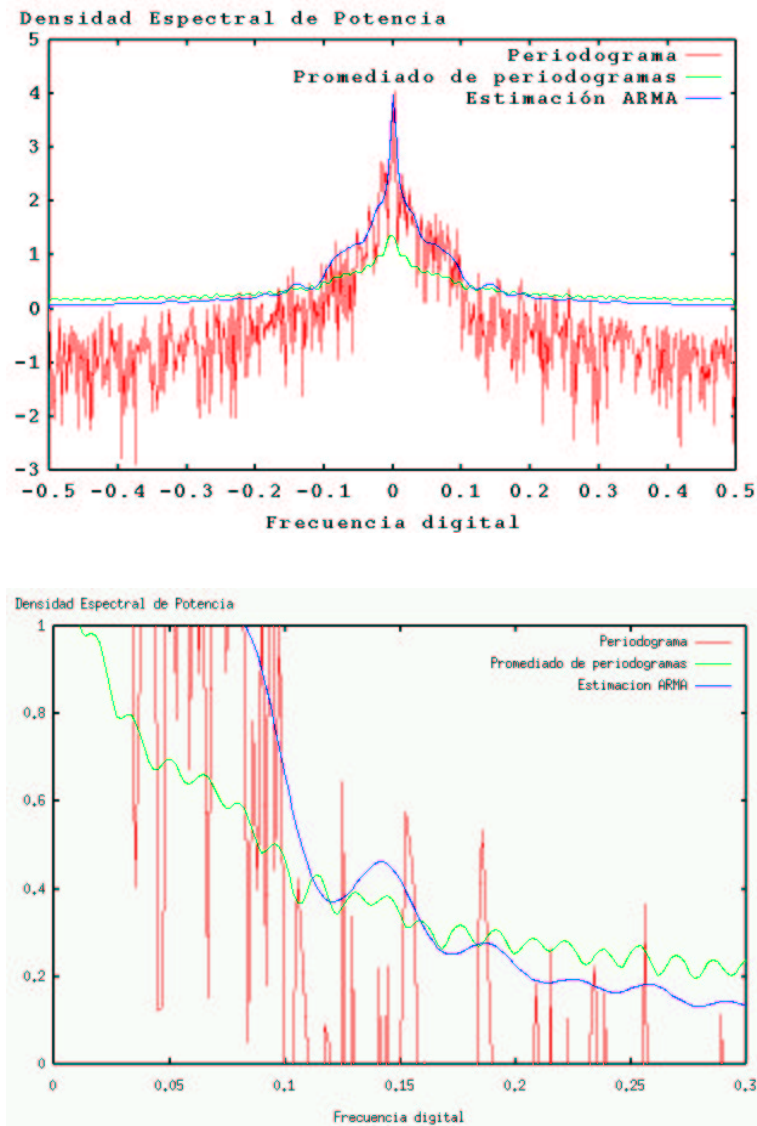


Figura 3.20: Comparación tipo entre periodograma, promediado de periodogramas y estimación paramétrica ARMA (arriba) y ampliación de la zona de mayor interés (abajo).

que se puedan poner de positividad y realismo físico de los parámetros, el número de mínimos locales de la función es inmenso. Este problema se ve aún más agravado por la no existencia de un único mínimo global. Sin embargo, se ha observado que la aproximación gradual propuesta en esta tesis proporciona niveles de ajuste suficientemente aceptables. La secuencia de pasos a realizar para la consecución de un mínimo aceptable se describe a continuación:

1. Determinación del ruido de fondo:

- a) Determinación del término constante: se calcula como la media de los valores que se encuentran en las frecuencias más altas
- b) Determinación del término dependiente de la raíz de la frecuencia, eliminando así la principal fuente de variación de la función a determinar. Se realiza este cálculo en tres fases:
  - 1) Ajuste por mínimos cuadrados para obtener una solución inicial.
  - 2) Optimización de la norma L1 del error cometido, de este modo se consigue un mejor ajuste a las zonas más bajas de la curva.
  - 3) Penalización gradual de dicho término, el objetivo es que este término conforme el fondo de la gráfica, por lo que debe encontrarse en todo momento por debajo de la superficie. Para ello se optimiza la norma L1 del error penalizando fuertemente aquellas situaciones en las que el fondo se encuentre por encima de la superficie a modelar. Sin embargo, se ha observado que cambios bruscos en el factor de penalización provoca inestabilidades en el proceso por lo que se ha adoptado una estrategia de penalización gradual según potencias de 2 hasta llegar a la penalización deseada.
- c) Determinación del término exponencial gaussiano: Sobre el error residual se ajusta un término gaussiano tal como se expone en la ecuación 3.11. El cálculo vuelve a realizarse en dos etapas:
  - 1) Ajuste por mínimos cuadrados: únicamente el término gaussiano es ajustado.
  - 2) Penalización gradual de todo el fondo: en este punto se optimizan todos los parámetros que definen el fondo de tal manera que se construya un soporte adecuado para la estimación del modelo físico de CTF.

2. **Determinación del modelo físico de CTF:** manteniendo fijo el término de fondo se busca el mejor modelo físico que ajusta a la superficie a modelar. De nuevo la aproximación es por etapas:
  - a) Determinación de un modelo simple de CTF: se realiza una búsqueda exhaustiva en los desenfoques de ambas direcciones asumiendo que en caso de existir astigmatismo éste no se encuentra rotado. Para cada combinación de desenfoques se eligen los mejores términos (por mínimos cuadrados) de ruido antes de CTF y apertura angular de la lente, de este modo modificamos de forma rápida la altura de la CTF y su decaimiento.
  - b) Optimización del modelo físico de CTF: en este momento se procede al ajuste del resto de los parámetros físicos del modelo manteniendo fija la expresión del ruido después de CTF. Es de reseñar el hecho de que a partir de este instante ya no se minimiza la norma L1 del error sino el error relativo conjugado con una función de distancia basada en correlación ponderada. De este modo concentramos nuestros esfuerzos en el ajuste de los lóbulos de la CTF, los cuales suelen tener valores muy inferiores a los del ruido de fondo.
  - c) Optimización global del modelo: llegados a este punto permitimos la variación de todos los parámetros del modelo completo. Debemos notar que aún se mantiene la restricción de una fuerte penalización al fondo por superar a la superficie a modelar.
3. **Optimización ponderada:** todavía pesan dos importantes inconvenientes sobre el proceso de optimización: el primero es que los valores de señal más útiles para determinar la CTF se encuentran fuertemente enmascarados por valores de ruido de fondo mucho mayores; el segundo, que la fuerte penalización sobre el ruido lo fuerza a encontrarse mucho más abajo de lo que realmente debería. Para solucionar estos dos problemas se ha optado por una adaptación gradual a la situación ideal ejecutada en dos etapas:
  - a) Aumento progresivo de la importancia de la CTF: conforme se avanza en el proceso mejor se perfila la región en la que se encuentran los ceros de la CTF por lo que se les puede ir dando un peso gradualmente mayor. Se ha establecido un esquema de pesos  $W_w(R)$  (ver más abajo) que dado el parámetro  $w$ , que varía según potencias de 2, asigna un peso diferente a cada frecuencia.



- b) Disminución progresiva de la penalización al fondo: el objetivo de esta penalización era permitir el ajuste correcto del modelo físico de CTF. Una vez que éste está bien aproximado puede eliminarse poco a poco la restricción con la intención de mejorar el ajuste final.
4. **Ajuste fino del modelo**: para finalizar se realiza una optimización de todos los parámetros, sin penalización sobre el fondo, evaluando en todos los puntos de la superficie (a diferencia de los pasos anteriores en los que se permitía la evaluación del ajuste en una rejilla con paso diferente de 1). Para potenciar el ajuste en la zona de mayor interés (hasta el tercer cero de la CTF) se establece un mecanismo de penalización gradual en el que cada vez los errores cometidos en dicha zona adquieren una mayor importancia.

En todos los pasos del algoritmo anterior deben tenerse en cuenta diversos aspectos que se detallan a continuación:

- **Rango de frecuencias**: se asume que el rango de frecuencias de la función de transferencia que debe ser modelado es el que se encuentra entre el 10 % y el 90 % del rango total. Es decir, las muy bajas frecuencias así como las muy altas no participan del proceso de modelado.
- **Ponderación frecuencial**: habitualmente se está interesado en el modelado correcto de las bajas y medias frecuencias puesto que los periodos de muestreo utilizados en la práctica concentran la señal en este rango. Por este motivo en los primeros pasos del algoritmo se ha establecido una ponderación lineal ( $W(R) = R_{max} - R$ ) de los errores cometidos dependiendo de a qué frecuencia se encuentren. Sin embargo, en pasos posteriores, al conocer con cierta exactitud la posición de los ceros de la CTF, se procede a una ponderación constante en la región de interés (definida entre las frecuencias del primer,  $R_1$ , y tercer cero,  $R_3$ ) y exponencial decreciente en sus inmediaciones

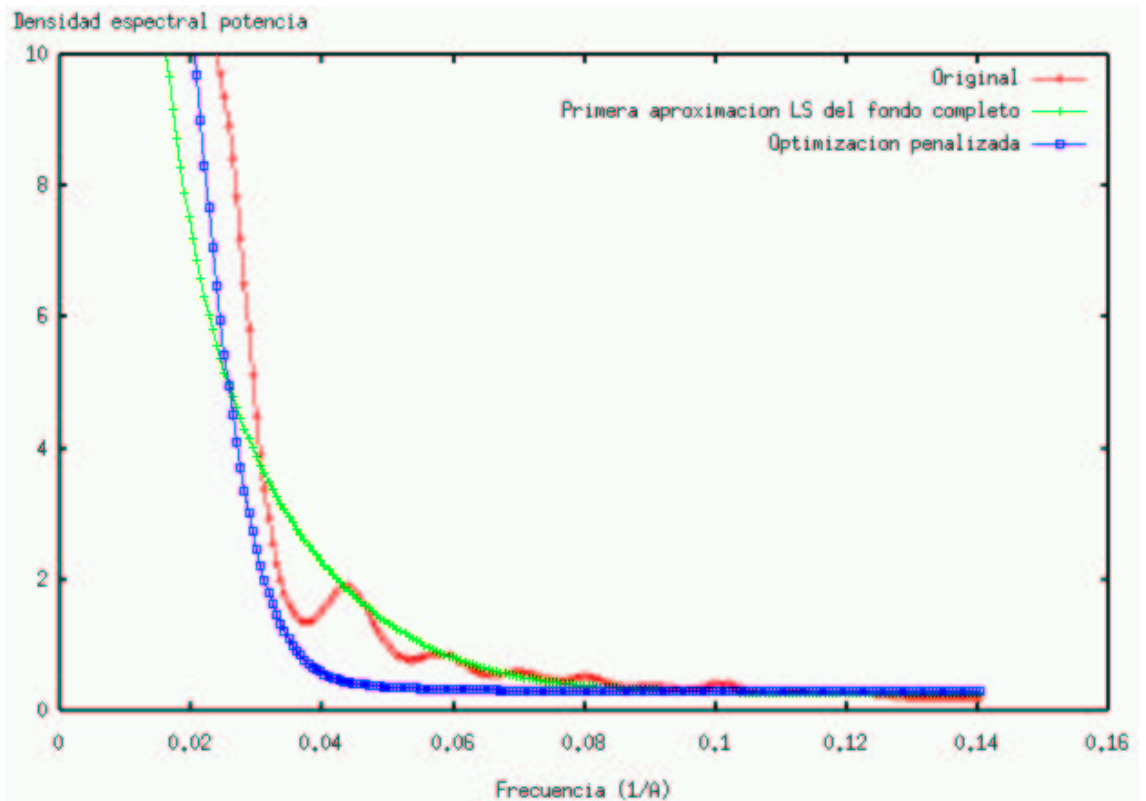
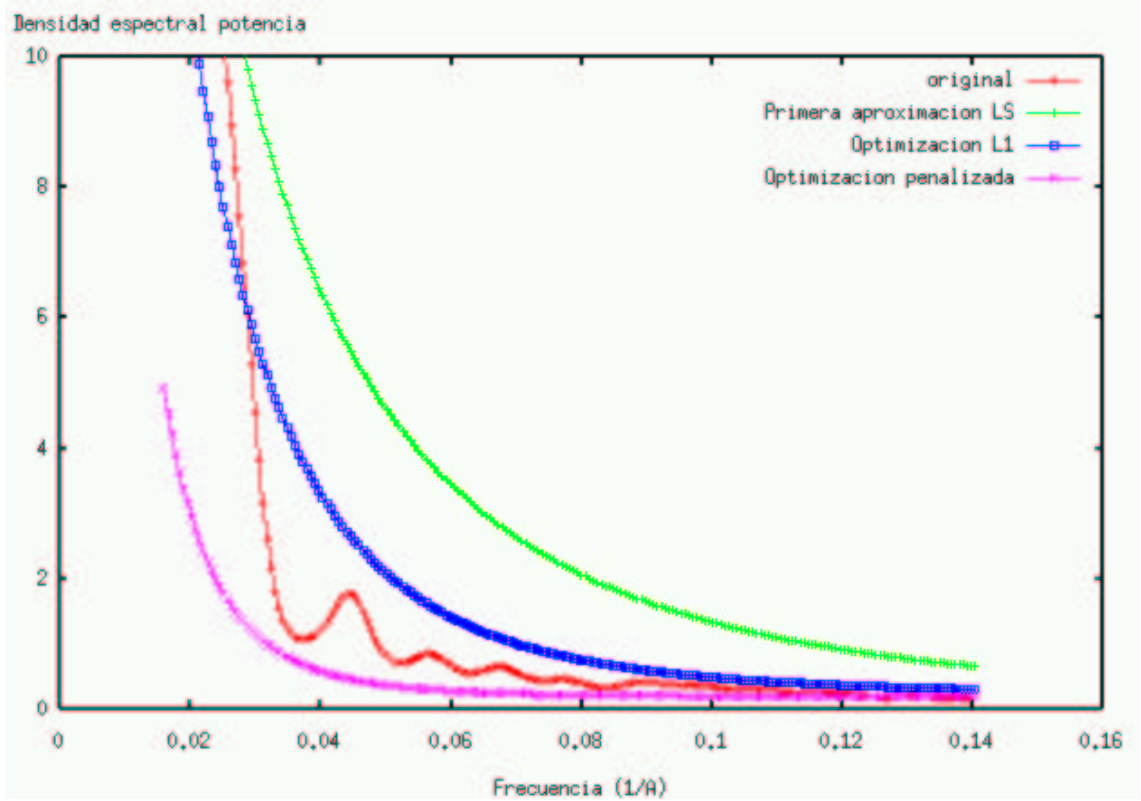
$$W_w(R) = \begin{cases} \frac{1}{w} - 1 + e^{\log(2 - \frac{1}{w}) \left( \frac{R - R_{min}}{R_1 - R_{min}} \right)} & R_{min} < R < R_1 \\ 1 & R_1 < R < R_3 \\ e^{-\log(\frac{1}{w}) \left( \frac{R - R_3}{R_{max} - R_3} \right)} & R_3 < R < R_{max} \\ 0 & \text{resto} \end{cases}$$

donde  $w$  es un parámetro que determina la velocidad de caída de las exponenciales.

- **Mínimos cuadrados:** las soluciones algebraicas de mínimos cuadrados requieren de una linealización previa de la función tal que se pueda expresar el sistema como  $Ax = b$ , donde  $A$  es la matriz de coeficientes,  $x$  es el conjunto de parámetros a determinar y  $b$  es el conjunto de valores que se desean aproximar por medio del producto  $Ax$ . Si cada valor de  $b$ ,  $b_i$ , lleva asociado un peso,  $w_i$ , expresando la confianza o la importancia que tiene dicho valor, entonces la solución de mínimos cuadrados ponderados para  $x$  es  $x = (A^tWA)^{-1}A^tWb$  [11], donde  $W$  es una matriz diagonal cuyos elementos son los valores  $w_i$ .
  
- **Optimización:** el método de optimización elegido es el de Powell [125, Cap. 10], el cual para la minimización de una función de coste multivariable dada varía consecutivamente cada una de las variables obteniendo un mínimo por gradiente descendiente.
  
- **Función de distancia:** la función de distancia es en este caso primordial al tener que optimizar sobre una función con un amplio rango dinámico de señal y estar nosotros interesados en la parte de menor valor. Una norma L2 sobre el error resulta inadecuada al estar dando más peso a los errores más grandes, que son los que se producen al comienzo de la curva. Sin embargo, los métodos algebraicos directos para minimización de mínimos cuadrados se basan en esta norma, por lo que la emplearemos como punto de partida de los algoritmos de optimización. Sin embargo, se ha adoptado una norma L1 para la aproximación del fondo, y L1 ponderada por el valor de la función en ese punto (también conocida como error relativo,  $e = \frac{|x-y|}{|x|}$ ) a la que se añade un término que da cuenta de la similaridad de la forma entre ambas superficies. Este término se calcula a través del momento del producto de Pearson [35], el cual permite la inclusión de la ponderación en un proceso de correlación

$$\bar{x} = \frac{\sum_i w_i x_i}{\sum_i w_i} \quad C_{xy} = \frac{\sum_i w_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i w_i - 1} \quad e = 1 - \frac{C_{xy}}{\sqrt{C_{xx}C_{yy}}}$$

Los resultados de este algoritmo pueden verse en la figura 3.21. Se observa cómo el modelo en cada paso va aproximándose mejor a la densidad espectral de potencia proporcionada por el modelado ARMA.



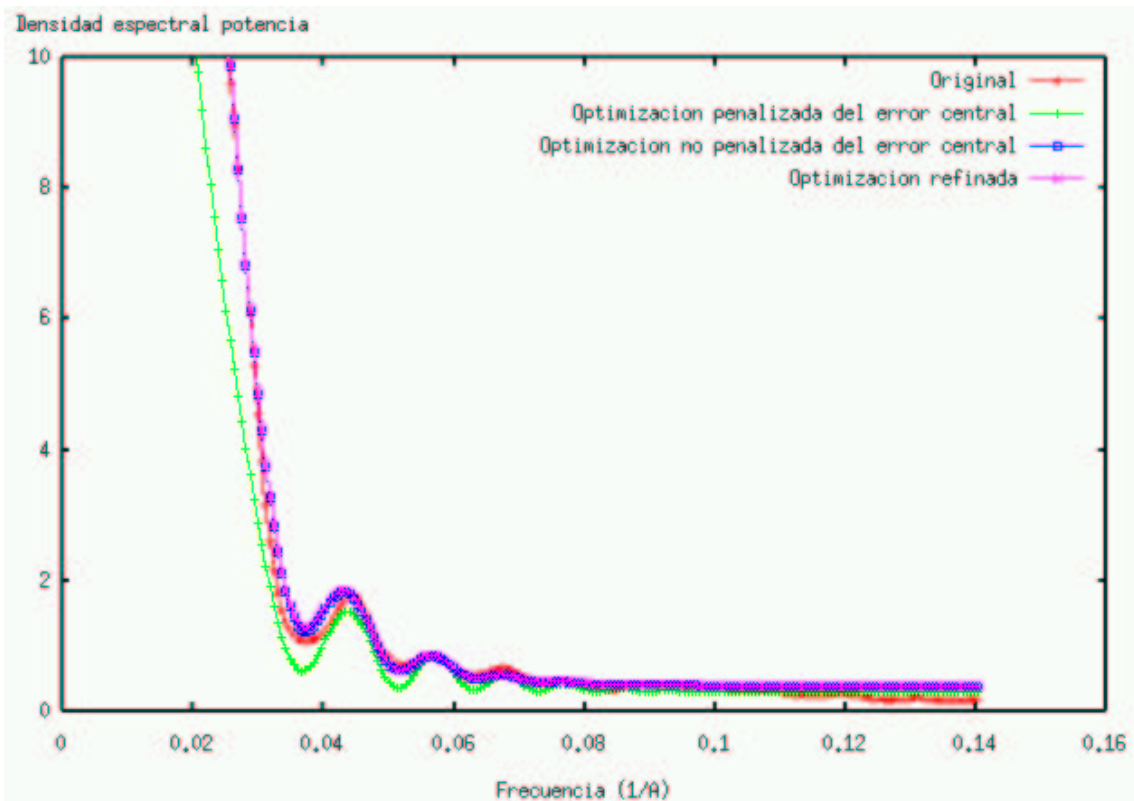
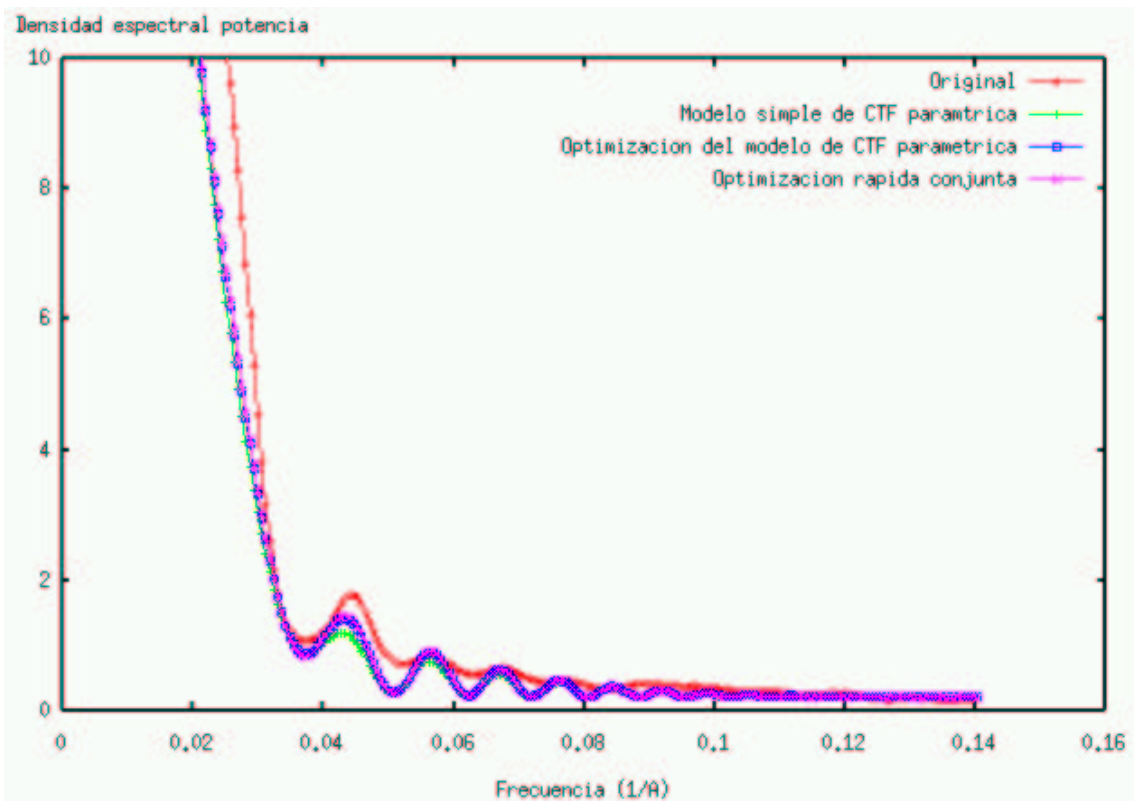


Figura 3.21: Corte radial de una función de transferencia de MET real y diferentes etapas del modelado (ver algoritmo de ajuste en el cuerpo del texto)



$I_{medida} = CTF \star I_{ideal}$  en el que se desprecian los términos de ruido pero que constituye un modelo clásico dentro de la teoría de señal [118]. A continuación se enumeran algunos de estos métodos:

- **División en el espacio de las proyecciones:** Asumiendo que el modelo de formación de imagen es el expuesto al comienzo de este apartado, basta con dividir la imagen medida por la función de transferencia en el espacio de frecuencias para obtener la imagen ideal [118]

$$I_{ideal}(\mathbf{R}) = \frac{I_{medida}(\mathbf{R})}{CTF(\mathbf{R})}$$

Sin embargo, este método no tiene en cuenta que la CTF tiene cambios de signo y que en los cruces por cero se amplifica fuertemente el ruido presente en las imágenes.

- **División en el espacio de la reconstrucción:** En el caso de que todas las proyecciones hubiesen sido afectadas por la misma función de transferencia no astigmática, entonces se puede demostrar que el volumen reconstruido está afectado por una función de transferencia tridimensional cuyo corte radial coincide con el de la función de transferencia bidimensional. En este caso particular, y dado que hay un menor nivel de ruido en los volúmenes reconstruidos, se puede afirmar que [138]

$$V_{ideal}(\mathbf{R}) = \frac{V_{reconstruido}(\mathbf{R})}{CTF_{3D}(\mathbf{R})}$$

no es una mala aproximación del volumen original. Esta técnica es correcta siempre que se cumplan las condiciones de partida (todas las proyecciones son afectadas por una misma CTF no astigmática), lo cual no siempre es el caso.

- **Filtrado de Wiener:** el filtrado de Wiener trabaja tanto en el espacio de las proyecciones [144, 69, 99] como en el de la reconstrucción [48, 92, 93, 110, 12], y se trata de una simple división por la CTF correspondiente teniendo cuidado de no dividir por números muy pequeños. Su versión para proyecciones es

$$I_{ideal}(\mathbf{R}) = \frac{|CTF(\mathbf{R})|^2 I_{medida}(\mathbf{R})}{|CTF(\mathbf{R})|^2 CTF(\mathbf{R}) + \varepsilon}$$

donde  $\epsilon$  es un valor que maximiza la actuación del algoritmo y que de alguna forma se encuentra relacionado con la estimación de la relación señal a ruido de la imagen. No obstante, no se da en ningún caso una guía de selección de dicho parámetro.

- **Incorporación explícita en las ecuaciones de reconstrucción:** esta técnica incluye explícitamente el efecto de la función de transferencia en las ecuaciones de reconstrucción bien a través de una  $CTF_{3D}$  como es el caso de SIRT [162] o máxima entropía [133]. Sin embargo, la función de transferencia tridimensional es difícil de determinar salvo en el caso trivial de que todas las proyecciones sea afectadas por una misma CTF no astigmática.
- **Combinación de volúmenes con diferentes CTF:** el presente método no trata estrictamente de corregir la CTF sino de soslayar sus efectos. Se trata de agrupar las proyecciones en conjuntos en los que la aproximación de que todas han sido modificadas por la misma CTF sí es correcta, realizar reconstrucciones individuales en cada grupo y, por último, combinar las componentes frecuenciales de cada uno de los volúmenes para dar una reconstrucción en las que todas las frecuencias se encuentren representadas [162]. Las reconstrucciones individuales pueden haberse efectuado con corrección de CTF o no.

Vemos que todas las aproximaciones presentan sus inconvenientes ya que o bien se divide por la CTF más o menos inteligentemente o bien se imponen restricciones muy fuertes a la CTF a corregir. En esta tesis se propone el empleo de la técnica conocida como Refinamiento Iterativo de Datos (*Iterative Data Refinement*, IDR) [18, 67, 136] que proporciona un mecanismo para corregir el efecto de la función de transferencia sin necesidad de dividir por ella en ningún momento ni de restringir su aplicación a una única CTF.

IDR es un algoritmo iterativo que modifica los datos de entrada al algoritmo de reconstrucción de tal manera que cada vez se parezcan más las proyecciones presentadas a las proyecciones que se obtendrían idealmente del objeto sin ser afectadas por ninguna función de transferencia. El inconveniente que presenta IDR es que tiene unas propiedades de convergencia un tanto peculiares [18], IDR no converge a la solución real para cualquier punto de partida aunque los puntos de la sucesión son más cercanos a la solución que el inicial. En este sentido se propone una corrección de fase sobre las proyecciones previa la cual ha demostrado dar buenos resultados experimentales. Este punto se desarrollará más adelante.

El algoritmo IDR es expresado por la siguiente fórmula recursiva

$$I^{(k+1)} = \mu^{(k)} I^{(0)} + \left( P - \mu^{(k)} CTF \cdot P \right) \cdot R I^{(k)} \quad k = 1, 2, \dots \quad (3.12)$$

donde  $I^{(k)}$  representa al conjunto de imágenes en la iteración  $k$  (en la iteración 0 se corresponden con el conjunto de imágenes obtenido experimentalmente),  $R$  es el operador reconstrucción (en nuestro caso ART),  $P$  el operador proyección (nótese que será un gran operador con una matriz adecuada para cada dirección de proyección),  $CTF$  el operador función de transferencia (de nuevo, las matrices de modificación por CTF pueden variar para cada imagen) y  $\mu^{(k)}$  es un factor de relajación en torno a 1. La figura 3.22 representa el funcionamiento de dicho algoritmo en diagrama de bloques.

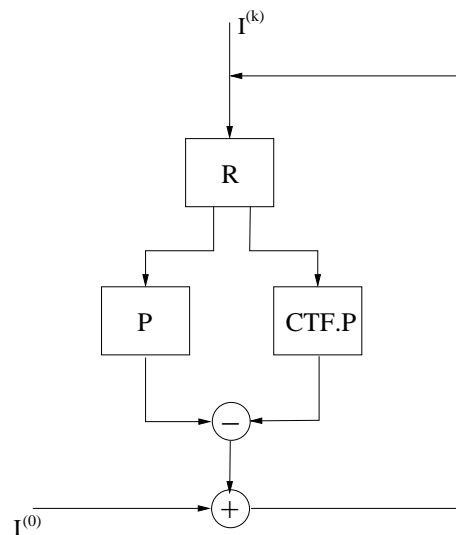


Figura 3.22: Diagrama de bloques del funcionamiento del algoritmo IDR

El razonamiento detrás del algoritmo postula que si  $V^{(k)} = R I^{(k)}$  es una buena aproximación del volumen ideal, aunque afectada por una determinada función de transferencia, y la función de transferencia está bien modelada por el operador  $CTF$ , entonces  $CTF \cdot P \cdot V^{(k)} \approx I^{(0)}$  y por tanto



$$\begin{aligned}
I^{(k+1)} &= \mu^{(k)} I^{(0)} + \left( P - \mu^{(1)} CTF \cdot P \right) \cdot R I^{(k)} \\
&= \mu^{(k)} I^{(0)} + \left( P - \mu^{(1)} CTF \cdot P \right) \cdot V^{(k)} \\
&= P \cdot V^{(k)} + \mu^{(k)} \left( I^{(0)} - CTF \cdot P \cdot V^{(k)} \right) \\
&\approx P \cdot V^{(k)}
\end{aligned}$$

El resultado es que en cada iteración se va eliminando cada vez más el efecto de la CTF sobre las proyecciones presentadas al algoritmo, con la ventaja de que tan sólo se necesita el operador  $CTF$  y no su inverso como en muchos otros algoritmos de restauración. Como principales inconvenientes de este método debemos señalar tres: la necesidad de partir de un volumen suficientemente cercano al ideal asegurando así la convergencia, la no inclusión del ruido en el modelo y la aparición de un nuevo parámetro,  $\mu^{(k)}$  a determinar. Respecto a la primera, se demuestra experimentalmente que una reconstrucción realizada con las imágenes reales corregidas por el signo de la CTF es una aproximación válida. En cuanto a la segunda, asumiendo que  $I^{(0)} = CTF \cdot P \cdot V_{ideal} + n$  y teniendo en cuenta que el nivel de ruido presente en las reconstrucciones  $V^{(k)}$  es relativamente bajo se puede comprobar que en ese caso  $I^{(k+1)} \approx P \cdot V^{(k)} + n$  por lo que el principio de supresión de CTF seguirá vigente. Por lo que a la tercera objeción respecta, se debe optimizar el comportamiento del algoritmo en los casos que nos ocupan, pero esto será objeto del apartado 5.5.

### 3.7. Protocolo de reconstrucción

Para finalizar el capítulo de mejoras se proponen las líneas generales de un protocolo de reconstrucción que haga uso de las técnicas introducidas por esta tesis. Este protocolo contempla todas las etapas de reconstrucción partiendo desde una micrografía, se resaltan en negrita aquellos procesos en los que se ha añadido algo nuevo al conjunto.

#### Preprocesamiento bidimensional

1. Selección de las partículas entre las diferentes micrografías
2. **Estimación local de la CTF** por medio de un modelado ARMA y un posterior ajuste de un modelo teórico (ver sección 3.6)

3. **Corrección de la fase de la CTF** en cada una de las proyecciones atendiendo a la CTF local calculada en el paso anterior. Ver sección 3.6.2.
4. **Normalización** de las imágenes escogiendo el método adecuado dependiendo de la mayor variabilidad en el conjunto (ver sección 3.3). Puede que haya que realizar correcciones multiplicativas debido a las diferencias entre las potencias de las distintas CTFs.
5. Enventanado de las partículas para la eliminación de ruido de fondo. Nótese que este paso debe realizarse después de la corrección de fase y normalización, puesto que esta última depende de los estadísticos del ruido.
6. Alineamiento traslacional de las partículas

### Clasificación bidimensional

Esta etapa depende fuertemente de la partícula en estudio por lo que no se pueden indicar líneas generales. El resultado de ella es un conjunto de distintas clases homogéneas según el criterio seleccionado.

### Asignación angular

Dependiendo de la estrategia de recolección de datos se puede realizar con modelo previo o sin modelo. Las técnicas varían en cada caso aunque profundizar en las mismas se sale del horizonte de esta tesis. La salida de este paso es una primera asignación de ángulos a cada una de las proyecciones.

### Reconstrucción tridimensional

1. Realizar el proceso actual de reconstrucción y refinado angular iterativamente incluyendo en el paso de reconstrucción restricciones de bajo impacto sobre la reconstrucción. Las restricciones menos restrictivas dependerán en cada caso de los datos obtenidos y la macromolécula bajo estudio. Esta primera aproximación reducirá problemas de caer en mínimos locales.
2. Repetir el proceso de reconstrucción y refinado angular utilizando el volumen del paso anterior como punto de partida y aplicando las restricciones de mayor impacto.
3. Realizar iteraciones de corrección de amplitud vía IDR (sección 3.6.3)



# Capítulo 4

## Extensión del método de reconstrucción basado en ART: Cristales

### 4.1. Planteamiento de la reconstrucción cristalográfica

Se entiende por un cristal biológico aquella disposición ordenada en el espacio que adopta un conjunto de moléculas bajo unas determinadas condiciones físico-químicas ambientales [3, 132]. Los cristales biológicos tridimensionales son estudiados por difracción de rayos X dada su mayor resolución. Sin embargo, no siempre es posible conseguir un cristal tridimensional. En caso de obtener un cristal bidimensional monocapa (es decir el crecimiento del cristal a lo largo del eje perpendicular al plano del cristal es de una sola celda) [147, 36, 4, 139, 71, 7, 149, 82], éste no puede ser analizado con rayos X. No obstante, la microscopía electrónica es capaz de extraer información de ellos a una resolución algo inferior [21, 81, 117] a la que se obtiene por difracción de rayos X. Vemos, pues, que las condiciones de trabajo son muy distintas a la de la reconstrucción de partículas individuales, puesto que el número de moléculas participantes suele ser muchísimo mayor en cristales y gracias a su disposición ordenada en el espacio podemos aplicar técnicas de procesado de señal mucho más poderosas [15, 141, 50, 58, 42, 44, 62], por contra no resulta sencillo desde el punto de vista bioquímico conseguir cristales macromoleculares. La figura 4.1 nos muestra una micrografía de un cristal biológico del cuello del bacteriófago  $\phi$ -29 junto con su

transformada de Fourier.

Desde el punto de vista de señal se puede modelar un cristal bidimensional en el espacio como la convolución de una función 3D motivo o celda unidad,  $f(\mathbf{r}) : C \rightarrow \mathbb{R}$  ( $C \subset \mathbb{R}^3$  es el espacio donde se define dicha celda unidad), con un tren de pulsos  $III_{\vec{a}, \vec{b}}(\mathbf{r}) = \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(H(\mathbf{r} - m\vec{a}))\delta(H(\mathbf{r} - n\vec{b}))\delta(H^\perp \mathbf{r})$  siendo  $H = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$ ,  $H^\perp = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$ ,  $\vec{a} = (a_x, a_y, 0)^t$  y  $\vec{b} = (b_x, b_y, 0)^t$

$$\tilde{f}(\mathbf{r}) = f(\mathbf{r}) \star III_{\vec{a}, \vec{b}}(\mathbf{r}) \quad (4.1)$$

Las proyecciones de este cristal espacial bidimensional definidas por su dirección,  $\vec{\omega}$ , y una rotación en el plano,  $\psi$ , es otro cristal bidimensional  $p_{\vec{\omega}, \psi}(\mathbf{s})$  periódico con vectores de red  $\vec{a}_{\vec{\omega}, \psi}$  y  $\vec{b}_{\vec{\omega}, \psi}$  (correspondientes a las proyecciones respectivas de los vectores de red tridimensionales a lo largo de la dirección  $\vec{\omega}, \psi$ ), es decir,

$$p_{\vec{\omega}, \psi}(\mathbf{s} + m\vec{a}_{\vec{\omega}, \psi} + n\vec{b}_{\vec{\omega}, \psi}) = p_{\vec{\omega}, \psi}(\mathbf{s}) \quad \forall m, n \in \mathbb{N}$$

La primera etapa de procesado se realiza en 2D tratando de mejorar la calidad de las imágenes obtenidas. En primer lugar, basándose en el hecho de que la transformada de Fourier de una señal periódica es nula salvo en un conjunto de  $\delta$ 's (llamados *spots* o reflexiones), se realiza un fuerte filtrado del ruido. A continuación se procede a un refinado por interpolación (*unbending*) del cristal obtenido debido a que los cristales biológicos presentan habitualmente pequeñas distorsiones que se manifiestan en ligeros errores de periodicidad. Por último, hace falta colocar las diferentes proyecciones en un origen de fases común (es decir, elegir los desplazamientos adecuados en cada una de las imágenes de forma que exista una celda unidad tridimensional coherente con las celdas unidad bidimensionales) y en un marco de valores común (las diferencias en intensidad se deben a factores como diferencias en la tinción del espécimen, revelado de la película o número de celdas en la imagen).

Estas etapas de procesamiento bidimensional se efectúan por medio de los programas desarrollados por el *Medical Research Council, MRC* (Cambridge) y me remito a [158, 30, 130] para un mayor detalle sobre el proceso.

La transformada de Fourier tridimensional de un cristal se compone de un conjunto de líneas paralelas (líneas de red). Fuera de ellas la transformada es nula mientras que en las mismas forma un continuo. La orientación de estas líneas viene determinada por el patrón de repetición cristalino. Actualmente la etapa de reconstrucción tridimensional de dichos cristales se realiza en el espacio de

## CAPÍTULO 4. EXTENSIÓN DE ART A CRISTALES

### 4.1. PLANTEAMIENTO DE LA RECONSTRUCCIÓN CRISTALOGRÁFICA

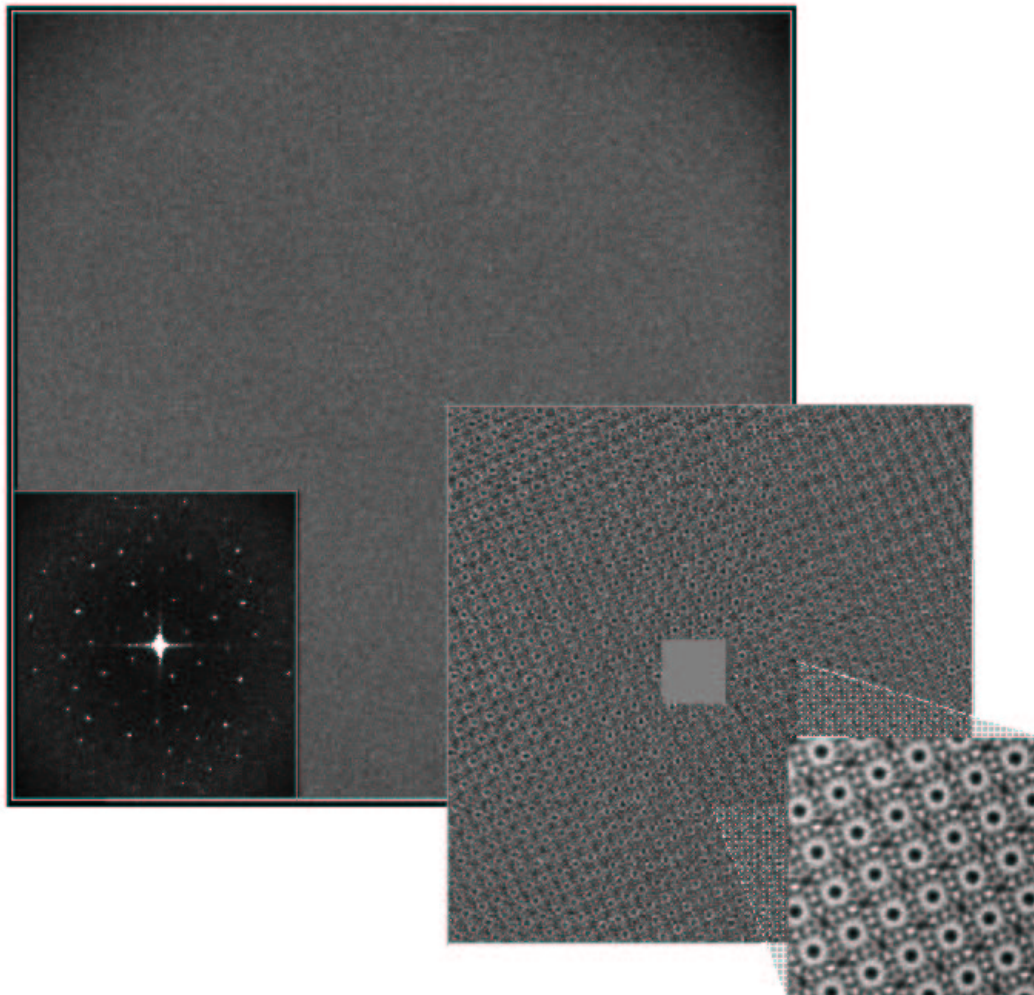


Figura 4.1: Micrografía por microscopía electrónica de un cristal del cuello del bacteriófago  $\phi$ -29 y su transformada de Fourier. Las dos ampliaciones han sido filtradas para ilustrar mejor su contenido.

Fourier basándose en el Teorema de la sección central (ver 2.1.3). La idea es que por medio de los *spots* se pueden calcular por interpolación todos los coeficientes de la transformada de Fourier del objeto bajo estudio en una línea de red hasta una determinada frecuencia y por medio de la transformada de Fourier inversa se obtienen la estructura tridimensional de la macromolécula.

La principal objeción al proceso anterior de reconstrucción tridimensional se opone a la interpolación realizada en el espacio de Fourier como fuente intrínseca de posibles errores. Es por ello que se ha extendido el procedimiento de reconstrucción en el espacio real utilizado a lo largo de la tesis, ART, como alternativa. Adicionalmente, estamos aumentando las posibilidades del proceso al disponer de mecanismos de inclusión de información *a priori* en el propio proceso de reconstrucción (ver Capítulo 3).

Como veremos en las secciones subsiguientes para evitar interpolaciones en el espacio real se debe muestrear el volumen a reconstruir de forma diferente a la habitual (ver sección 2.2) así como el espacio de las proyecciones. Estos dos remuestreos evitan dichas interpolaciones aunque configuran el problema de reconstrucción de manera radicalmente distinta a la habitual al trabajar con volúmenes y proyecciones distorsionados.

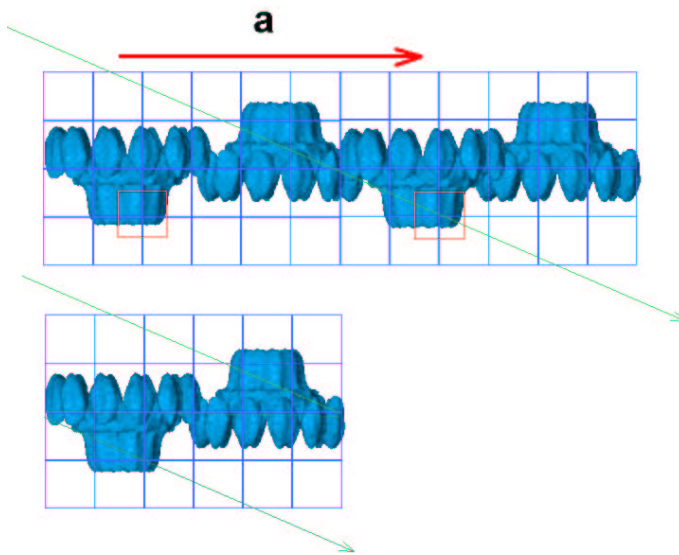
## 4.2. Muestreo del volumen a reconstruir

Sea  $\hat{f}(\mathbf{r})$  una expansión en serie (ver sección 2.2) del volumen solución  $f(\mathbf{r})$

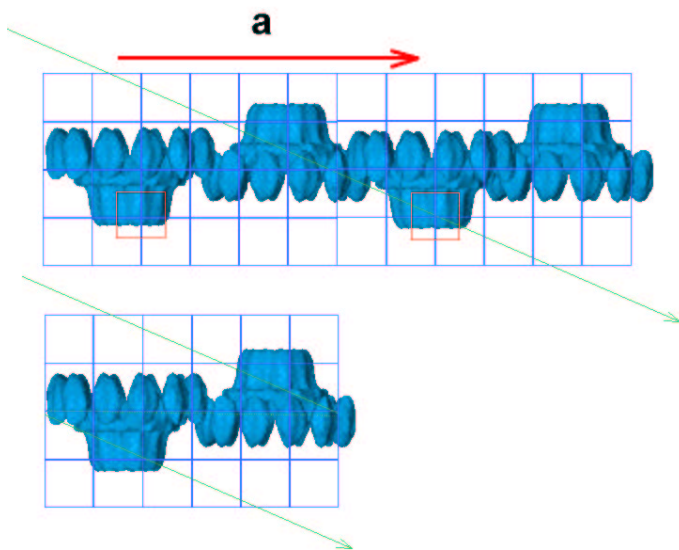
$$\hat{f}(\mathbf{r}) = \sum_{(i,j,k) \in G_C} x_{(i,j,k)} b(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{G_C(i,j,k)}) \approx f(\mathbf{r})$$

siendo  $G_C = \{(i, j, k) \in G : \mathbf{r}_{G_C(i,j,k)} \in C\}$ ,  $G$  cualquiera de las rejillas de expansión habituales expuestas en la sección 2.2.1 y  $b(\mathbf{r})$  el blob tal y como se define en la sección 2.2.2. Nuestro objetivo es la determinación de los coeficientes  $x_{(i,j,k)}$  pero para ello necesitamos que los diferentes rayos de proyección puedan ser calculados únicamente a partir de dichos coeficientes sin interpolación, tal y como se muestra en la figura 4.2(a). Este tipo de proyecciones sin interpolación únicamente se pueden conseguir en el caso ideal de que los vectores de red tridimensionales  $\vec{a}$  y  $\vec{b}$  puedan ser expresados en el espacio definido por la rejilla  $G_C$  como un par de vectores de componentes enteras. En caso contrario, habrá que realizar interpolaciones tal y como se muestra en la figura 4.2(b).

Este hecho sugiere un remuestreo del volumen en puntos tales que los vectores de red tridimensionales sean vectores enteros en la rejilla de reconstrucción. Un



(a) Cálculo de la proyección de un cristal con interpolación debido a que los vectores de red no se pueden expresar como enteros en el espacio definido por la rejilla de reconstrucción.



(b) Cálculo de la proyección de un cristal sin interpolación debido a que los vectores de red se expresan en la rejilla de reconstrucción como un vector de números enteros.

Figura 4.2: Proyección de un cristal en el caso de vectores de red enteros y reales



cambio de rejilla tal y como se muestra en la figura 4.3

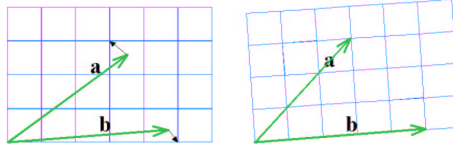


Figura 4.3: Vectores de red tridimensionales en una rejilla en la que no pertenecen a  $\mathbb{Z}^2 \times 0$  (izq.) y en la que sí (der.)

Los vectores de red de componentes enteras que menos distorsionan el muestreo inicial es aquel con nuevos vectores  $\vec{a}_i = ([\vec{a}_x/g], [\vec{a}_y/g], 0)^t$  y  $\vec{b}_i = ([\vec{b}_x/g], [\vec{b}_y/g], 0)^t$  siendo  $[\cdot]$  la operación redondeo al entero más cercano. Se define unívocamente la matriz  $D \in \mathcal{M}_{3 \times 3}$  como aquella que cumple

$$\begin{aligned} \vec{a}/g &= D\vec{a}_i \\ \vec{b}/g &= D\vec{b}_i \\ (0, 0, 1)^t &= D(0, 0, 1)^t \end{aligned} \quad (4.2)$$

De este modo, la expansión en serie del volumen  $f(\mathbf{r})$  se realiza en una nueva rejilla  $G_{D,C} = \{(i, j, k) \in G : D\mathbf{r}_{G(i,j,k)} \in C\}$ . Esta deformación del espacio de muestreo sugiere a su vez una deformación conforme de la función base para evitar la falta de cobertura en alguna región del espacio. En este sentido se propone que la base de la expansión sea una versión deformada del propio blob  $b_D(\mathbf{r}) = b(D\mathbf{r})$ . Por lo que finalmente la expansión del volumen solución queda como

$$\hat{f}(\mathbf{r}) = \sum_{(i,j,k) \in G_{D,C}} x'_{(i,j,k)} b_D(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{G_{D,C}(i,j,k)}) \approx f(\mathbf{r}) \quad (4.3)$$

En resumen, se muestrea la celda unidad  $f(\mathbf{r})$  en unos puntos tales que los vectores de red tridimensionales se expresan como vectores enteros en el espacio de la rejilla de expansión y con una función base que es una versión deformada del blob clásico. Esta versión deformada hace que el blob deje de tener simetría esférica para tenerla elipsoidal. Por este motivo, debemos replantearnos la relación entre las imágenes de proyección arrojadas por el blob esférico a lo largo de la dirección  $\vec{\omega}, \psi$  y las obtenidas del blob elipsoidal.

Se define la proyección del blob  $b(\mathbf{r})$  a lo largo de la recta que pasa por el punto  $\mathbf{s}$  del plano de proyección y lleva la dirección determinada por el vector unitario definido por  $\vec{\omega}, \psi$  como

$$p_{\vec{\omega}, \psi}(\mathbf{s}) = \int_{-\infty}^{\infty} b(E_{\vec{\omega}, \psi}^{-1} H^t \mathbf{s} + l \vec{\omega}) dl$$

Para el blob elipsoidal deberemos calcular su proyección en función de la proyección ya conocida del blob esférico

$$\begin{aligned}
 p_{\vec{\omega}, \psi}^l(\mathbf{s}) &= \int_{-\infty}^{\infty} b_D(E_{\vec{\omega}, \psi}^{-1} H^t \mathbf{s} + l \vec{\omega}) dl \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} b(DE_{\vec{\omega}, \psi}^{-1} H^t \mathbf{s} + l D \vec{\omega}) dl \\
 &= \left\{ l' = \|D \vec{\omega}\| l, \vec{\omega}' = \frac{D \vec{\omega}}{\|D \vec{\omega}\|}, \mathbf{s}' = \|D\| \mathbf{s} \right\} \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} b\left(\frac{1}{\|D\|} DE_{\vec{\omega}, \psi}^{-1} H^t \mathbf{s}' + l' \vec{\omega}'\right) \frac{1}{\|D \vec{\omega}\|} dl' \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} b\left(\left(\|D\| E_{\vec{\omega}, \psi} D^{-1}\right)^{-1} H^t \mathbf{s}' + l' \vec{\omega}'\right) \frac{1}{\|D \vec{\omega}\|} dl' \tag{4.4} \\
 &= \left\{ E_{\vec{\omega}', \psi'} = \|D\| E_{\vec{\omega}, \psi} D^{-1} \right\} \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} b\left(E_{\vec{\omega}', \psi'}^{-1} H^t \mathbf{s}' + l' \vec{\omega}'\right) \frac{1}{\|D \vec{\omega}\|} dl' \\
 &= \frac{1}{\|D \vec{\omega}\|} p_{\vec{\omega}', \psi'}^{\rightarrow} \{\mathbf{s}'\} \\
 &= \frac{1}{\|D \vec{\omega}\|} p_{\vec{\omega}', \psi'}^{\rightarrow} (\|D\| \mathbf{s})
 \end{aligned}$$

donde se ha hecho uso de los cambios  $\vec{\omega}' = \frac{D \vec{\omega}}{\|D \vec{\omega}\|}$  y  $l' = \|D \vec{\omega}\| l$ . Es decir, la proyección del blob elipsoidal es proporcional a la del blob esférico en un punto y dirección modificados por la matriz  $D$ .

### 4.3. Muestreo del espacio de proyecciones

Después de la etapa de procesamiento 2D aplicada a cada una de las imágenes de proyección del cristal (véase la sección 4.1), la salida de los programas del MRC consiste en una lista indexada con el valor complejo,  $b_{K,L}$ , de la transformada de Fourier del objeto a una frecuencia  $\mathbf{S}_{K,L} = K \vec{a}_{\vec{\omega}, \psi}^* + L \vec{b}_{\vec{\omega}, \psi}^*$  correspondientes a cada uno de los *spots*.  $\vec{a}_{\vec{\omega}, \psi}^*$  y  $\vec{b}_{\vec{\omega}, \psi}^*$  son los vectores de red en el espacio de Fourier asociados a la proyección en la dirección  $\vec{\omega}, \psi$ . De esta suerte, la transformada de Fourier de la proyección queda como

$$\begin{aligned} P_{\vec{\omega},\psi}(\mathbf{S}) &\approx \sum_{K,L} b_{K,L} \delta(\mathbf{S} - \mathbf{S}_{K,L}) \\ &= \sum_{K,L} b_{K,L} \delta(\mathbf{S} - \Delta_{\vec{\omega},\psi}^*(K,L)^t) \end{aligned}$$

$$\text{donde } \Delta_{\vec{\omega},\psi}^* = (\overrightarrow{a_{\vec{\omega},\psi}^*}, \overrightarrow{b_{\vec{\omega},\psi}^*})$$

Antes de pasar adelante, debe notarse que los vectores de red en el espacio real y en el de Fourier mantienen una relación de dualidad tanto en el espacio de las proyecciones como en el tridimensional.

$$\begin{aligned} \langle \overrightarrow{a_{\vec{\omega},\psi}}, \overrightarrow{a_{\vec{\omega},\psi}^*} \rangle &= \|\overrightarrow{a_{\vec{\omega},\psi}}\| \|\overrightarrow{a_{\vec{\omega},\psi}^*}\| & \langle \overrightarrow{a}, \overrightarrow{a^*} \rangle &= \|\overrightarrow{a}\| \|\overrightarrow{a^*}\| \\ \langle \overrightarrow{b_{\vec{\omega},\psi}}, \overrightarrow{b_{\vec{\omega},\psi}^*} \rangle &= \|\overrightarrow{b_{\vec{\omega},\psi}}\| \|\overrightarrow{b_{\vec{\omega},\psi}^*}\| & \langle \overrightarrow{b}, \overrightarrow{b^*} \rangle &= \|\overrightarrow{b}\| \|\overrightarrow{b^*}\| \\ \langle \overrightarrow{a_{\vec{\omega},\psi}}, \overrightarrow{b_{\vec{\omega},\psi}^*} \rangle &= \langle \overrightarrow{b_{\vec{\omega},\psi}}, \overrightarrow{a_{\vec{\omega},\psi}^*} \rangle = 0 & \langle \overrightarrow{a}, \overrightarrow{b^*} \rangle &= \langle \overrightarrow{b}, \overrightarrow{a^*} \rangle = 0 \end{aligned}$$

Esto se traduce en que para un cristal de dimensiones  $X_{crist} \times Y_{crist}$  píxeles, y construyendo  $\Delta_{\vec{\omega},\psi} = (\overrightarrow{a_{\vec{\omega},\psi}}, \overrightarrow{b_{\vec{\omega},\psi}})$ , se cumple que

$$\Delta_{\vec{\omega},\psi}^t \cdot \Delta_{\vec{\omega},\psi}^* = \begin{pmatrix} X_{crist} & 0 \\ 0 & Y_{crist} \end{pmatrix} \quad (4.5)$$

ecuación que se usa para conocer los vectores de red en un espacio conociendo los del espacio dual.

En este punto podemos calcular la proyección de la celda unidad del cristal filtrado, refinado, y puesto en un mismo marco de amplitudes y fases por medio de la transformada de Fourier inversa y un enventanado,  $W_{C_{\vec{\omega},\psi}}(\mathbf{s})$  por el soporte de la celda unidad bidimensional correspondiente a cada una de las proyecciones,  $C_{\vec{\omega},\psi}$

$$\begin{aligned} p_{\vec{\omega},\psi}(\mathbf{s}) &= W_{C_{\vec{\omega},\psi}}(\mathbf{s}) \mathcal{F} \mathcal{T}^{-1} \{P_{\vec{\omega},\psi}(\mathbf{S})\} \\ &\approx W_{C_{\vec{\omega},\psi}}(\mathbf{s}) \sum_{K,L} b_{K,L} \int_{\mathbb{R}^2} \delta(\mathbf{S} - \mathbf{S}_{K,L}) e^{2\pi i \langle \mathbf{s}, \mathbf{S} \rangle} d\mathbf{S} \\ &= W_{C_{\vec{\omega},\psi}}(\mathbf{s}) \sum_{K,L} b_{K,L} e^{2\pi i \langle \mathbf{s}, \mathbf{S}_{K,L} \rangle} \\ &= W_{C_{\vec{\omega},\psi}}(\mathbf{s}) \sum_{K,L} b_{K,L} e^{2\pi i \langle \mathbf{s}, \Delta_{\vec{\omega},\psi}^*(K,L)^t \rangle} \end{aligned}$$

La expresión anterior nos deja la celda unidad enventanada con una máscara romboide de vértices  $\frac{\overrightarrow{a_{\vec{\omega},\psi}} + \overrightarrow{b_{\vec{\omega},\psi}}}{2}$ ,  $\frac{\overrightarrow{a_{\vec{\omega},\psi}} - \overrightarrow{b_{\vec{\omega},\psi}}}{2}$ ,  $\frac{-\overrightarrow{a_{\vec{\omega},\psi}} + \overrightarrow{b_{\vec{\omega},\psi}}}{2}$  y  $\frac{-\overrightarrow{a_{\vec{\omega},\psi}} - \overrightarrow{b_{\vec{\omega},\psi}}}{2}$  y los coeficien-

tes  $b_{KL}$  distribuidos en una red de vectores  $\overrightarrow{a_{\bar{\omega},\psi}^*}, \overrightarrow{b_{\bar{\omega},\psi}^*}$  la cual no es muy apropiada para el uso de algoritmos de FFT. Si deseamos ortogonalizar dichos coeficientes, deberemos seleccionar un nuevo tamaño de celda unidad en el espacio real,  $X_{celda}^o \times Y_{celda}^o$  y calcular la proyección obtenida como  $p_{\bar{\omega},\psi}^o(\mathbf{s}_o) = p_{\bar{\omega},\psi}(A^{*t} \mathbf{s}_o)$  siendo

$$A_{\bar{\omega},\psi}^* = \begin{pmatrix} \frac{X_{crist}}{X_{celda}^o} & 0 \\ 0 & \frac{Y_{crist}}{Y_{celda}^o} \end{pmatrix} \cdot \Delta_{\bar{\omega},\psi}^{*-1} = O^* \cdot \Delta_{\bar{\omega},\psi}^{*-1}$$

Por una parte es obvio que  $A_{\bar{\omega},\psi}^* \overrightarrow{a_{\bar{\omega},\psi}^*} = \left(\frac{X_{crist}}{X_{celda}^o}, 0\right)^t = \overrightarrow{a_o^*}$  y  $A_{\bar{\omega},\psi}^* \overrightarrow{b_{\bar{\omega},\psi}^*} = \left(\frac{Y_{crist}}{Y_{celda}^o}, 0\right)^t = \overrightarrow{b_o^*}$ . Por otra, si definimos  $A_{\bar{\omega},\psi} = \left(A_{\bar{\omega},\psi}^{*t}\right)^{-1} = (O^{*t})^{-1} \cdot (\Delta_{\bar{\omega},\psi})^{-1} = O \cdot (\Delta_{\bar{\omega},\psi})^{-1}$  y usando 4.5 es fácil demostrar que

$$O = \begin{pmatrix} X_{celda}^o & 0 \\ 0 & Y_{celda}^o \end{pmatrix}$$

y, por tanto,  $A_{\bar{\omega},\psi} \overrightarrow{a_{\bar{\omega},\psi}} = (X_{celda}^o, 0)^t = \overrightarrow{a_o}$  y  $A_{\bar{\omega},\psi} \overrightarrow{b_{\bar{\omega},\psi}} = (0, Y_{celda}^o)^t = \overrightarrow{b_o}$ . Es decir,  $A_{\bar{\omega},\psi}$  y  $A_{\bar{\omega},\psi}^*$  son dos matrices de ortogonalización duales, cada una usada en el espacio correspondiente.

$$\begin{aligned} p_{\bar{\omega},\psi}^o(\mathbf{s}_o) &= p_{\bar{\omega},\psi}(A_{\bar{\omega},\psi}^{*t} \mathbf{s}_o) \\ &= p_{\bar{\omega},\psi}(A_{\bar{\omega},\psi}^{-1} \mathbf{s}_o) \\ &= W_{C_{\bar{\omega},\psi}}(A_{\bar{\omega},\psi}^{*t} \mathbf{s}_o) \sum_{K,L} b_{K,L} e^{2\pi i \langle A_{\bar{\omega},\psi}^{*t} \mathbf{s}_o, \Delta_{\bar{\omega},\psi}^*(K,L)^t \rangle} \\ &= W_{C_{\bar{\omega},\psi}}(A_{\bar{\omega},\psi}^{-1} \mathbf{s}_o) \sum_{K,L} b_{K,L} e^{2\pi i \langle \mathbf{s}_o, A_{\bar{\omega},\psi} \Delta_{\bar{\omega},\psi}^*(K,L)^t \rangle} \\ &= W_{C_{\bar{\omega},\psi}}(A_{\bar{\omega},\psi}^{-1} \mathbf{s}_o) \sum_{K,L} b_{K,L} e^{2\pi i \langle \mathbf{s}_o, O^* \Delta_{\bar{\omega},\psi}^{*-1} \Delta_{\bar{\omega},\psi}^{*t} (K,L)^t \rangle} \\ &= W_{C_{\bar{\omega},\psi}}(A_{\bar{\omega},\psi}^{-1} \mathbf{s}_o) \sum_{K,L} b_{K,L} e^{2\pi i \langle \mathbf{s}_o, O^*(K,L)^t \rangle} \\ &= W_{C_o}(\mathbf{s}_o) \sum_{K,L} b_{K,L} e^{2\pi i \langle \mathbf{s}_o, O^*(K,L)^t \rangle} \end{aligned}$$

donde  $W_{C_o}(\mathbf{s}_o)$  es una ventana rectangular de vértices  $\frac{\overrightarrow{a_o} + \overrightarrow{b_o}}{2}$ ,  $\frac{\overrightarrow{a_o} - \overrightarrow{b_o}}{2}$ ,  $\frac{-\overrightarrow{a_o} + \overrightarrow{b_o}}{2}$  y  $\frac{-\overrightarrow{a_o} - \overrightarrow{b_o}}{2}$

Para resumir este apartado se puede decir que existe un mecanismo de ortogonalización de las proyecciones de tal forma que los coeficientes de la transformada de Fourier hallados en la etapa de procesamiento bidimensional pueden ser llevados al espacio real sin ningún tipo de interpolación. Sin embargo, habrá que

cuidarse de que el operador de proyección del algoritmo de reconstrucción tridimensional genere proyecciones en este nuevo espacio ortogonalizado, lo cual será objeto de estudio en la siguiente sección.

## 4.4. Algoritmos

Esta sección especifica la secuencia de pasos a realizar para implementar efectivamente los operadores de generación de proyección a partir de los coeficientes de la transformada de Fourier, proyección del volumen de reconstrucción y paso a vóxeles, cruciales en el algoritmo de reconstrucción ART, de tal forma que reflejen fielmente la derivación teórica expuesta hasta este momento. Me remito a la sección 2.3.3 para una comparación con los mismos algoritmos en su versión de partículas individuales.

### Generación de las proyecciones ortogonalizadas

La etapa de procesamiento bidimensional produce como salida el conjunto de coeficientes de la transformada de Fourier de la proyección,  $b_{KL}$ , así como los vectores de red en dicho espacio  $\vec{a}_{\vec{\omega},\psi}^*$  y  $\vec{b}_{\vec{\omega},\psi}^*$ . Para obtener las proyecciones  $p_{\vec{\omega},\psi}^o(\mathbf{s}_o)$  se debe aplicar una transformada discreta de Fourier inversa de acuerdo a la siguiente fórmula

$$p_{\vec{\omega},\psi}^o(\mathbf{s}_o) = \sum_{K,L} b_{KL} e^{(K(1,0)+L(0,1)) \cdot \mathbf{s}_o} = \sum_{K,L} b_{KL} e^{K(\mathbf{s}_o)_x + L(\mathbf{s}_o)_y} \quad (4.6)$$

cuya implementación como algoritmo es trivial.

### Operador proyección del volumen de reconstrucción

Dado un volumen,  $\hat{f}(\mathbf{r})$ , definido por el muestreo con blobs elipsoidales,  $b_D(\mathbf{r})$ , sobre una rejilla  $G_{D,C}$  (ver sección 4.2) y dada la dirección de proyección  $(\vec{\omega}, \psi)$ , la proyección de dicho volumen  $p_{\vec{\omega},\psi}^o(\mathbf{s}_o)$  se calcula del siguiente modo:

1. Calcular la matriz de Euler,  $E_{\vec{\omega},\psi}$  asociada a la dirección de proyección (ver sección 2.1.2)
2. Calcular el factor de escala de la proyección de los blobs  $k = \|H \cdot E_{\vec{\omega},\psi} \cdot (0, 0, 1)^t\|$  donde  $H$  es una matriz de proyección ortogonal ya presentada en 4.1

3. Calcular la matriz de ortogonalización  $A_{\vec{\omega}, \psi}$  de proyecciones (ver sección 4.3)
4. Calcular los extremos,  $X_0, X_F, Y_0, Y_F$  de la celda unidad como aquella que tiene de lados  $X_{celda}^o \times Y_{celda}^o$  (ver sección 2.3.3).
5. Para todos los puntos de muestreo  $(i, j, k) \in G_{D,C}$  hacer
  - a) Calcular la posición en el espacio del punto  $(i, j, k)$ . Dicha posición recibe el nombre de  $\mathbf{r}_{D,C,(i,j,k)}$  y representa al centro del blob elipsoidal.
  - b) Proyectar el centro del blob elipsoidal,  $\mathbf{s}_{D,(i,j,k)} = H \cdot E_{\vec{\omega}, \psi} \cdot \mathbf{r}_{D,C,(i,j,k)}$
  - c) Calcular el rectángulo definido por  $\mathbf{s}_o^1, \mathbf{s}_o^2$  que inscribe a la proyección del blob en la proyección ortogonalizada
    - 1)  $\mathbf{s}_b = r(1, 1)^t$  donde  $r$  es el radio del blob esférico
    - 2)  $\mathbf{s}_{D,b} = D\mathbf{s}_b$
    - 3)  $\mathbf{s}_{D,b}^{\max} = \text{máx} \left\{ (\mathbf{s}_{D,b})_x, (\mathbf{s}_{D,b})_y \right\} (1, 1)^t$
    - 4)  $\mathbf{s}_{o,b}^{\max} = A\mathbf{s}_{D,b}^{\max}$
    - 5)  $\mathbf{s}_{o,b}^{\max} = \text{máx} \left\{ (\mathbf{s}_{o,b})_x, (\mathbf{s}_{o,b})_y \right\} (1, 1)^t$
    - 6)  $\mathbf{s}_o^1 = A\mathbf{s}_{D,(i,j,k)} - \mathbf{s}_{o,b}^{\max}$
    - 7)  $\mathbf{s}_o^2 = A\mathbf{s}_{D,(i,j,k)} + \mathbf{s}_{o,b}^{\max}$
  - d) Para todo punto del plano de proyección ortogonalizado en el rectángulo  $(\{\mathbf{s}_o = (m, n) \in \mathbb{N}^2 : \mathbf{s}_o^1 \leq \mathbf{s}_o \leq \mathbf{s}_o^2\})$  hacer
    - 1) Desortogonalizar la posición,  $\mathbf{s}_D = A^{-1}\mathbf{s}_o$
    - 2) Calcular la distancia a la proyección del centro del blob elipsoidal,  $\mathbf{d}_D = \mathbf{s}_D - \mathbf{s}_{D,(i,j,k)}$
    - 3) Descomprimir dicha distancia,  $\mathbf{d} = D\mathbf{d}_D$
    - 4) Calcular la proyección de un blob esférico a esa distancia,  $p$  (ver sección 2.2.2).
    - 5) Calcular la proyección de un blob elipsoidal a esa distancia,  $p_D = k \cdot p$
    - 6) Si  $\mathbf{s}_o$  está fuera de la celda unidad ortogonalizada (ver sección 4.3) se debe introducir por el lado contrario al que se ha salido.

$\mathbf{s}'_0 = \left( \text{wrap}((\mathbf{s}_0)_x, X_0, X_F), \text{wrap}((\mathbf{s}_0)_y, Y_0, Y_F) \right)$  donde

$$\text{wrap}(x, x_0, x_F) = \begin{cases} x - \left[ \frac{x-x_0+1}{(x_F-x_0+1)-1} \right] (x_F - x_0 + 1) & x \leq x_0 \\ x & x_0 \leq x \leq x_F \\ x - \left[ \frac{x-x_F-1}{(x_F-x_0+1)+1} \right] (x_F - x_0 + 1) & x_F \leq x \end{cases}$$

- 7) Sumar  $p_D$  ponderado por el coeficiente del blob correspondiente,  $x'_{(i,j,k)}$ , a la proyección en el lugar indicado por  $\mathbf{s}'_0$ .

### Operador de paso a vóxeles

La última operación que debe ser modificada es el paso a vóxeles de un volumen,  $\hat{f}(\mathbf{r})$  definido tal y como en 4.2. Dicho volumen se encuentra inicialmente definido como una suma ponderada de blobs elipsoidales,  $b_D(\mathbf{r})$ , sobre una rejilla  $G_{D,C}$ . Se asume que los vóxeles tienen un tamaño  $1 \times 1 \times 1$  y se encuentran distribuidos sobre una rejilla cúbica de lado 1,  $G_V$ . Los vectores de red que definen la celda unidad están expresados en la rejilla  $G_V$  como  $\vec{a}$  y  $\vec{b}$ . El cambio de la base y rejilla de muestreo se realiza como sigue:

1. Para todos los puntos de muestreo  $(i, j, k) \in G_{D,C}$  hacer
  - a) Calcular la posición en el espacio del punto  $(i, j, k)$ . Dicha posición recibe el nombre de  $\mathbf{r}_{D,C,(i,j,k)}$  y representa al centro del blob elipsoidal.
  - b) Calcular el paralelepípedo definido por  $\mathbf{r}_D^1, \mathbf{r}_D^2$  que inscribe al blob elipsoidal
    - 1)  $\mathbf{r}_b = r(1, 1, 1)^t$  donde  $r$  es el radio del blob esférico
    - 2)  $\mathbf{r}_{D,b} = D\mathbf{r}_b$
    - 3)  $\mathbf{r}_{D,b}^{\max} = \text{máx} \left\{ (\mathbf{r}_{D,b})_x, (\mathbf{r}_{D,b})_y, (\mathbf{r}_{D,b})_z, \right\} (1, 1, 1)^t$
    - 4)  $\mathbf{r}_D^1 = \mathbf{r}_{D,(i,j,k)} - \mathbf{r}_{D,b}^{\max}$
    - 5)  $\mathbf{r}_D^2 = \mathbf{r}_{D,(i,j,k)} + \mathbf{r}_{D,b}^{\max}$
  - c) Para todo punto en el paralelepípedo ( $\{ \mathbf{r}_D = (m, n, o) \in G_V : \mathbf{r}_D^1 \leq \mathbf{r}_D \leq \mathbf{r}_D^2 \}$ ) hacer
    - 1) Calcular la distancia al centro del blob elipsoidal,  $\mathbf{d}_D = \mathbf{r}_D - \mathbf{r}_{D,(i,j,k)}$

- 2) Descomprimir dicha distancia,  $\mathbf{d} = D\mathbf{d}_D$
- 3) Calcular el valor de un blob esférico a esa distancia,  $p$  (ver sección 2.2.2).
- 4) Si  $\mathbf{r}_D$  está fuera de la celda unidad (ver sección 4.3) se debe introducir por el lado contrario al que se ha salido.
  - $a'$  Expresar las componentes (x,y) de  $\mathbf{r}_D$  en el sistema definido por  $\vec{a}/2$  y  $\vec{b}/2$ :  $\mathbf{s}_D = 2 \left( \vec{a}, \vec{b} \right)^{-1} H\mathbf{r}_D$
  - $b'$  Devolver dicha posición a la celda unidad,  $\mathbf{s}'_D = (\text{wrap}((s_D)_x, -1, 1), \text{wrap}((s_D)_y, -1, 1))$  donde
 
$$\text{wrap}(x, x_0, x_F) = \begin{cases} x - \left[ \frac{x-x_0}{(x_F-x_0)-1} \right] (x_F - x_0) & x \leq x_0 \\ x & x_0 \leq x \leq x_F \\ x - \left[ \frac{x-x_F}{(x_F-x_0)+1} \right] (x_F - x_0) & x_F \leq x \end{cases}$$
  - $c'$  Expresar la nueva posición en el sistema de coordenadas de  $G_V$ ,  $\mathbf{s}''_D = \frac{1}{2} \left( \vec{a}, \vec{b} \right) \mathbf{s}'_D$ .
  - $d'$  Construir la nueva posición tridimensional  $\mathbf{r}'_D = ((\mathbf{s}''_D)_x, (\mathbf{s}''_D)_y, (\mathbf{r}_D)_z)^t$
- 5) Sumar  $p$  ponderado por  $x'_{(i,j,k)}$  en el volumen de salida en el lugar indicado por  $\mathbf{r}'_D$ .

## 4.5. Protocolo de reconstrucción

En esta sección se proporciona una guía de los pasos a seguir para la reconstrucción tridimensional de cristales utilizando la etapa bidimensional anterior junto con la tridimensional propuesta para una serie de inclinación, es decir, en la distribución angular de las micrografías tan sólo se supone que varía el ángulo de inclinación. Cada micrografía tiene una dirección de proyección determinada por los tres ángulos de Euler  $(0, \theta, 0)$  (ver sección 2.1.2). La secuencia de pasos a realizar sería la siguiente:

1. Seleccionar una micrografía con 0 grados de inclinación
2. Determinar los vectores de red en el espacio de Fourier por medio del programa SPECTRA [130]. Al no estar inclinada la micrografía estos vectores de red coinciden con los del espacio tridimensional,  $\vec{a}^*$  y  $\vec{b}^*$ .



3. Calcular los vectores de red en el espacio real correspondientes por medio del programa LATTICE VECTORS de XMIPP [97].
4. Para cada micrografía hacer:
  - a) Seleccionar los vectores de red en el espacio de Fourier coherentes con  $\vec{a}^*$ ,  $\vec{b}^*$  y los ángulos  $(0, \theta, 0)$  por medio del programa LATTICE VECTORS de XMIPP. De este modo obtenemos  $\vec{a}_{\omega, \psi}^*$  y  $\vec{b}_{\omega, \psi}^*$ .
  - b) Utilizar el programa SPECTRA junto con los vectores obtenidos en el paso anterior para marcar los *spots* del cristal.
  - c) Realizar el filtrado y refinado del cristal con los programas de procesamiento de cristales del MRC [158, 30].
5. Calcular el origen de fases y factor de escala adecuados para todas las micrografías por medio del programa ORIGMERC del MRC
6. Generar las proyecciones ortogonalizadas correspondiente a cada micrografía utilizando el origen de fases, factor de escala y coeficientes  $b_{KL}$  proporcionados por el MRC. La dirección de proyección correspondiente será la especificada por  $(0, \theta, 0)$ . Este paso se realiza con el programa SPOTS2REALSPACE de XMIPP
7. Aplicar el algoritmo de reconstrucción tridimensional para cristales implementado por el programa ART de XMIPP.

# **Parte III**

## **Resultados**



# Capítulo 5

## Aplicación

En este capítulo se realiza la optimización de diversos factores relacionados con el protocolo de reconstrucción: el factor de relajación de ART (sección 5.1) demostrando su importancia en la supresión de artefactos en la reconstrucción de la hemoglobina gigante de la lombriz terrestre bajo condiciones de distribución no uniforme de proyecciones, el orden de presentación de las proyecciones al algoritmo de reconstrucción iterativo (sección 5.2), la región de soporte para la estimación espectral de potencia de la micrografía analizada (sección 5.3), el ajuste de información superficial obtenidas por sombreado metálico o microscopía de fuerzas atómicas a la reconstrucción de microscopía electrónica (sección 5.4), y el factor de relajación del algoritmo IDR para la restauración de la función de transferencia del microscopio (sección 5.5). Posteriormente se muestra un ejemplo (sección 5.6) de determinación de la CTF en una micrografía real tomada sin película de carbón como soporte ya que es éste el caso considerado como más complejo. A continuación se exponen los resultados obtenidos empleando el algoritmo y protocolo de reconstrucción propuesto en la tesis aplicados a la reconstrucción de partículas aisladas. Concretamente se muestran los resultados de la reconstrucción de un *phantom* sencillo similar a la policabeza del bacteriófago T4 (sección 5.7.1), la reconstrucción de un *phantom* más realista obtenido de la información atómica disponible para la bacteriorodopsina (sección 5.7.2) y la reconstrucción del antígeno de tumoricidad del virus SV40 a partir de datos experimentales de criomicroscopía (sección 5.7.3). La reconstrucción de un adenovirus también a partir de datos experimentales en la sección 5.8 muestra la posibilidad de introducir un alto número de elementos de simetría aumentando con ello la calidad de la reconstrucción. En cuanto a la reconstrucción de cristales, se demuestra la superioridad del algoritmo de reconstrucción propuesto en la tesis frente a los

clásicos en la reconstrucción de un *phantom* formado por impulsos cuando se dispone de un limitado número de vistas (sección 5.9.1). Por último, se realiza la reconstrucción de la policabeza del bacteriófago T4 a partir de datos experimentales de criomicroscopía (sección 5.9.2).

## 5.1. Optimización del factor de relajación

En esta sección haremos uso de toda la metodología de optimización expuesta en la sección 3.1.3. El objetivo es el de determinar el rango óptimo para el factor de relajación,  $\lambda$ , de ART para una distribución uniforme de proyecciones ocupando toda la esfera de proyección (ver sección 2.1.2). La metodología anterior nos permite realizar medidas independientes de la realización exacta del ruido, geometría de proyección y *phantom*. Sin embargo, deberemos estudiar la variación de dicho parámetro con variables como el tamaño del volumen a reconstruir, número de imágenes y su naturaleza (criomicroscopía o tinción negativa). Es posible que  $\lambda$  tenga una pequeña dependencia con el desenfoque empleado, sin embargo esta variable no ha sido considerada como tal sino que se ha aproximado por un par de filtros paso bajo a diferentes frecuencias.

La tabla 5.1 recoge los parámetros de reconstrucción empleados tanto en tinción negativa como criomicroscopía. Las combinaciones de tamaño y número de proyecciones se han elegido de tal forma que el número de ecuaciones por incógnita según el apartado 3.1.1 sea constante e igual a 50, 130 y 210 respectivamente.

Los *phantoms* han sido elegidos como los presentados en la figura 3.6 cuyos parámetros de definición de la familia vienen dados por

	Radio	Altura	Separación	Posición (X,Y,Z)	Densidad
Doble Cilindro 1	[5,10]	[3,5]	[3,6]	([9,11],[9,11],[-3,3])	1
Doble Cilindro 2	[5,10]	[3,5]	[3,6]	([9,11],[-9,-11],[-3,3])	1
Doble Cilindro 3	[5,10]	[3,5]	[3,6]	([-9,-11],[-9,-11],[-3,3])	1
Doble Cilindro 4	[5,10]	[3,5]	[3,6]	([-9,-11],[9,11],[-3,3])	1

En cuanto a la relación señal a ruido se han simulado condiciones de ruido similares a las obtenidas experimentalmente por ambas técnicas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la relación señal a ruido (SNR) varía con el *phantom* elegido puesto que varía su masa y por tanto la potencia de señal en la proyección, en particular encontramos una gran fuente de variación en el tamaño y realización

Geometría de proyección	Uniforme en la esfera
Blob y rejilla	orden=2 radio=2 $\alpha=10.4$ $g = \sqrt{2}$
Número de iteraciones	1
Tamaño y número de proyecciones	( 64, 773) ( 64,2010) ( 64,3246) ( 96,1153) ( 96,2999) ( 96,4844) (128,1533) (128,3988) (128,6443)
Filtrado paso bajo	40 % del espectro 100 % del espectro

Cuadro 5.1: Parámetros de reconstrucción empleados en el proceso de optimización del factor de relajación del algoritmo ART

concreta del *phantom*. El nivel de ruido adecuado a cada caso ha sido validado por experimentalistas encontrándose los siguientes valores como apropiados

Tamaño	Sin filtrar		Filtradas al 40 %	
	$\sigma_{\text{ruido}}^2$	Frec. digital corte	$\sigma_{\text{ruido}}^2$	Frec. digital corte
64	81	0.5	225	0.2
96	256	0.5	784	0.2
128	625	0.5	1008	0.2

Analizando *a posteriori* las relaciones señal a ruido resultantes debemos destacar los siguientes puntos:

- Si se efectúa un muestreo aleatorio de la familia de *phantoms* y se calcula la potencia asociada a imágenes de proyección de las diferentes realizaciones se obtiene que la potencia de dichas imágenes sigue una distribución normal logarítmica. En la siguiente tabla se recogen los niveles SNR asociados a cada una de los tamaños para el valor medio de dicha potencia y los dos percentiles 2.5 % y 97.5 %.

Tamaño	Sin filtrar		
	SNR(2.5 %)	SNR(media)	SNR(97.5 %)
64	0.061	0.123	0.300
96	0.052	0.103	0.250
128	0.040	0.089	0.251
Tamaño	Filtradas al 40 %		
	SNR(2.5 %)	SNR(media)	SNR(97.5 %)
64	0.055	0.110	0.270
96	0.043	0.085	0.203
128	0.035	0.078	0.222

- No existen diferencias significativas entre los valores de SNR de una y otra técnica por lo que aparentemente la principal diferencia entre las dos reside no tanto a nivel de relación señal a ruido sino a nivel de estructura de correlación del propio ruido.

Paso	Variables supervivientes
Inicial	$scL_2(V), scL_1(V), scL_{2w}, scL_{1w}, sc\mu(V), sc\Delta(V),$ $sc\rho, scinf, FSC,$ $scL_2(B), scL_1(B), sc\mu(B), sc\sigma(B), sc\Delta(B),$ $scL_2(F), scL_1(F), sc\mu(F), sc\sigma(F), sc\Delta(F),$ $hsvr, hsbr, hsm, hsd, drrt, dsbl, dsad$
Exactitud < 5 %	$scL_2(V), scL_1(V), scL_{2w}, scL_{1w}, sc\mu(V), sc\Delta(V),$ $scL_2(B), scL_1(B), sc\mu(B), sc\sigma(B), sc\Delta(B),$ $scL_2(F), scL_1(F), sc\mu(F), sc\sigma(F), sc\Delta(F),$ $hsdt, dsbl, dsad$
Correlación $\lambda > 0,15$	$scL_2(V), scL_1(V), scL_{2w}, scL_{1w}, sc\Delta(V),$ $scL_1(B), sc\mu(B), sc\sigma(B), sc\Delta(B),$ $scL_2(F), scL_1(F), sc\mu(F), sc\sigma(F), sc\Delta(F),$ $dsad$
Correlación entre variables < 0,95	$scL_2(V), scL_1(V),$ $scL_1(B), sc\mu(B), sc\sigma(B), sc\Delta(B),$ $scL_1(F), sc\sigma(F), sc\Delta(F),$ $dsad$

Cuadro 5.2: Selección de *FOMs*

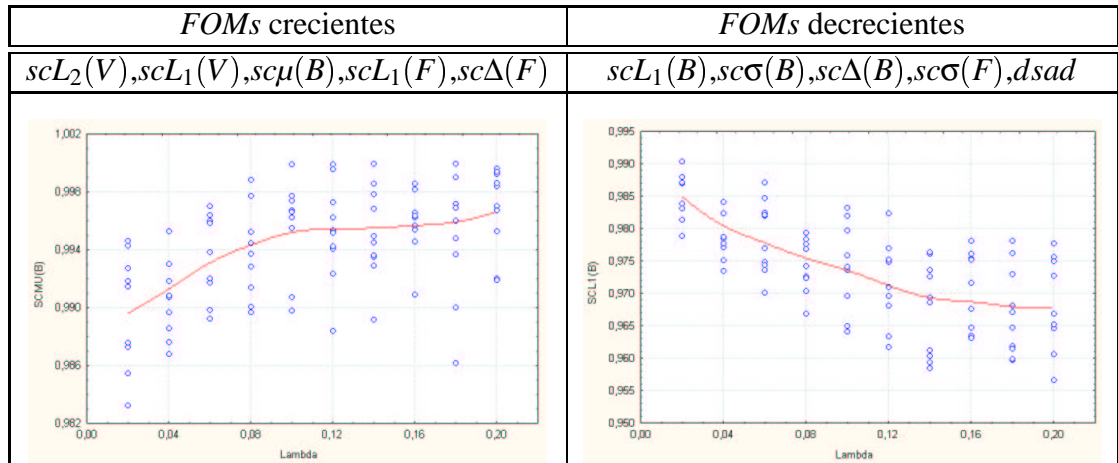
### 5.1.1. Optimización bajo unas condiciones concretas

A modo de ejemplo del proceso de optimización descrito en el apartado 3.1.6 optimizaremos  $\lambda \in (0, 2)$  para el caso de una geometría de recolección de 2000 proyecciones pseudo-equidistribuidas, trabajando con *phantoms* de tamaño  $64^3$  e imágenes no filtradas, es decir, una de las condiciones concretas de simulación expuestas en el apartado anterior.

Eliminamos aquellas variables que no alcancen una precisión mayor que  $r = 5\%$  con un nivel de confianza superior a  $\alpha = 0,95$  y estén correladas con  $\lambda$  menos de  $cth_\lambda = 0,15$ . Las clases de equivalencia estarán determinadas por un nivel de correlación superior a  $cth_{gr} = 0,95$ . La tabla 5.2 recoge el filtro correspondiente a los pasos 3.b, 3.c y 3.d.

Ahora podemos dividir las *FOMs* aún restantes en dos tendencias según la tabla 5.3, mientras que su descomposición en componentes principales se muestra en la tabla 5.4. Los parámetros de clasificación en tendencias han sido  $cth_{tendencia} = 0,4$ ,  $a = 5$ ,  $\lambda = 10$  y de selección de componentes principales  $th_{gr} = 0,85$ . Con estos datos, podemos construir *FOMs* combinadas como sigue





Cuadro 5.3: Tendencia de las *FOMs*

	<i>FOMs</i> crecientes	<i>FOMs</i> decrecientes
Factor 1	76 %	20 %
Factor 2	75 %	18 %

Cuadro 5.4: Peso de cada una de las componentes principales de cada grupo

$$creciente_{FOM} = 0,76creciente_{e_1} + 0,20creciente_{e_2}$$

$$decreciente_{FOM} = 0,75decreciente_{e_1} + 0,18decreciente_{e_2}$$

$$condensed_{FOM} = 0,96creciente_{FOM} + 0,93decreciente_{FOM}$$

cuyas gráficas se muestran en la figura 5.1. Analizando las diferencias entre las medias de  $creciente_{FOM}$  y  $decreciente_{FOM}$ , ya sea por medio de contrastes paramétricos cuando sean aplicables (t-Student) o no paramétricos (Kolmogorov-Smirnov), se puede determinar que la región óptima en este caso se encuentra entre  $\lambda = 0,06$  y  $\lambda = 0,12$ .

### 5.1.2. Variabilidad

Las regiones óptimas para cada una de las combinaciones de tamaño de imagen, número de imágenes y frecuencia de filtrado son representadas en la tabla 5.5. El método de optimización para un caso aislado es el propuesto en la sección 3.1.3 y ejemplificado en el apartado 5.1.1. Un estudio ANOVA sobre la misma revela que el filtrado aplicado al ruido aditivo a las imágenes es irrelevante para la

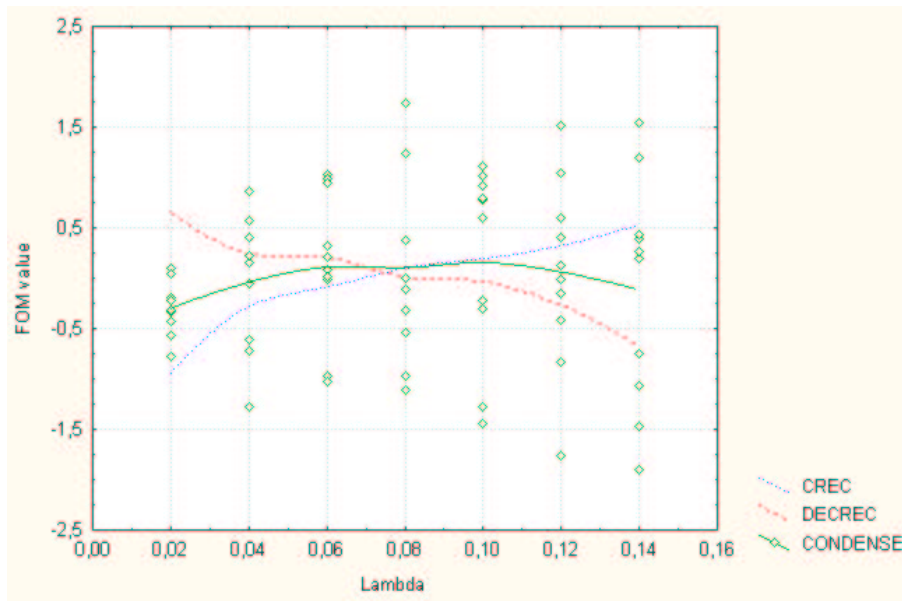


Figura 5.1: FOMs creciente, decreciente y condensada en el rango de interés

optimalidad del parámetro y una representación de isocurvas en el plano *Tamaño de las imágenes x Número de proyecciones*, ver figura 5.2, indica que en su mayor parte el factor de relajación es casi independiente del tamaño de la imagen.

Se han llevado a cabo estudios de regresión no lineal sobre los datos encontrados con el objetivo de proporcionar una guía de uso para el factor de relajación encontrándose los siguientes modelos para el límite superior del rango óptimo de dicho parámetro ( $N$  representa al número de proyecciones y  $S$  al tamaño en píxeles de las mismas)

Modelo	Formulación
Constante	0.74
$f(N)$	$-2,5224 + 2,7473N^{-0,00793}$
$f(N, S)$	$0,08780S^{-0,0095} - 0,0001N^{1,0033}$

Modelo	$R^2$	$SC(error)$	$gl(error)$	$SC(regresion)$	$gl(regresion)$
Constante	0	0.004716	18	0	0
$f(N)$	0.74	0.00115	16	0.003566	2
$f(N, S)$	0.82	0.000785	15	0.003931	3

Recuérdese (sección 3.1.7) que la estimación así calculada para la cota superior del intervalo óptimo para  $\lambda$  tiene un intervalo de confianza al nivel  $\alpha$  de radio

Tamaño (píxeles)	Número proyecciones	Filtrado paso bajo	$\lambda_{min}$	$\lambda_{max}$
65	773	100 %	0.06	0.08
65	2010	100 %	0.05	0.07
65	3246	100 %	0.03	0.05
97	1153	100 %	0.06	0.08
97	2999	100 %	0.05	0.07
97	4844	100 %	0.035	0.055
129	1533	100 %	0.04	0.02
129	3988	100 %	0.025	0.045
129	6443	100 %	0.015	0.03
65	773	40 %	0.05	0.07
65	2010	40 %	0.055	0.075
65	3246	40 %	0.03	0.05
97	1153	40 %	0.055	0.075
97	2999	40 %	0.05	0.07
97	4844	40 %	0.025	0.045
129	1533	40 %	0.05	0.07
129	3988	40 %	0.02	0.04
129	6443	40 %	0.015	0.035

Cuadro 5.5: Intervalos óptimos de  $\lambda$  en cada una de las combinaciones de tamaño de la imagen, número de imágenes y nivel de filtrado paso bajo

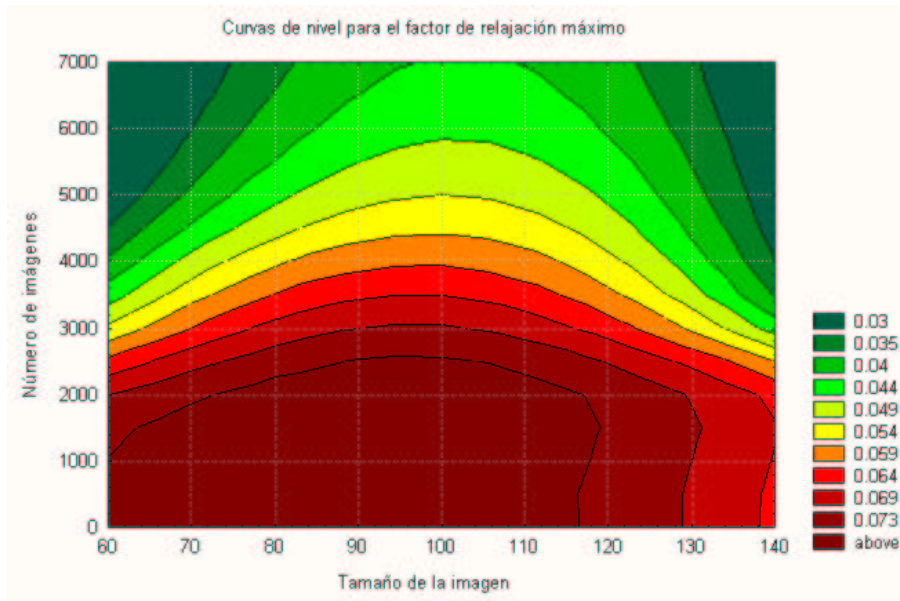


Figura 5.2: Isocurvas para el valor óptimo superior del factor de relajación de ART frente al número de proyecciones y tamaño de las mismas. La alta correlación existente (en torno a 0.99) entre el valor mínimo y máximo del rango óptimo de dicho factor permite trabajar con un único parámetro.

$z_{1-\alpha} \sqrt{\frac{SC(Error)}{gl(Error)} + \frac{SC(Regresion)}{gl(Regresion)}}$  donde  $z_{1-\alpha}$  es el valor de una distribución normal tal que  $Pr\{|z| \leq z_{1-\alpha}\} = 1 - \alpha$ .

### 5.1.3. Importancia de la optimización

La relevancia del paso anterior no queda en el ámbito puramente académico, se han publicado situaciones [13] en las que debido a una distribución no homogénea de las proyecciones (ver figura 5.3 y la sección 2.1.2) se pensaba que algunos algoritmos de reconstrucción, en concreto SIRT y WBP, elongaban el volumen reconstruido a lo largo del eje sobrecargado. La figura 5.4(a) muestra un ejemplo de dichas reconstrucciones, corresponde a la reconstrucción de la hemoglobina gigante de *Lombricus terrestris*. Es más, en [13] se proporciona una demostración matemática del motivo de dicha elongación y se propone descartar aquellas imágenes que se encuentran en una zona sobrecargada hasta conseguir una distribución angular uniforme.

No obstante, utilizando una técnica de determinación de parámetros simplifi-

cada de la propuesta en esta tesis (en vez de optimizar sobre una *FOM* combinada se elige  $scL_2(F)$  como *FOM* de entrenamiento, ver sección 3.1.3) se demuestra que tal efecto de elongación es un puro artefacto por no haber seleccionado los parámetros libres de los algoritmos de reconstrucción de forma adecuada. Escogiendo los parámetros libres de SIRT en la región señalada en la figura 5.5 se puede ejecutar una reconstrucción satisfactoria en la que se ha hecho uso de toda la información disponible. Es decir, la elección correcta de los parámetros libres del algoritmo de reconstrucción puede ser determinante en la consecución de un resultado correcto [137].

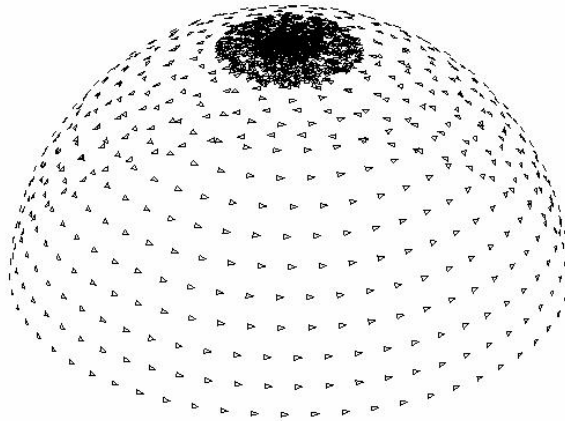
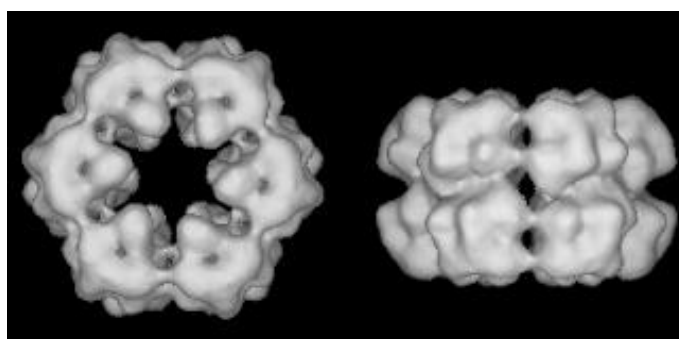


Figura 5.3: Distribución no homogénea de proyecciones. El 66 % de las proyecciones muestran una preferencia por el eje  $z$



(a)



(b)

Figura 5.4: Reconstrucción tridimensional elongada (a) y no elongada (b) de la hemoglobina gigante de *Lombricus terrestris*.

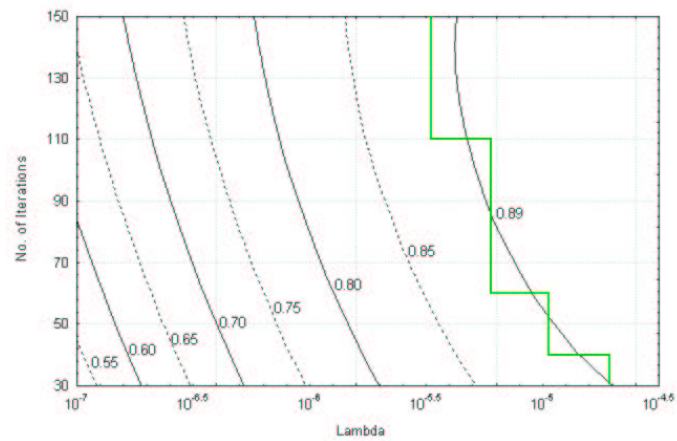


Figura 5.5: En SIRT los parámetros libres son el número de iteraciones y el factor de relajación. En esta gráfica se representa las isocurvas correspondientes a la figura de mérito de entrenamiento, y se remarca la región (de la línea verde a la derecha) de comportamiento estadísticamente no diferente del máximo.

## 5.2. Optimización de la ordenación de las proyecciones

Como en todo algoritmo iterativo, el resultado de ART es dependiente del orden de presentación de las distintas proyecciones. En el apartado 3.2 se define el criterio de ordenación seleccionado en esta tesis y en esta sección se estudia la influencia del parámetro  $L$ , longitud de la secuencia de ordenación, sobre las reconstrucciones obtenidas.

Para una elección apropiada de  $L$  se utiliza la metodología de optimización desarrollada en la sección 3.1 con unos parámetros de *phantom* idénticos a los empleados en la sección 5.1. La geometría de proyección corresponde a la de una distribución cuasi-uniforme con 2010 proyecciones para la que se había determinado una región de  $\lambda$  óptima entre 0.135 y 0.150. La variable dependiente pasa de ser el factor de relajación a la longitud de ventana  $L$  que ha sido variada entre los valores  $\{0, 1, 2, 3, 4, 5, N\}$  ( $L = 0$  implica un ordenamiento aleatorio y  $L = N$  representa la ortogonalidad con todas las proyecciones ya elegidas). De nuevo se detectan dos tendencias contrapuestas: una que favorece longitudes de ventana grandes y otra que muestra preferencia por las pequeñas. Entre las primeras se encuentran aquellas figuras de mérito asociadas a medidas globales y sobre el fondo, mientras que el segundo grupo está fundamentalmente representado por figuras de mérito relacionadas con la característica. Después de un análisis de componentes principales y una combinación adecuada se llega a la conclusión de que  $L = 2$  maximiza el comportamiento global del algoritmo de reconstrucción tal y como se muestra en la figura 5.6

Este resultado era previsible puesto que en un espacio tridimensional no puede haber más de tres vectores ortogonales entre sí. Además, la cantidad de información proporcionada por cada proyección respecto a las dos últimas (ortogonales entre sí) es máxima si a su vez la tercera proyección es ortogonal a las otras dos. Es un proceso similar al utilizado en dibujo técnico al trabajar con planta, alzado y perfil.

## 5.3. Optimización de los parámetros de estimación ARMA

En la sección 3.6 se expone detalladamente el proceso para determinar la función de transferencia de contraste del microscopio electrónico a partir de las



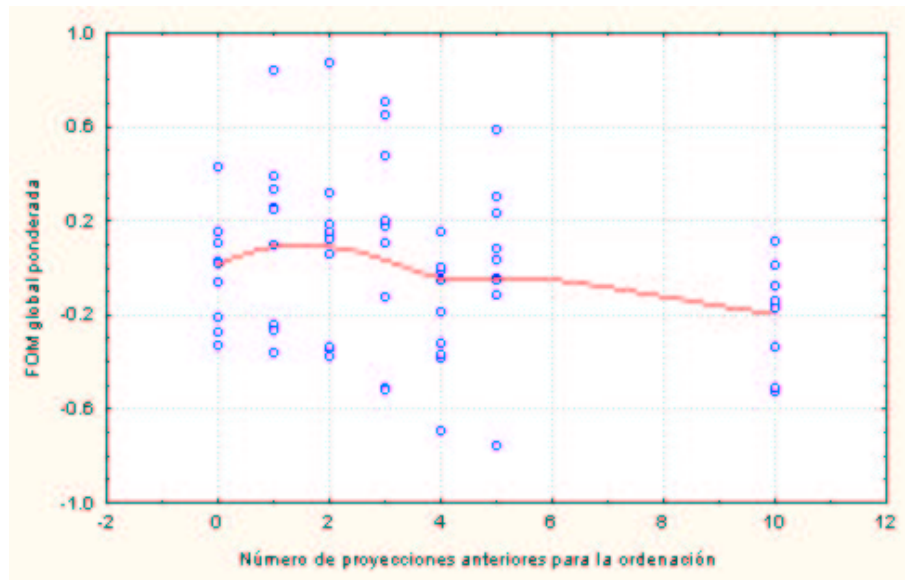


Figura 5.6: Figura de mérito combinada para el análisis de la longitud de ventana utilizada en el criterio de ortogonalidad. A efectos de representación se ha colocado  $L = N$  en  $L = 10$  aunque en realidad  $N = 2010$

imágenes experimentales. Dicho cálculo se basaba básicamente en dos pasos: primero, estimar por métodos paramétricos, ARMA, la función densidad espectral de potencia, y segundo, ajustar un modelo teórico con base física a la mencionada función. En este proceso los grados de libertad disponibles básicamente se reducen a la elección de la región de soporte para el modelo ARMA.

En identificación ciega de sistemas [73, 37, 89, 80, 79, 69, 23] se suelen utilizar criterios para la selección de estas regiones que minimizan una función que depende del propio modelo, estimando la capacidad predictiva del mismo más un término que expresa nuestro deseo de que el modelo tenga una longitud mínima. En este sentido se suelen seguir criterios de selección del orden de parámetros tales como el de información de Akaike (AIC), el del error final de predicción de Akaike (FPE) o el de la longitud mínima de descripción de Rissanen (MDL). Su utilidad reside precisamente en la posibilidad de seleccionar la mejor estructura paramétrica cuando se desconoce la forma del espectro a parametrizar. Sin embargo, no es éste el caso, en este estudio se conoce perfectamente el tipo de funciones a estimar por lo que por medio de simulaciones y una simple función de distancia puede seleccionarse la mejor región de soporte para cada una de las partes del modelo.

Para la elección de las regiones de soporte óptimas se ha seguido una metodología estadística similar a la empleada en la selección de los parámetros libres de un algoritmo de reconstrucción (ver sección 3.1.4). Se han elegido el tamaño de las imágenes de entrada y el parámetro de desenfoque de la CTF como aquellas variables de las que posiblemente dependan las regiones, supuestas cuadradas, óptimas. Se han elegido 2 niveles de desenfoque,  $\Delta f$ ,  $-10000\text{\AA}$  y  $-20000\text{\AA}$  e imágenes de tamaños,  $N$ , 512 y 1024 píxeles. Para cada combinación de niveles de estas dos variables se han analizado la combinación óptima de  $p$  (tamaño de la región cuadrada de soporte para AR) y  $q$  (tamaño de la región cuadrada de soporte para MA) por medio de una serie de 5 simulaciones. En cada simulación se genera aleatoriamente una imagen cuyo espectro coincide con el espectro objetivo y por medio de una función distancia se evalúa la bondad del ajuste entre ambos espectros. La referida función distancia pondera por una parte la norma L1 del error cometido en la región comprendida entre el primer y tercer cero ( $R_{1,3}$ ) entre la densidad espectral de potencia estimada por el modelo ARMA y la densidad espectral de potencia objetivo, y por otra la norma L1 del error entre estas dos funciones en el espacio de Fourier.

$$\begin{aligned}
 dist(\hat{S}^{ARMA}, S) &= \frac{1}{2} (dist_{L1}(\hat{S}^{ARMA}, S) + dist_{L1,TF}(\hat{S}^{ARMA}, S)) \\
 dist_{L1}(\hat{S}^{ARMA}, S) &= \sum_{\mathbf{R} \in R_{1,3}} |\hat{S}^{ARMA}(\mathbf{R}) - S(\mathbf{R})| \\
 dist_{L1,TF}(\hat{S}^{ARMA}, S) &= \sum_{\mathbf{r}} \left| |\mathcal{TF}\{\hat{S}^{ARMA}\}(\mathbf{r})| - |\mathcal{TF}\{S\}(\mathbf{r})| \right|
 \end{aligned} \tag{5.1}$$

Aplicando la metodología de optimización bidimensional de parámetros propuesta en la sección 3.1.6 se pueden determinar las mejores combinaciones ( $p, q$ ) para cada selección concreta de niveles de las variables independientes. Por último, un análisis ANOVA y de regresión sobre los resultados similar al realizado en la sección 3.1.7 nos lleva a las siguientes conclusiones:

- El error cometido en cada imagen es dependiente del tamaño de la imagen, el desenfoque, el soporte ARMA e interacciones de primer orden entre estas variables.
- Cuando se estudian las regiones máximas, los valores pertenecientes a estas regiones son bastante independientes del desenfoque y el tamaño de imagen como demuestran los bajos coeficientes de regresión de los órdenes de los modelos AR y MA con las variables desenfoque y tamaño de la imagen, así como el análisis ANOVA realizado.

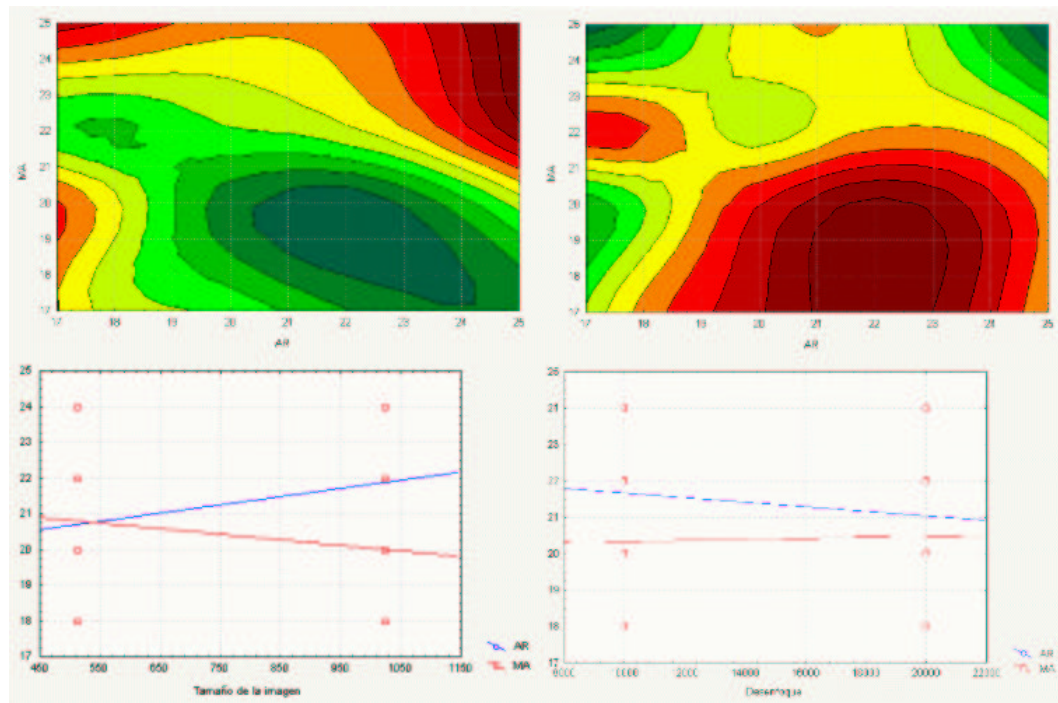


Figura 5.7: De izquierda a derecha y de arriba a abajo: representación de contornos del error cometido con el soporte determinado por los ejes AR y MA, colores más claros representan menor error; representación de contornos de la densidad de modelos óptimos, colores más oscuros indican una mayor presencia de modelos óptimos; dependencia de la anchura de la región de soporte AR y MA con el tamaño de la imagen; y con el desenfoco.

De lo anterior se colige que el orden óptimo del modelo ARMA es más dependiente de otros factores que de aquellos que habitualmente más suelen variar en microscopía electrónica. A modo de regla para elegir dicho soporte podemos emplear las regresiones con las dos variables estudiadas, el valor entre paréntesis representa el coeficiente de correlación de Pearson:

$$\begin{aligned} \hat{p} &= 20,00 + 0,26N + 0,00\Delta f \quad (R = 0,295) \\ \hat{q} &= 21,60 - 0,19N + 0,00\Delta f \quad (R = 0,186) \end{aligned} \quad (5.2)$$

La figura 5.7 muestra la distribución de errores, la densidad de modelos óptimos, y la variación del soporte de los modelos AR y MA con las dos variables estudiadas.

## 5.4. Optimización de las restricciones de superficie

En la sección 3.5.4 se planteó la posibilidad de que debido a la discretización del volumen a reconstruir pudiera darse el caso de que la mejor restricción de superficie no fuese la que se ajusta perfectamente al volumen reconstruido sino que hiciera falta dilatarla ligeramente para permitir que los blobs, funciones bases de la expansión en serie del volumen reconstruido, tuviesen una transición más suave entre el interior y el exterior de la macromolécula. En este apartado se estudia el grado de dilatación que debe tener la superficie conocida para la obtención de unos resultados óptimos. Se tomaron 1114 proyecciones sin ruido equidistribuidas en el espacio de proyección de un phantom a nivel atómico de la bacteriorodopsina [63, 22, 58]. Se calculó la superficie al 100 % de la masa y se fue dilatando por morfología matemática progresivamente.

Los resultados se muestran en la figura 5.8, e indican que la mejor posición para la superficie es aquella que se ajusta perfectamente al volumen.

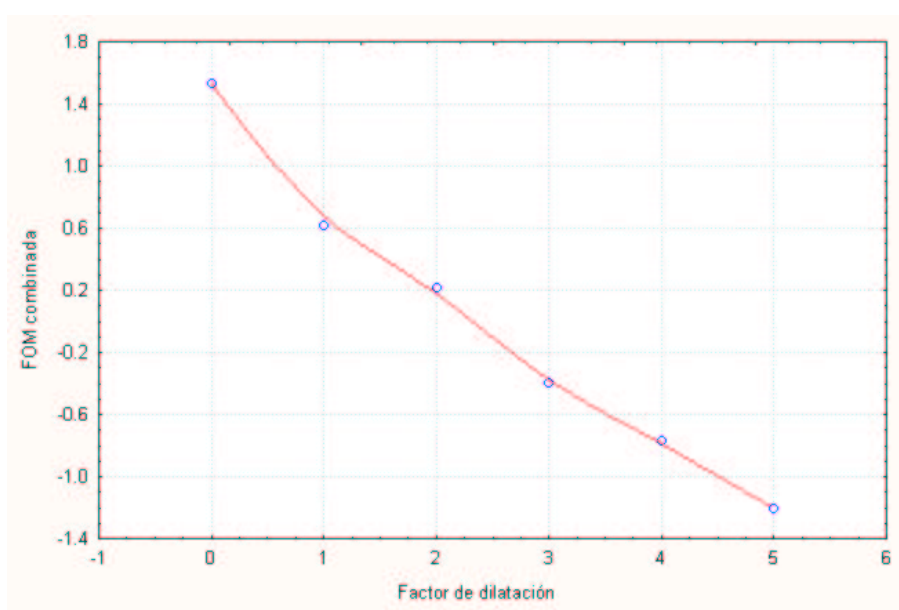


Figura 5.8: Determinación de la distancia óptima de la superficie al volumen

En el caso de disponer de superficies obtenidas por microscopía de fuerzas atómicas debemos estudiar la altura relativa de dicha superficie así como su posición exacta dentro del volumen ya que esta técnica no proporciona esta información. En la sección 3.5.4 se plantearon tres métodos de ajuste de superficies a

volúmenes: correlación de proyecciones parciales, correlación volumétrica y alineación de normales.

El primero y el segundo de los métodos asumen que el volumen a reconstruir comprendido entre las dos superficies tiene una densidad constante. Sin embargo, aunque ambos métodos detectan bien el momento en que la superficie se introduce dentro del volumen, el primero de ellos no es capaz de ajustar perfectamente la superficie al volumen puesto que su funcional se basa en la correlación con una proyección de dicho volumen y asumiendo que fuera del volumen encontremos valores bajos, como suele ser habitual, estaríamos sumando números pequeños y por tanto su correlación no varía significativamente. Este hecho se ha mostrado en la figura 5.9 en la que se marcan aquellos valores que se encuentran dentro de un 3 % del máximo de correlación (en esta figura ya se han ajustado el resto de los parámetros de  $\theta$ ). Se puede verificar que el primero de los métodos es mucho menos preciso que el segundo.

Respecto al ajuste de gradientes, se ha comprobado que es válida para volúmenes no ruidosos y relativamente bien definidos en contraposición a volúmenes con alto nivel de ruido o que bordes suaves como suele ser el caso de una reconstrucción tridimensional con cono perdido. La figura 5.10 muestra esta última situación.

## 5.5. Optimización del factor de relajación de IDR

En la sección 3.6.3 se expone el método de corrección de CTF conocido como IDR. En dicho método nos encontramos con un factor de relajación de valor altamente dependiente de la aplicación [67] por lo que en este apartado optimizamos su valor. El procedimiento de optimización es el descrito en la sección 3.1.3 y los parámetros de simulación son muy similares a los empleados en la optimización del factor de relajación de ART (ver tabla 5.1 en la sección 5.1) salvo que no se ha sometido el algoritmo a un estudio de variabilidad frente al número de proyecciones ni tamaño de las mismas sino que se han fijado estos parámetros en 2010 proyecciones de 64x64 píxeles. En la simulación de la CTF se han usado parámetros con significado real en microscopía electrónica utilizando el algoritmo de estimación de parámetros de CTF desarrollado a lo largo de la sección 3.6.1. Dichos parámetros han sido: una tensión de 100kV, 5.5 mm. de aberración esférica, 6.1 mm. de aberración cromática, 9.9 eV de coherencia temporal, 0.2 mrad. de apertura angular de la lente, 80Å de desplazamiento longitudinal,  $Q_0 = 0,36$  y -10000Å de desenfoque.

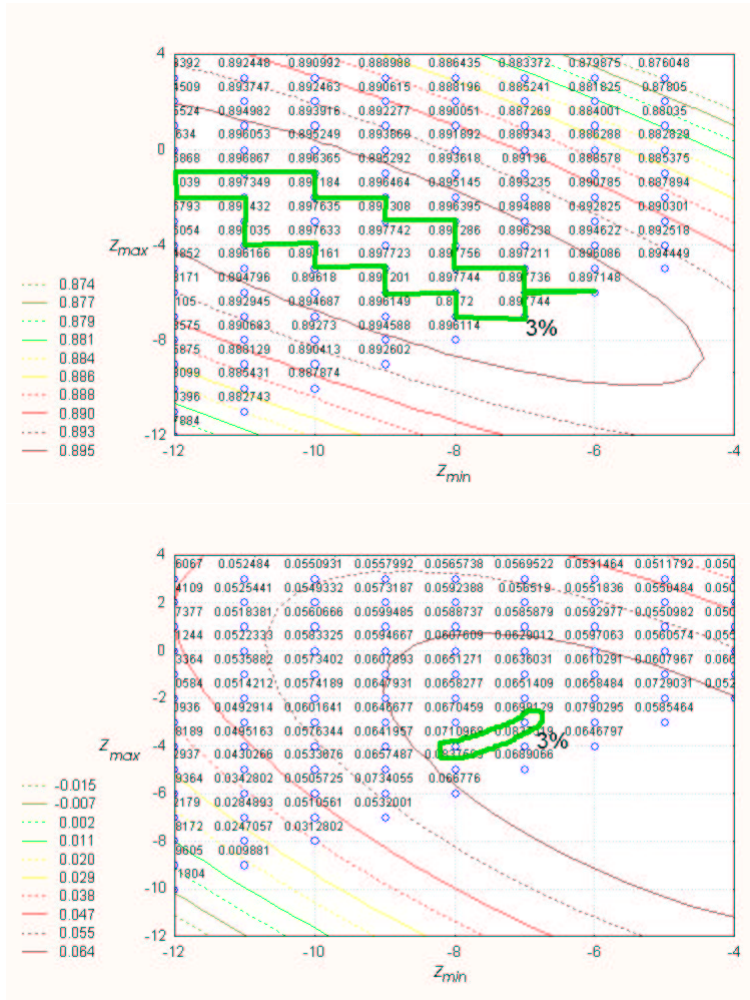


Figura 5.9: Comparativa de las distribuciones de la correlación bidimensional frente a la tridimensional. Se ha recuadrado el área en el que los valores han perdido menos de un 3 % del valor máximo encontrado.

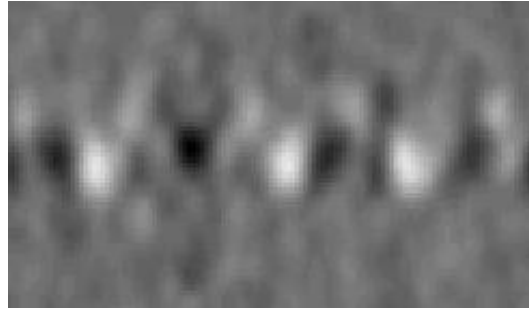


Figura 5.10: Corte de una reconstrucción del cristal de la policabeza del bacteriófago T4 en el que hay un cono perdido cuyo eje es paralelo al plano de corte.

En este caso se han hallado cuatro tendencias para  $\mu$  independientes del filtrado paso bajo aplicado al ruido aditivo. Las mencionadas tendencias se encuentran representadas en la figura 5.11 y muestran que el comportamiento óptimo de IDR se obtiene en el contexto de la microscopía electrónica para un valor del factor de relajación entre 1.8 y 2.0.

## 5.6. Determinación de la CTF

La determinación de la función de transferencia de contraste sigue siendo un tema abierto en el campo, no tanto por la falta de un modelo teórico -lo cual es cierto para las bajas frecuencias- sino por el bajo contraste y alto nivel de ruido presente en las imágenes. Dentro de este marco las imágenes en las que no se utiliza ninguna película de carbón (ver figura 1.4) [14, 31] están consideradas como las que más dificultad presentan a la hora de determinar la función de transferencia del microscopio. Es por este motivo que en la presente sección se ejemplifica la aplicación de los contenidos desarrollados en el capítulo 3 con este tipo de imágenes, aunque dichos algoritmos han sido aplicados con éxito en el cálculo de funciones de transferencia en criomicroscopía y tinción negativa.

La aproximación más extendida actualmente en el campo es la de estimar la función de transferencia por medio de un promediado de periodogramas. En [43] se comprueba experimentalmente que la longitud óptima de los periodogramas es de 128 muestras con un solapamiento de longitud 64. Por otra parte, en la sección 5.3 se ha demostrado que una longitud de ventana de 20x24 es aproximadamente óptima para un amplio rango de imágenes. La figura 5.12 muestra los espectros de amplitud de un promediado de periodogramas con los parámetros mencionados y

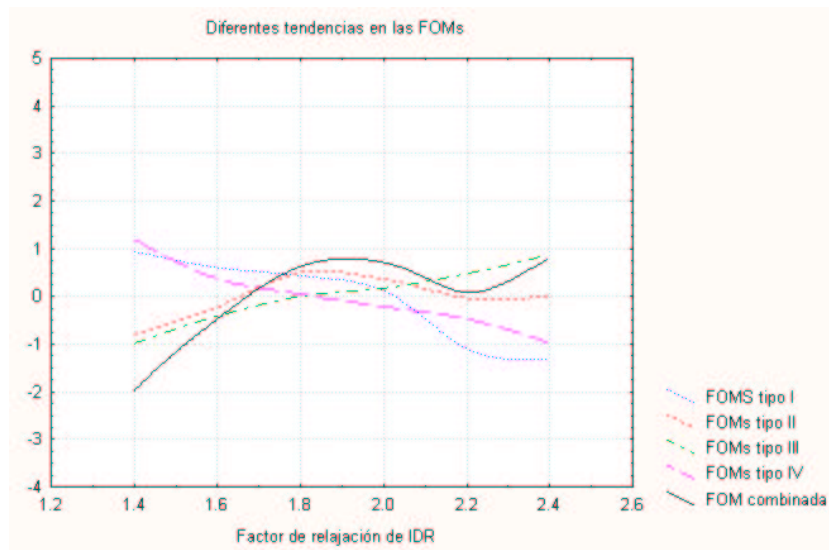


Figura 5.11: Diferentes tendencias de las FOMs frente al parámetro de relajación de IDR. Dichas tendencias son combinadas en una única figura de mérito que es optimizada siguiendo un criterio estadístico. No se muestran en esta gráfica los valores específicos de cada muestra.

de la estimación ARMA propuesta en esta tesis (secciones 3.6.1 y 5.3). La figura 5.13 representa un perfil a lo largo del eje  $Y$  y un promediado radial de dichos espectros -aunque en este caso hay que ser especialmente cuidadoso en la interpretación de este promediado puesto que la imagen es ligeramente astigmática-, junto a ellos aparecen los perfiles correspondientes al ajuste teórico al modelo ARMA. Por último, la figura 5.14 muestra el espectro de amplitud del modelo teórico calculado para la micrografía sin película de carbón. Como se puede comprobar se ha conseguido un buen ajuste de la función de transferencia incluso en las condiciones consideradas como más desfavorables.



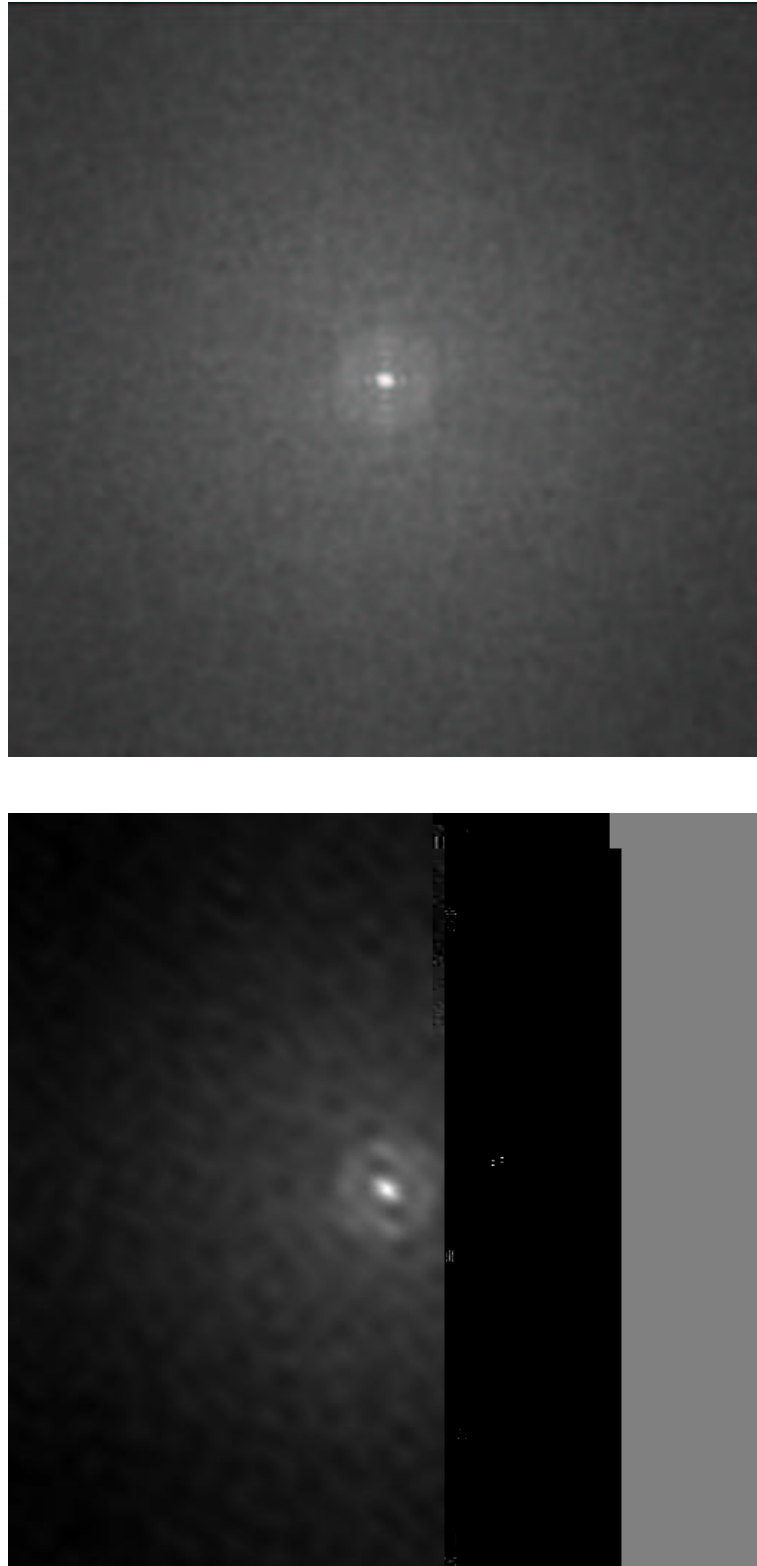


Figura 5.12: Arriba: Espectro de amplitud de la estimación por promediado de periodogramas. Abajo: Espectro de amplitud de la estimación por modelado paramétrico ARMA.

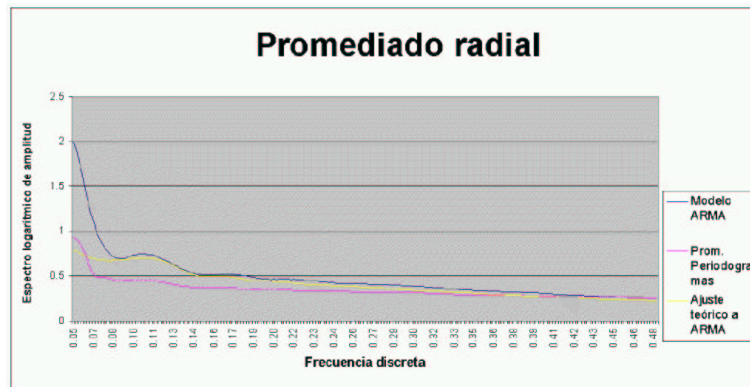


Figura 5.13: Arriba: Perfil en el eje Y de la estimación por promediado de periodogramas, modelo ARMA y ajuste teórico al modelo ARMA. Abajo: Promediado radial de los tres espectros.

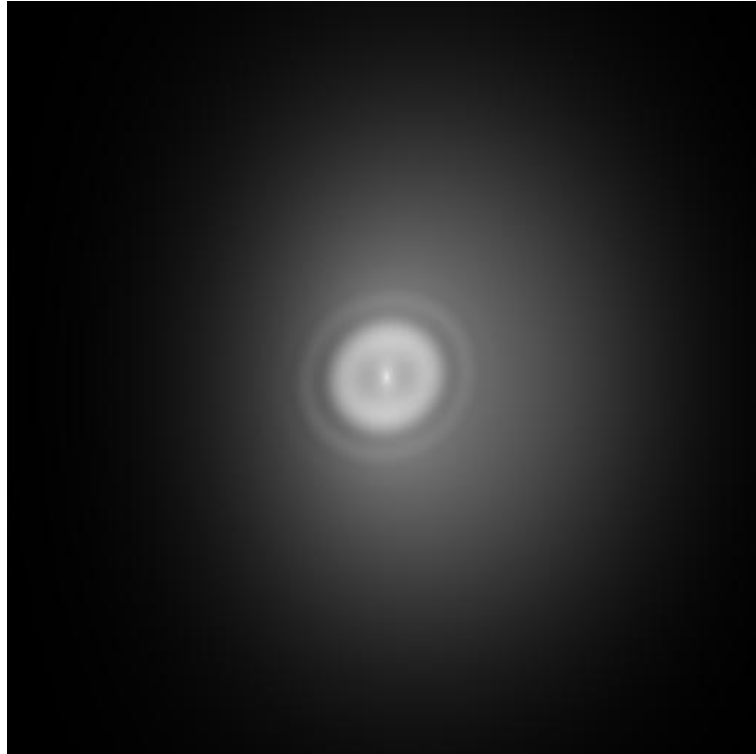


Figura 5.14: Espectro de amplitud del modelo teórico calculado para la micrografía sin película de carbón a partir del modelo ARMA.

## 5.7. Reconstrucción de partículas individuales

En esta sección se incluyen tres ejemplos de reconstrucción en los que se ha hecho uso de las técnicas para reconstrucción de partículas individuales desarrolladas en esta tesis. Las dos primeras reconstrucciones corresponden a datos simulados utilizando dos *phantoms* con grados de complejidad distintos. El primero es un volumen binario similar a la policabeza del bacteriófago T4 [34], este volumen se ha descrito a nivel de elementos geométricos sencillos tales como elipsoides y esferas. El segundo de los *phantoms* se ha tomado de la base de datos PQS y representa un trímero de una proteína denominada bacteriorodopsina [63, 22, 58]. Para esta proteína se conoce con exactitud la posición de cada uno de sus átomos integrantes. En cuanto a la tercera reconstrucción se han tomado datos reales de microscopía electrónica del doble hexámero del antígeno T de SV40 [100, 148].

### 5.7.1. Reconstrucción de un phantom sencillo

Éste es el caso aplicado más sencillo de los tres de partículas aisladas propuesto. En él se ha utilizado un phantom binario parecido a la policabeza del bacteriófago T4 [34] creado a partir de esferas y elipsoides orientados en el espacio. La figura 5.16(a) nos muestra la galería de secciones a lo largo del eje  $r_z$  mientras que la figura 5.16(b) representa algunas renderizaciones del mismo.

Para realizar esta simulación se han tomado 500 proyecciones con una geometría cónica aleatoria de ángulo de inclinación  $60^\circ$  (ver sección 2.1.2). El ruido de desplazamiento angular se distribuye como una variable normal de media 0 y desviación  $5^\circ$ , y el traslacional lo hace como otra variable normal de media 0 y desviación 2 píxeles. La relación señal a ruido simulada es de 0.33. La función de transferencia de contraste simulada ha sido la siguiente: período de muestreo  $3.5 \text{ \AA}/\text{píxel}$ , 100 kV de diferencia de potencial en el microscopio, imagen ligeramente astigmática con desenfoque en uno de los ejes  $-19807 \text{ \AA}$ , en el otro  $-20919 \text{ \AA}$ , y el primero de los ejes forma un ángulo de  $5.70^\circ$  con el eje  $r_x$  de la imagen, 5.5 mm de aberración esférica, 4.86 mm de aberración cromática, una coherencia temporal de 13.65 eV, estabilidad de la lente 0 ppm, desplazamiento longitudinal  $93.72 \text{ \AA}$  y un desplazamiento transversal de  $0.0035 \text{ \AA}$ . Estos valores han sido estimados a partir de una criomicrografía real ya que es en estas condiciones cuando existe una mayor dificultad en la reconstrucción. Sin embargo, no debe entenderse que éstos son los parámetros característicos del microscopio sino que esta combinación de parámetros produce una función de transferencia similar a la producida por el microscopio con sus propios parámetros. La figura 5.17 muestra el espectro de

amplitud de la CTF y la 5.15 representa una galería de imágenes de proyección empleada para este experimento.

Durante esta reconstrucción se han empleado todas las técnicas descritas a lo largo de la tesis, en concreto se ha seguido el protocolo especificado en la sección 3.7 en el que se han incluido restricciones de simetría, superficie (calculada sobre la información reconstruida por técnicas de procesamiento de imagen no lineales y no haciendo uso del phantom original), volumen (calculada sobre el phantom original como sería el caso de un experimento bioquímico), y positividad además de las correcciones de amplitud y fase de la función de transferencia descritos en el capítulo 3. Al final de cada iteración de refinamiento angular y reconstrucción el volumen es limpiado aplicando nuevamente simetría, filtros paso bajo sintonizados a la frecuencia de corte proporcionada por el segundo cero de la CTF y máscaras binarias obtenidas por morfología matemática. Adicionalmente y dado el carácter binario del phantom, análogo al obtenido por tinción negativa en microscopía electrónica real, en cada iteración de la reconstrucción, el volumen además de ser limpiado por las técnicas ya mencionadas ha sido promediado en su interior de manera que la solución inicial al siguiente paso de reconstrucción vuelve a ser binaria. El algoritmo de reconstrucción empleado ha sido ART+blobs, los parámetros del blob y el grid se han calculado conforme a la sección 3.1.2 y el factor de relajación del algoritmo de acuerdo con la sección 5.1. Las proyecciones son introducidas de forma que se maximice la ortogonalidad con respecto a las dos últimas proyecciones introducidas según se demuestra en la sección 5.2.

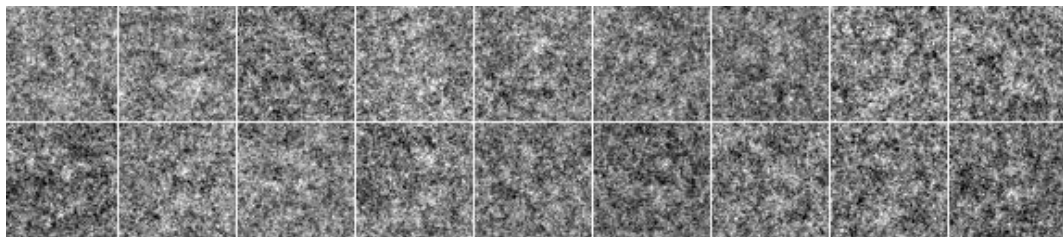


Figura 5.15: Galería de imágenes de proyección simuladas para el phantom de la policabeza del bacteriófago T4.

Como experimento de control de la mejora de la calidad se ha realizado una reconstrucción con el standard *de facto* en el campo, Weighted Backprojection, en este caso al no corregir la CTF se suele filtrar el resultado paso bajo a la frecuencia del primer cero de la CTF.

La figura 5.18 muestra los cortes verticales de ambas reconstrucciones y la figura 5.19 muestra diferentes renderizaciones al 100 % de la masa en las que no se

ha postprocesado el resultado con el objetivo de mostrar los diferentes artefactos producidos por uno y otro algoritmo.

En cuanto a una comparación numérica de los resultados obtenidos calculamos todas las figuras de mérito definidas para phantoms en niveles de densidad. La tabla a continuación muestra tal comparativa mientras que la figura 5.20 representa la resolución alcanzada por ambos algoritmos siendo ésta la medida *standard* en el campo de la calidad de una reconstrucción. En esta gráfica se observa que el punto de corte detectado por el algoritmo, 0.178242, es una medida conservadora y que si tenemos en cuenta el rebote que se produce después, la resolución subiría hasta 0.205. Las anteriores frecuencias están expresadas en frecuencias digitales pero teniendo en cuenta el periodo de muestreo utilizado en esta simulación tendríamos que WBP alcanza una resolución en torno a  $32\text{\AA}$  mientras que el algoritmo propuesto en la presente tesis llegaría hasta  $19.6\text{\AA}$  ó  $17\text{\AA}$ , lo que supone una mejora entre  $12.5\text{\AA}$  y  $15\text{\AA}$ .

Figura de Mérito	WBP	Algoritmo propuesto
$scL2(V)$	0.974053	0.974627
$scL1(V)$	0.897361	0.900430
$sc\Delta(V)$	-0.193474	0.440523
$sc\rho$	0.657371	0.713479
$scinf$	1.643107	1.624149
$scrt$	0.941362	0.933824
$\omega_{crit}$	0.109252	0.178242

Comparación a nivel de figuras de mérito de ambas reconstrucciones

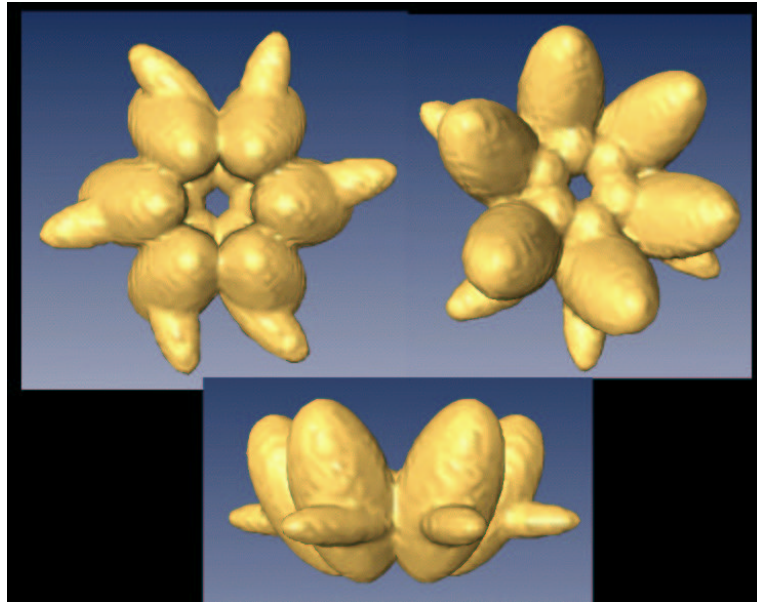
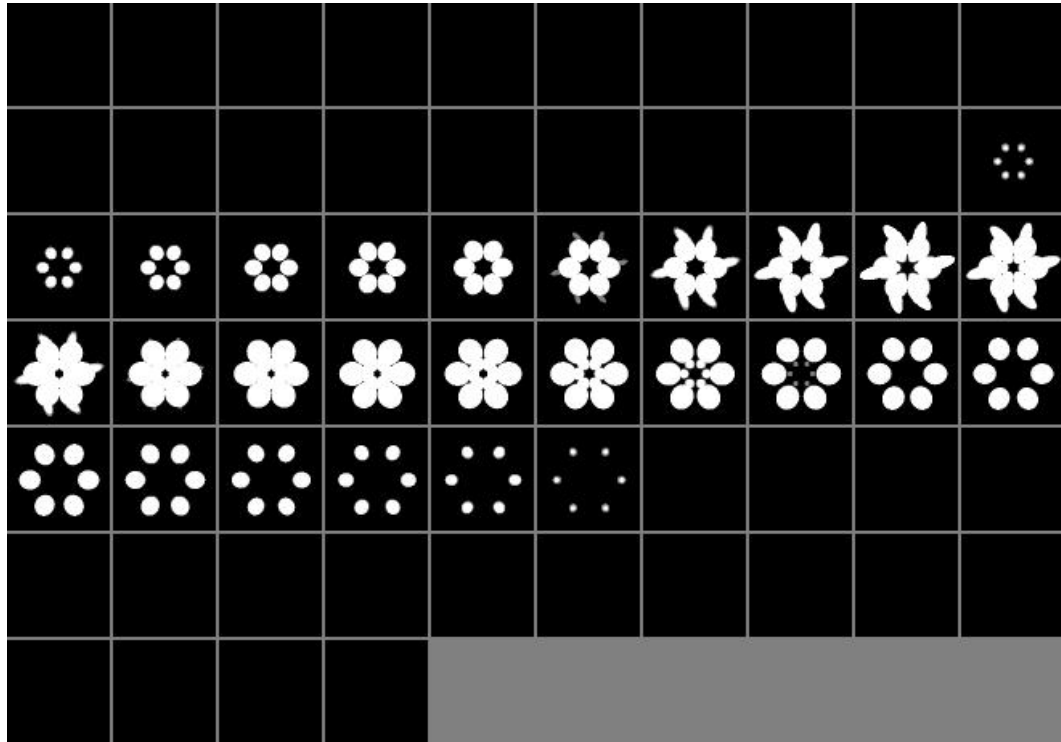


Figura 5.16: 5.16(a) Secciones verticales del phantom binario de la policabeza del bacteriófago T4. 5.16(b) Renderizados del mismo phantom en distintas orientaciones.

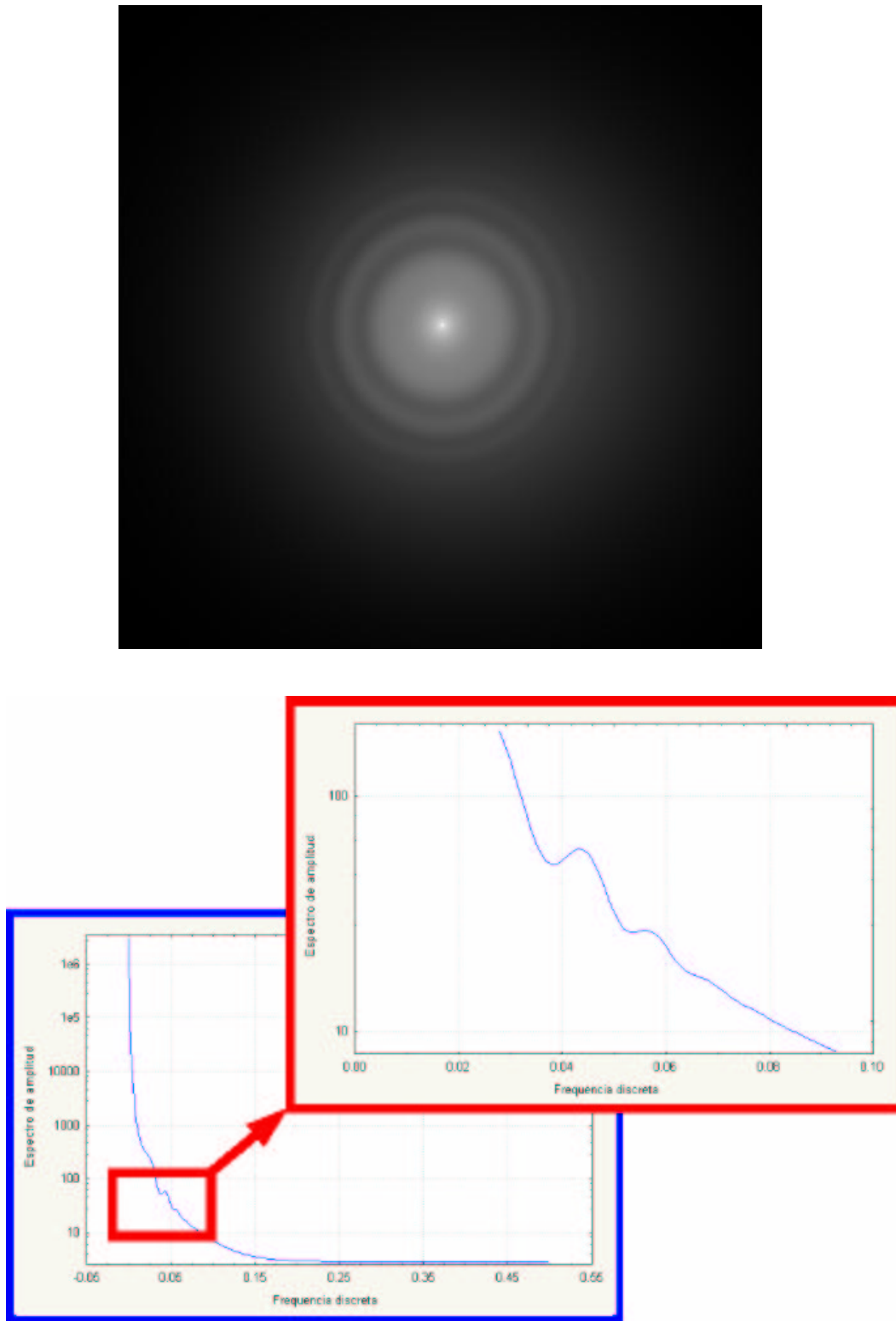


Figura 5.17: Arriba: Amplitud de la CTF utilizada en la simulación, las condiciones empleadas son similares a las de criomicroscopía. Abajo: Corte transversal por el eje X de la CTF, nótese que el nivel de fondo es mucho mayor que la CTF teórica determinada en la sección 3.6



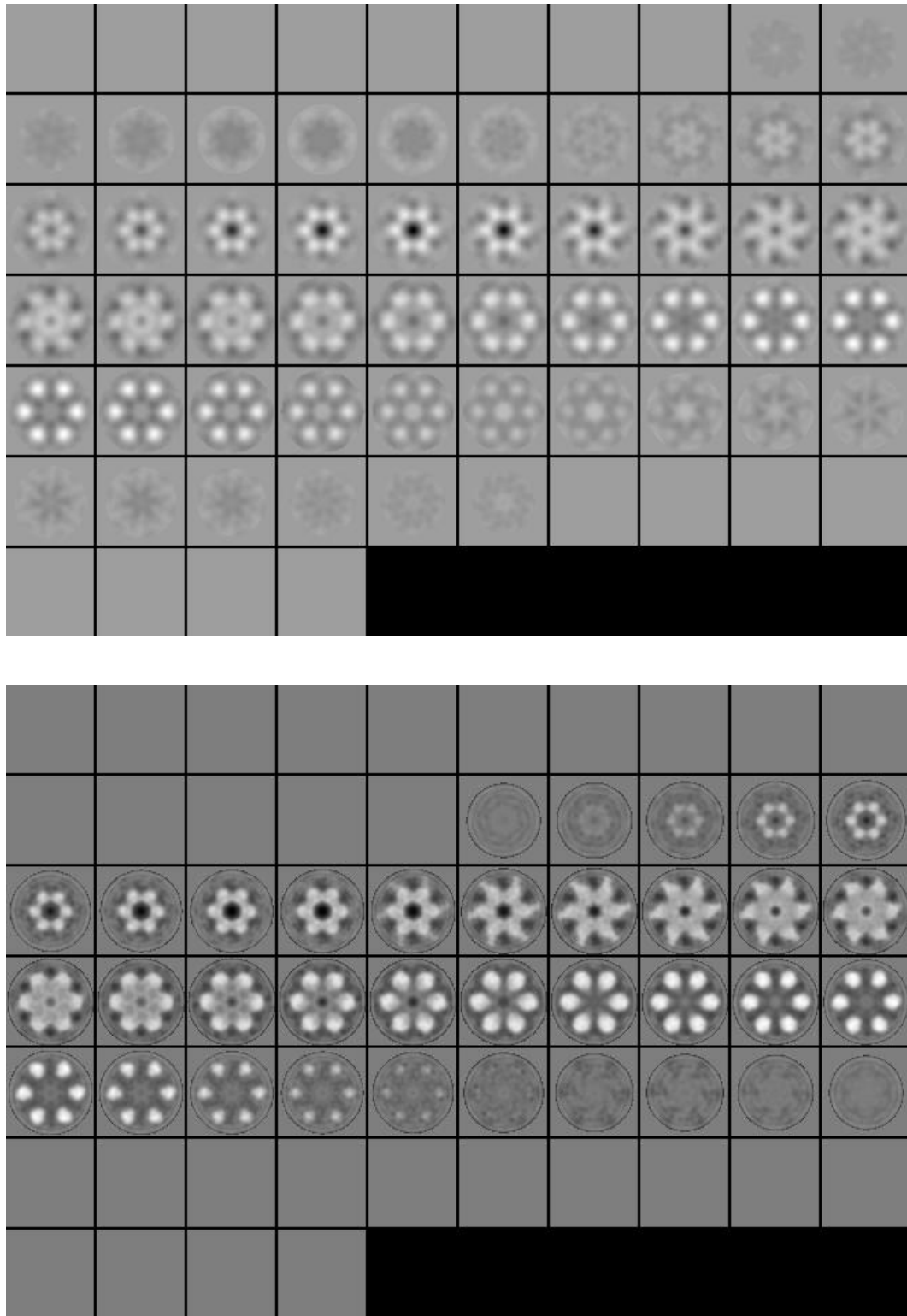


Figura 5.18: Cortes a lo largo del eje Z de las reconstrucciones obtenidas por WBP (arriba) y el algoritmo propuesto en la tesis (abajo)

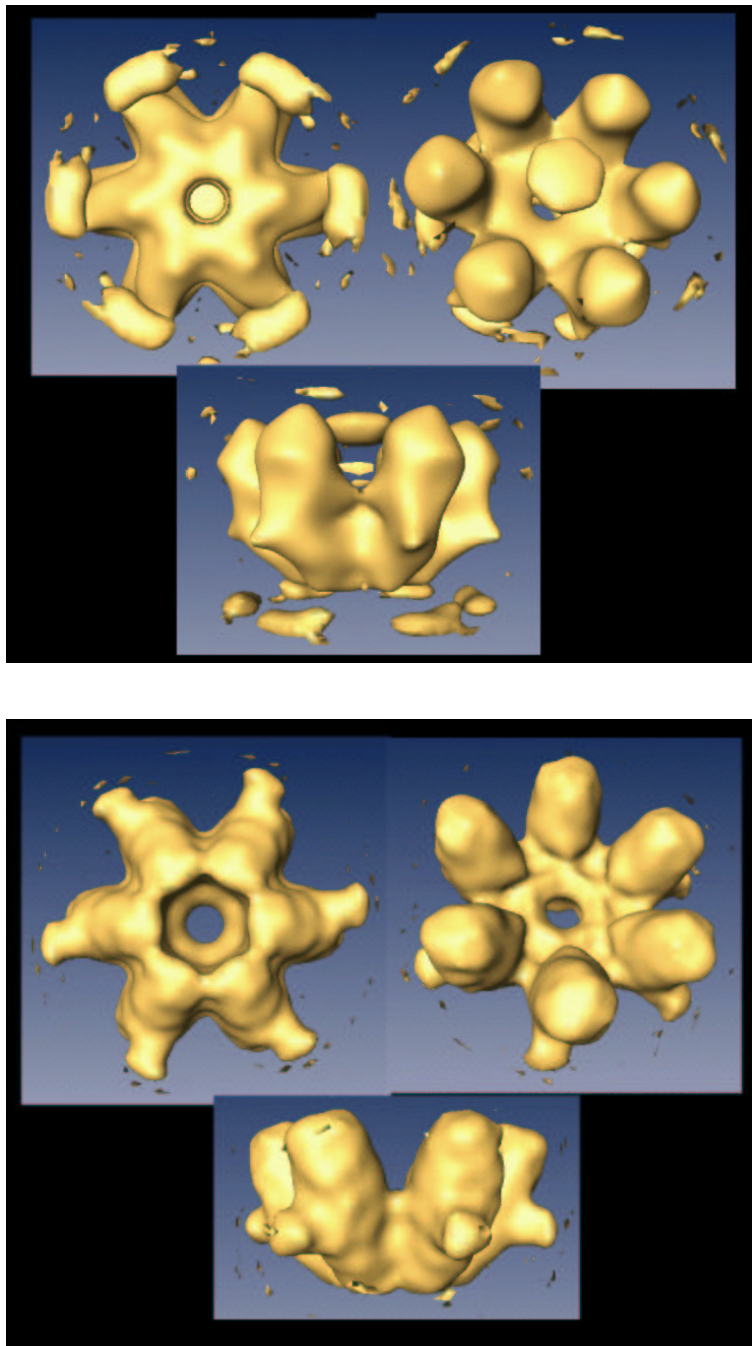


Figura 5.19: Renderizaciones de las reconstrucciones del phantom de la policaabeza del bacteriófago T4 obtenidas por WBP (arriba) y el algoritmo propuesto en la tesis (abajo)

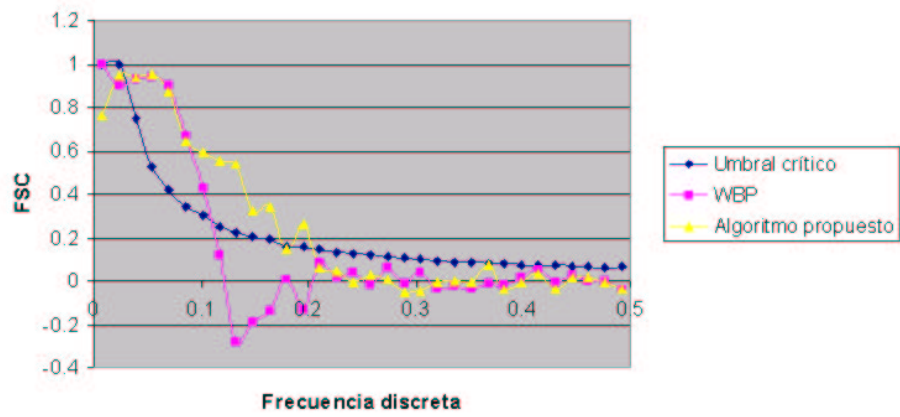


Figura 5.20: Medida de la resolución alcanzada por ambas reconstrucciones

### 5.7.2. Reconstrucción de un *phantom* realista

El segundo ejemplo de reconstrucción de esta memoria está constituido por un trímero de bacteriorodopsina, una proteína de membrana fotoreceptora procedente de *Halobacterium Halobium* [63, 22, 58]. Esta proteína ha sido resuelta a nivel atómico por cristalografía y se conoce con exactitud la posición de sus átomos en el espacio. Esta información se encuentra en la base de datos PDB para el monómero y en PQS para el trímero. Este *phantom* posee información de mayor frecuencia que el ejemplo anterior y representa una situación más cercana a criomicroscopía ya que proporciona información sobre el interior de la partícula.

Las condiciones de simulación son idénticas a las expuestas en el apartado anterior. Las figuras 5.21, 5.22, 5.23 muestran el conjunto de secciones a lo largo del eje vertical junto con una representación de isosuperficie que engloba al 100 % de la masa para el *phantom*, la reconstrucción proporcionada por WBP y la reconstrucción proporcionada por el algoritmo propuesto en la tesis.

Las diferencias entre ambas reconstrucciones son importantes como se puede apreciar por inspección sobre las figuras. Es de notar que las hélices  $\alpha$  presentes en el *phantom* de bacteriorodopsina se empiezan a intuir en la reconstrucción realizada con el algoritmo propuesto mientras que son inapreciables en la reconstrucción de WBP.

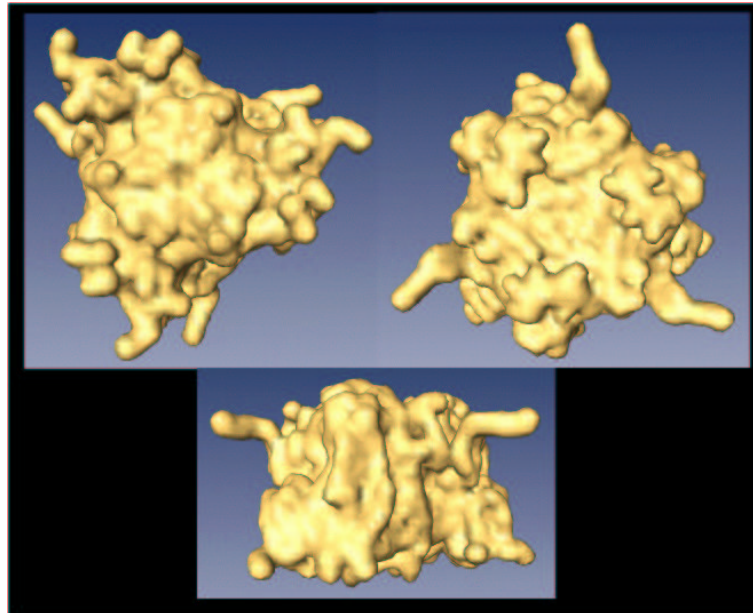
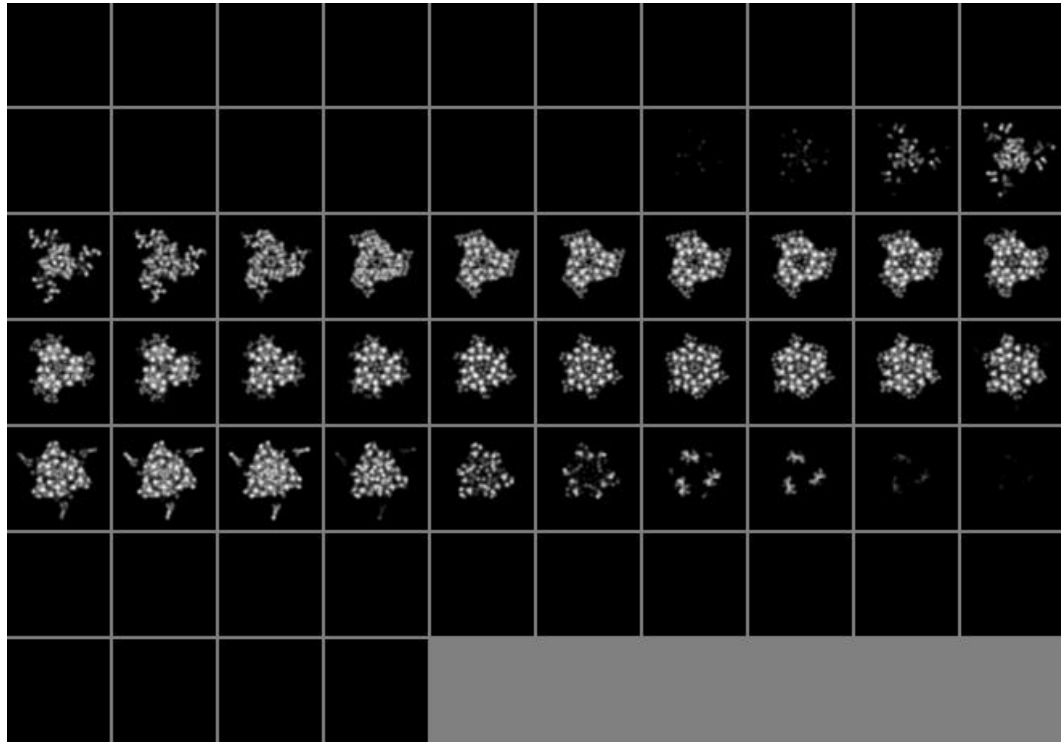


Figura 5.21: Secciones verticales del *phantom* de bacteriorodopsina (arriba), y renderizados de la isosuperficie del mismo *phantom* en diversas orientaciones (abajo).

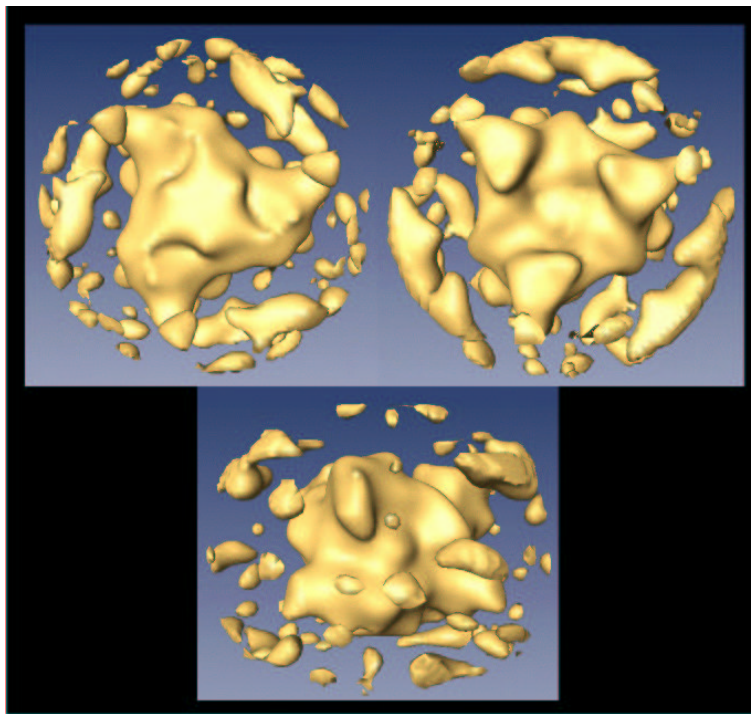
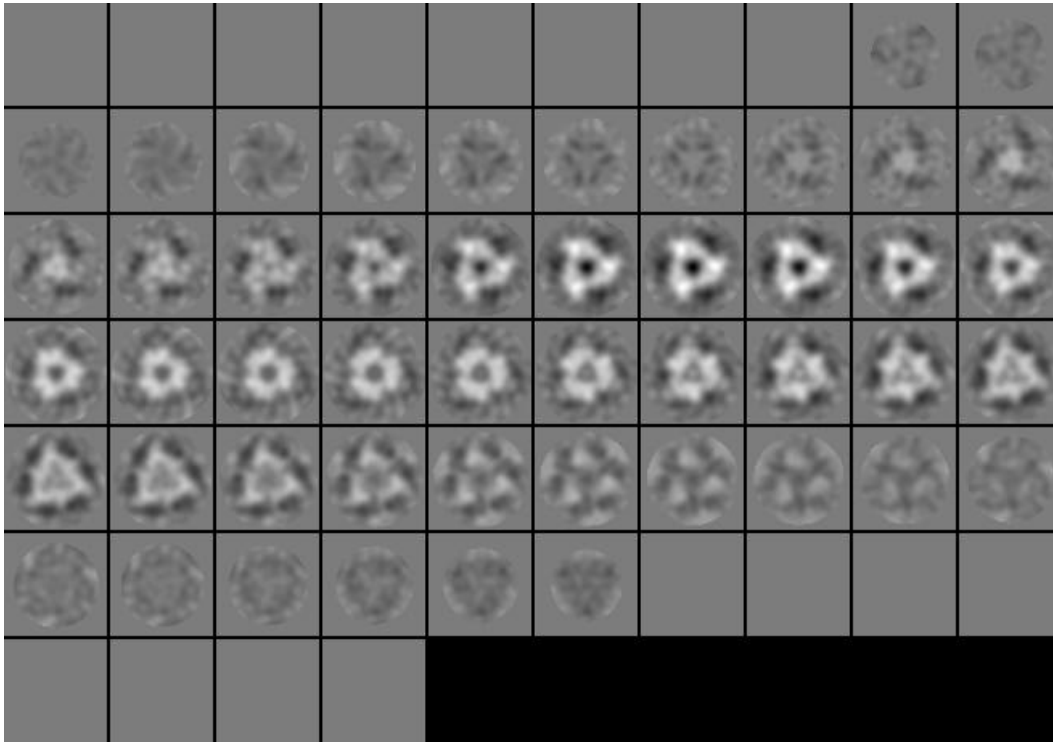


Figura 5.22: Secciones verticales de la reconstrucción realizada con el algoritmo propuesto en la tesis de la bacteriorodopsina (arriba), y renderizados de la isosuperficie de la misma reconstrucción en diversas orientaciones (abajo).

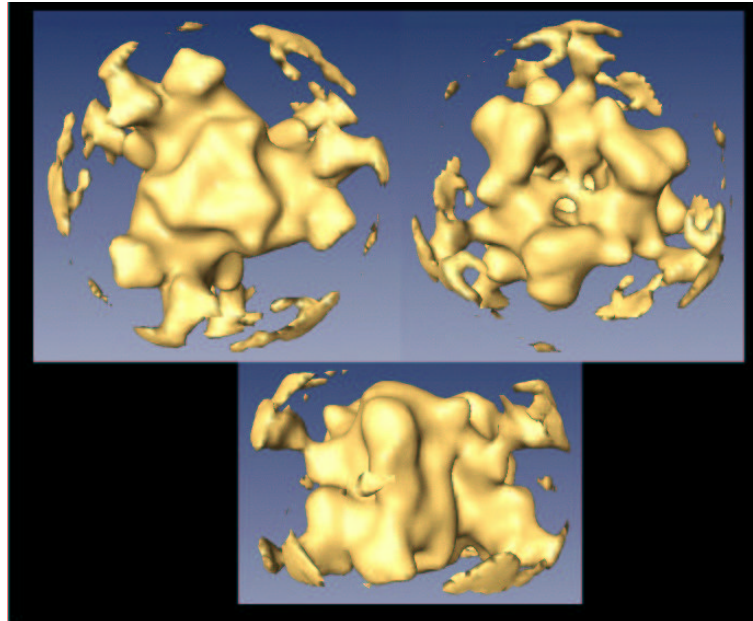
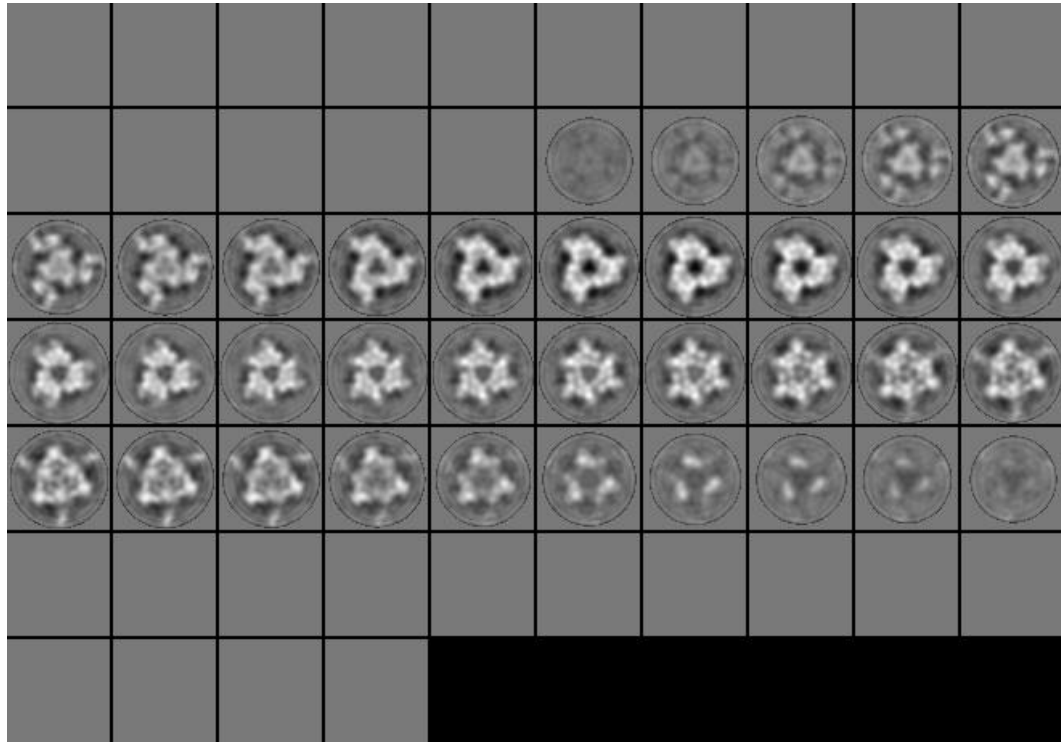


Figura 5.23: Secciones verticales de la reconstrucción realizada con el algoritmo propuesto en la tesis de la bacteriorodopsina (arriba), y renderizados de la isosuperficie de la misma reconstrucción en diversas orientaciones (abajo).



### 5.7.3. Reconstrucción de una macromolécula real

En esta sección se estudia la aplicación de los algoritmos y mejoras propuestos en esta tesis a la reconstrucción de los complejos dodecaméricos que el antígeno de tumorigenicidad (T-Ag) del virus SV40 (*Simian Vacuolating agent* de la familia de los poliomavirus) [100, 148] forma en el origen de replicación viral. El mecanismo de replicación de este virus puede servir como modelo para la comprensión de los procesos de replicación de otros virus que afectan a simios y de las bases moleculares de patologías cancerosas. El complejo bajo estudio está formado por 12 subunidades peptídicas dispuestas en dos hexámeros enfrentados (ver figura 5.24).

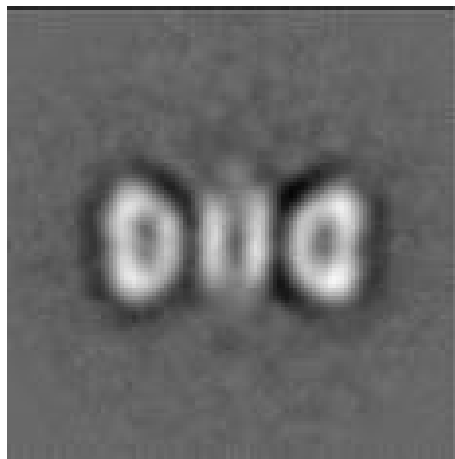


Figura 5.24: Proyección media del complejo formado por dos hexámeros de antígeno T de SV40.

La presente reconstrucción se ha realizado a partir de 1400 proyecciones procedentes de criomicrografías. En este caso se ha corregido la CTF y se han aplicado todas las mejoras introducidas en la tesis: uso de simetría rotacional de orden 3 a lo largo del eje longitudinal al complejo, reducción del volumen a 40000 vóxeles, imposición de la positividad en el volumen reconstruido, restricciones de superficie en las que la superficie se ha calculado por medio de operaciones no lineales (umbralización, morfología matemática y selección de regiones de interés), empleo de soluciones iniciales en el algoritmo de reconstrucción, selección óptima de los parámetros implicados así como del orden en que las proyecciones son introducidas, y utilización de un blob óptimo.

Se compara la reconstrucciones proporcionadas por el algoritmo actualmente



utilizado en el campo, retroproyección ponderada (*WBP*), y el algoritmo desarrollado en la tesis. Las figuras 5.25, 5.26 y 5.27 muestran representaciones de isosuperficie y cortes transversales de las reconstrucciones realizadas con ambos algoritmos. Es de apreciar el aumento de la resolución alcanzada que permite ver en la reconstrucción realizada con el algoritmo propuesto en la tesis pequeños puntos brillantes que en la reconstrucción con el *phantom* de bacteriorodopsina (sección 5.7.2) se correspondían con la presencia de hélices  $\alpha$  [2]. Es de notar que de confirmarse dicha hipótesis supone un importante avance en microscopía electrónica tridimensional dado el bajo número de imágenes de proyección con el que se ha realizado el estudio. La interpretación biológica de dicho volumen está fuera del ámbito de esta tesis.

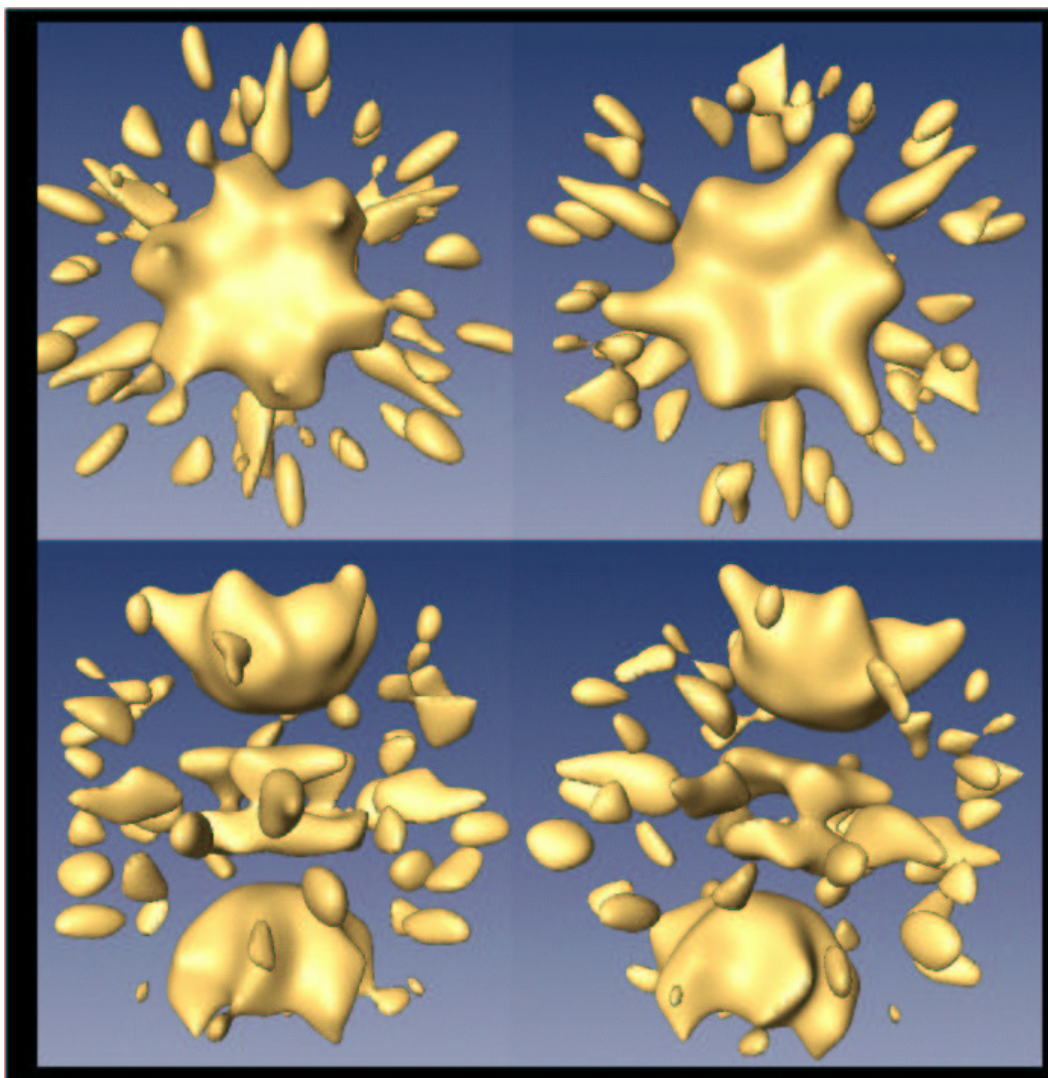


Figura 5.25: Representación de isosuperficie de la reconstrucción del doble hexámero de antígeno T realizada con WBP

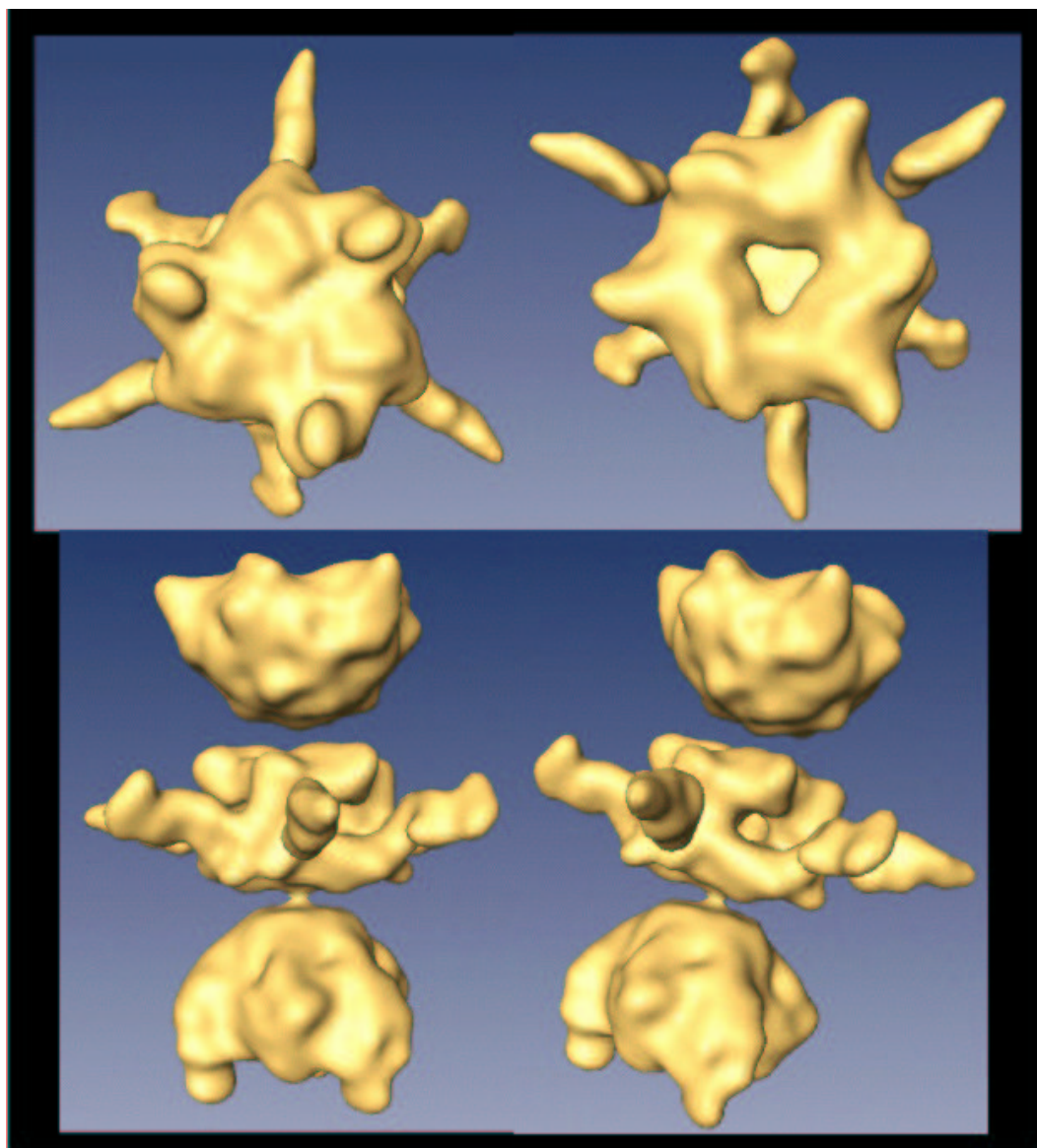


Figura 5.26: Representación de isosuperficie de la reconstrucción del doble hexámero de antígeno T realizada con el algoritmo propuesto en esta tesis

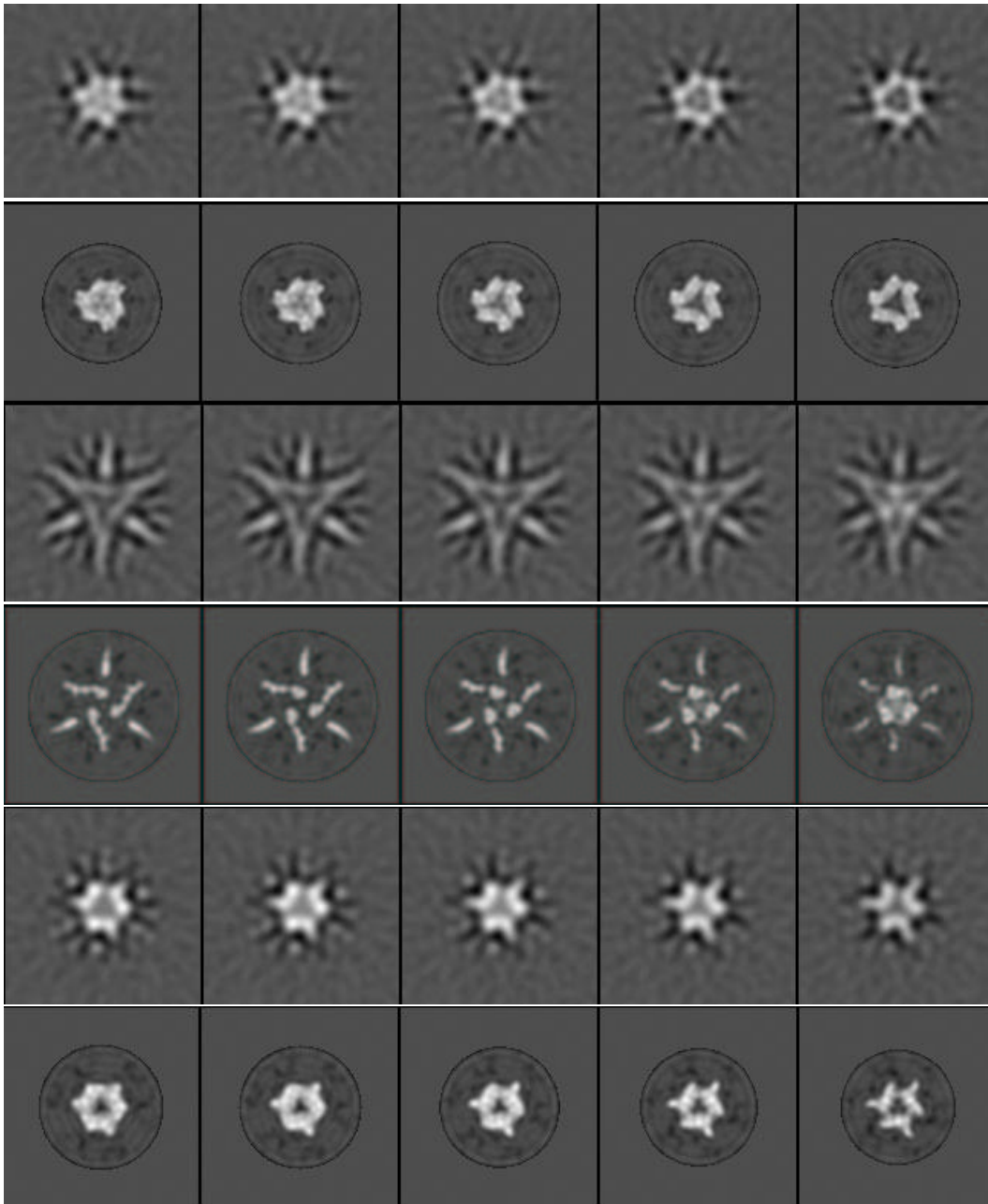


Figura 5.27: Secciones transversales de la reconstrucción del doble hexámero de antígeno T realizada con WBP (arriba) y el algoritmo propuesto en esta tesis (abajo)

## 5.8. Reconstrucción de virus icosaédricos

En principio no existe ningún motivo por el que los virus icosaédricos no puedan ser reconstruidos como si fuesen partículas individuales. Sin embargo, dada su extremadamente alta simetría, hasta 60 elementos de simetría, se puede hacer uso de dicha simetría en el propio proceso de reconstrucción como se expone en el apartado 3.4. En dicha sección se muestra el procedimiento para generar todos los elementos de simetría icosaédrica a partir de tres únicos ejes de rotación.

En el presente estudio se realiza una reconstrucción de adenovirus humano. Los adenovirus provocan un rango muy amplio de enfermedades en humanos, desde infecciones respiratorias a gastrointestinales, pasando por conjuntivitis [56]. Además, en la actualidad se les intenta utilizar como vectores de terapia génica. La reconstrucción mostrada en esta tesis se ha realizado a partir de imágenes de criomicroscopía con 1118 proyecciones procedentes de 34 micrografías, las cuales fueron tomadas en un microscopio equipado con un cañón de emisión por campo (*Field Emission Gun*). Para encontrar las orientaciones angulares se utilizó el software de procesamiento de partículas icosaédricas descrito en [51, 25]. La figura 5.28 muestra una representación de isosuperficie y dos secciones del adenovirus reconstruido para el caso de utilizar la inversión directa del espacio de Fourier como técnica de reconstrucción y el caso de utilizar el algoritmo propuesto en esta tesis en el que no se ha realizado corrección de CTF ni se han incluido restricciones relacionadas con ecuaciones volumétricas (sección 3.5). Se aprecia que apenas existen diferencias entre ambos métodos aunque debemos recordar que en este caso no se han aplicado la inmensa mayoría de las restricciones propuestas.

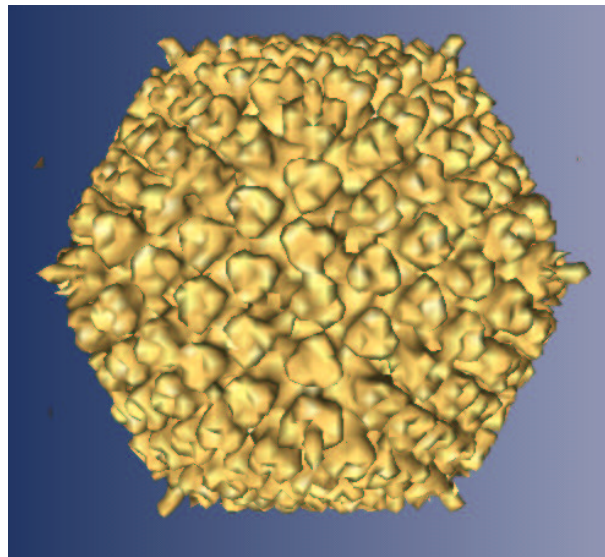
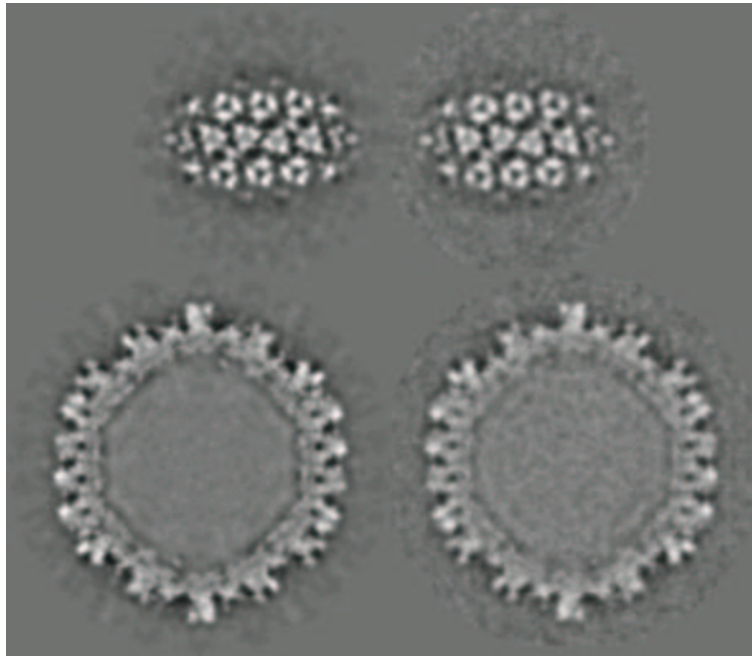


Figura 5.28: Arriba: Dos secciones de la reconstrucción de adenovirus hechas con ART+blobs (izq.) e inversión directa de la transformada de Fourier (der.) Abajo: Representación de isosuperficie de la reconstrucción de adenovirus. Debido a su tamaño este volumen ha debido ser interpolado para su representación por lo que una comparación entre métodos carece de sentido.



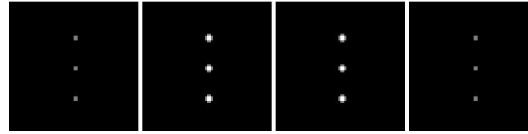


Figura 5.29: Secciones centrales de un phantom cristalino cuya celda unidad se compone de tres esferas

## 5.9. Reconstrucción de cristales

En esta tesis se ha extendido el método de reconstrucción tridimensional ART con blobs a su aplicación a partículas cristalizadas por medio de un cambio del muestreo empleado tanto en el espacio de proyección como en el espacio de proyecciones. En este apartado se presentan ejemplos de reconstrucción utilizando datos simulados y datos reales. Los resultados con datos simulados se han realizado reconstruyendo un *phantom* muy sencillo pero que pone de manifiesto la potencialidad del uso de ART en este campo frente al método clásico. Por otro lado, la reconstrucción con datos experimentales se ha realizado con la policabeza del bacteriófago T4 [34].

### 5.9.1. Reconstrucción de cristales *phantoms*

En cristalografía electrónica es común emplear una serie tomográfica sobre un mismo espécimen como geometría de recolección de datos (ver sección 2.1.2). En estas circunstancias el bajo contraste provocado por la baja dosis empleada y el escaso número de imágenes se ve fuertemente compensadas por la distribución regular de las proteínas así como su alto número debido a la compactación sufrida. En este ejemplo se muestra la reconstrucción de un *phantom* formado por una celda unidad que contiene tres esferas pequeñas distribuidas como se muestra en la figura 5.29.

Para el experimento se han tomado 13, 49 y 97 proyecciones de 1024x1024 píxeles, siendo los vectores de red expresados en píxeles  $\vec{a} = (64, 0, 0)^t$  y  $\vec{b} = (0, 64, 0)^t$ , es decir, en cada imagen se proyectan del orden de 256x256 celdas unidad. La geometría de recolección de datos es una serie tomográfica de eje único y las proyecciones se encuentran equiespaciadas entre el ángulo de inclinación mínimo,  $-60^\circ$ , y máximo,  $+60^\circ$ . La relación señal a ruido de las imágenes simuladas es de 0.24, y además se ha incorporado un tipo de ruido específico a las estructuras cristalinas como es la imperfección de la longitud de los vectores de

red, al que se ha añadido un valor aleatorio con distribución normal de media 0 y desviación típica 0.5 píxeles, y la imperfección de la celda unidad en la que se omite cada una de las esferas con probabilidad 0.03.

El procesamiento bidimensional de los cristales se ha realizado por medio de los programas del *Medical Research Council* según se describe en la sección 4.5 y para el procesamiento tridimensional se han hecho dos reconstrucciones en paralelo, una con los programas del MRC basadas en inversión de una versión interpolada de la transformada de Fourier del volumen, y otra con el método propuesto en la presente tesis. Los resultados se muestran en la figura 5.30. En dichas figuras se puede apreciar que los resultados de ART son superiores a los de MRC en el caso de disponer de pocas proyecciones y comparables en caso contrario. En general ésta ha sido la tónica general de los experimentos realizados con otros *phantoms*, incluso con datos simulados a resolución atómica como es el clásico cuello del bacteriófago  $\phi 29$  [16, 145, 149, 112, 60] para los que no se muestran los resultados.

### 5.9.2. Reconstrucción de un cristal real

En esta sección se verá la aplicación de la reconstrucción cristalográfica con el algoritmo propuesto utilizando datos experimentales de criomicroscopía para la policabeza del bacteriófago T4 [34]. La geometría de recolección de datos es una serie de eje único con 15 micrografías distribuidas entre un ángulo mínimo de  $-60^\circ$  y máximo de  $60^\circ$ . En este caso las reconstrucciones obtenidas no presentan grandes diferencias aunque hay que tener en cuenta que no se han aplicado ni corrección de CTF ni ninguna otra restricción sobre el proceso de reconstrucción. La figura 5.31 muestra algunas secciones del volumen reconstruido por ambas técnicas mientras que la figura 5.32 proporciona una representación de isosuperficie del motivo central.



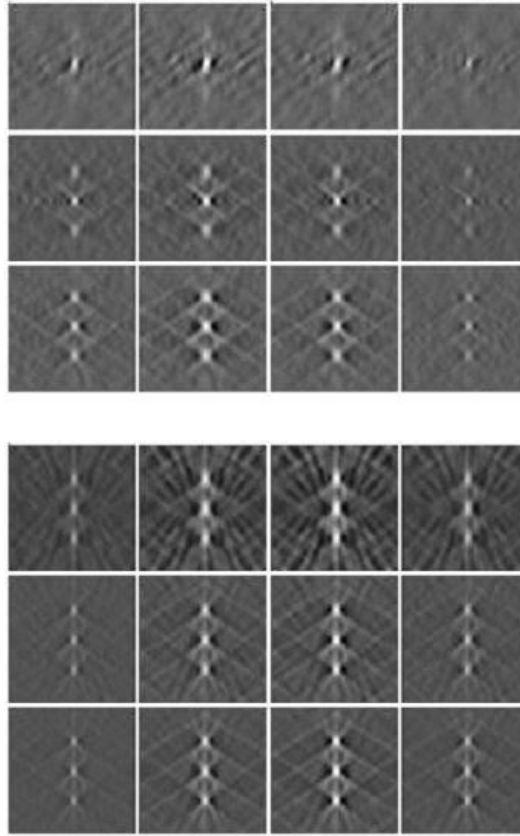


Figura 5.30: Secciones centrales de la reconstrucción realizada por inversión de una versión interpolada de la transformada de Fourier (mitad superior) y con el algoritmo propuesto en esta tesis (mitad inferior). Cada fila de secciones de cada mitad corresponde a una reconstrucción realizada con 13, 49 y 97 proyecciones. Las secciones corresponden al mismo phantom y mismas secciones que las mostradas en la figura 5.29.

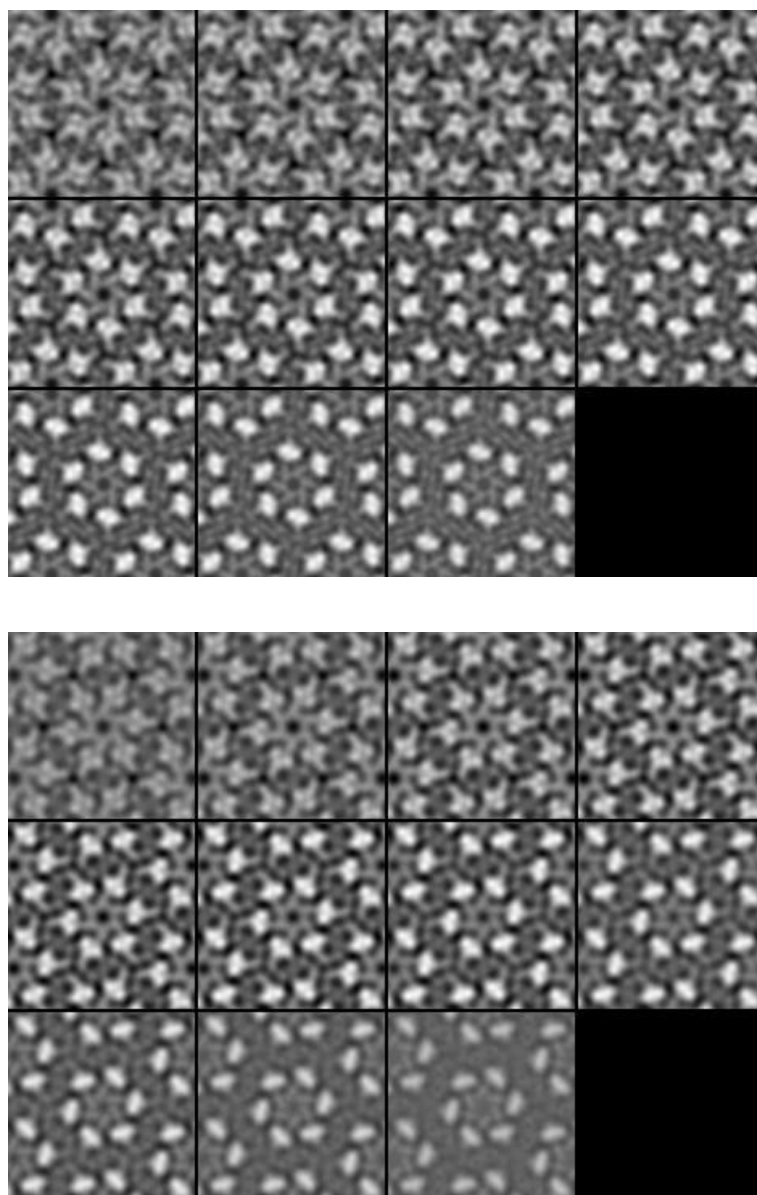


Figura 5.31: Secciones de la reconstrucción de la policabeza del bacteriófago T4 realizada por inversión de una versión interpolada de la transformada de Fourier (arriba) y por el algoritmo propuesto en la tesis (abajo).

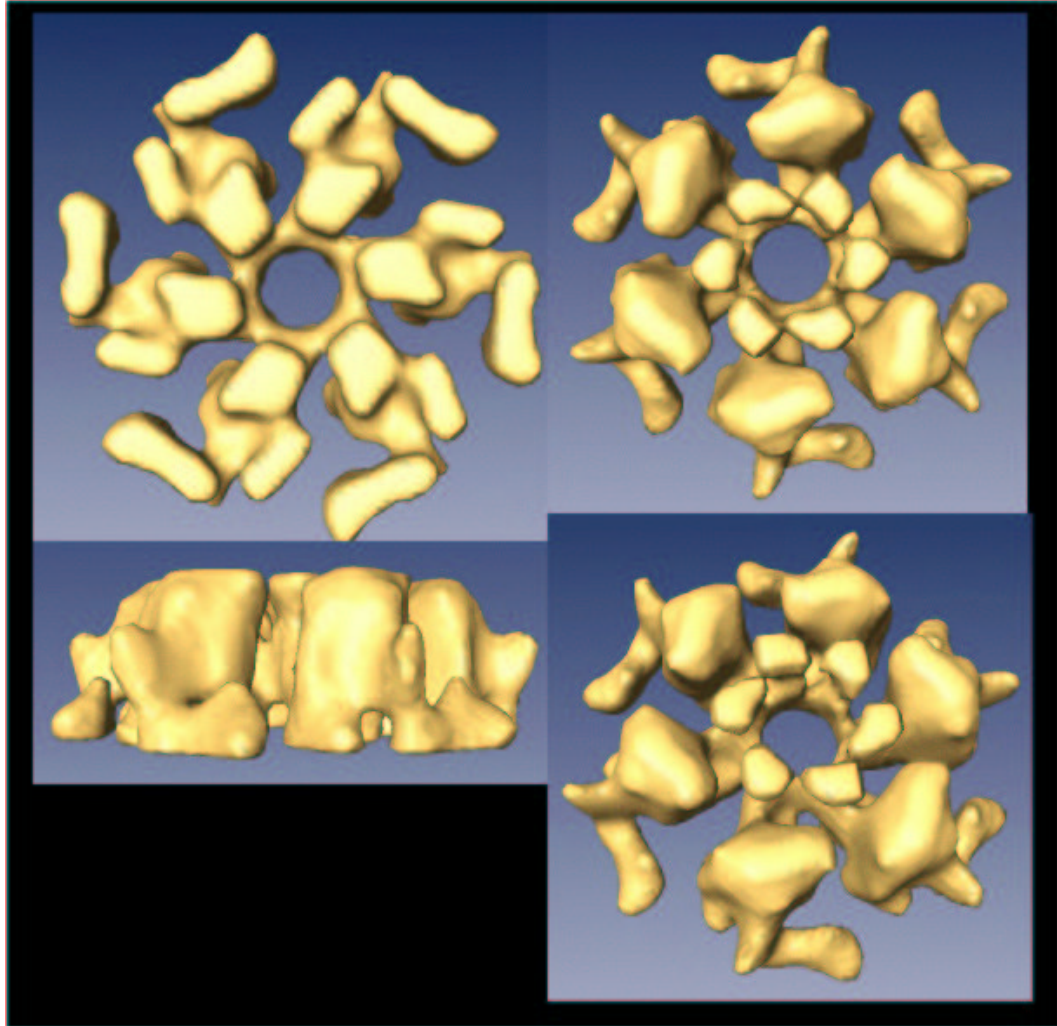


Figura 5.32: Representación de isosuperficie para la reconstrucción con ART de la policabeza del bacteriófago T4

**Parte IV**  
**Discusión**



# Capítulo 6

## Discusión

A lo largo de la presente tesis se han expuesto principios y algoritmos que permiten una mejora de la calidad objetiva de las reconstrucciones obtenidas. Dicho aumento de calidad se comprueba con todos los datos simulados por medio de figuras de mérito que cuantifican la mejora. Al mismo tiempo, para datos reales tan sólo se puede calcular la resolución alcanzada, o mejor dicho la autoconsistencia de las reconstrucciones. Sin embargo, también se produce un incremento importante en esta variable que oscila entre 10Å y 15Å de mejora. Las claves de dicha mejoría han sido tres:

- Optimización de todos los factores implicados: para ello se ha propuesto un método de selección de parámetros cuando los factores a optimizar son múltiples y nos encontramos en un entorno fuertemente ruidoso.
- Corrección de la función de transferencia del microscopio: este aspecto es crucial para poder aprovechar la información de más alta frecuencia que de otro modo debe ser filtrada.
- Introducción de conocimiento *a priori* sobre el volumen solución en el propio proceso de reconstrucción: esta información complementa la información procedente de las imágenes de proyección obtenidas en el microscopio electrónico.

La combinación de las tres demuestran ser lo suficientemente poderosas como para conseguir un aumento considerable de la resolución obtenida.

## Optimización

En cuanto a optimización se han estudiado los siguientes factores: factor de relajación de ART, factor de aceleración de IDR, parámetros de la función base así como de la rejilla de expansión, orden de presentación de las proyecciones y región de soporte para el modelado espectral paramétrico ARMA. Cada uno de ellos juega un importante papel en su parcela y la contribución de una correcta selección de parámetros en cada uno de ellos contribuye a una mejora final.

La importancia de la optimización ha quedado patente en la sección 5.1.3 en la que el efecto de una selección inadecuada de parámetros conduce a resultados evidentemente erróneos pero que, sin embargo, fueron tratados de justificar en la literatura [13]. Al estar reconstruyendo partículas para las que habitualmente se desconoce su estructura, resulta imposible detectar errores de la misma naturaleza pero mucho más sutiles. Es por este motivo que sería recomendable realizar una optimización de los parámetros de reconstrucción para cada geometría de recolección de datos concreta. No obstante, esta optimización supondría una carga computacional importante a cada proceso de reconstrucción por lo que se ha intentado en esta tesis (sección 5.1) proporcionar una guía de uso del principal factor libre del algoritmo estudiado, ART. Sin embargo, hay que reconocer las limitaciones de dicho estudio puesto que se refieren a una geometría concreta, con una relación señal a ruido concreta y con una determinada variación de tamaños de imagen, número de imágenes, ... Tan sólo aquellos experimentos en los que estos parámetros sean similares a los simulados podrán hacer uso de la guía aquí proporcionada.

A la vista de los resultados obtenidos en la sección 5.1 parece que éstas son las principales directivas para la selección del factor de relajación en ART:

- Es independiente de la estructura de correlación del ruido aditivo: en principio, parece ser insensible si se trata de un ruido con altas componentes frecuenciales o no.
- Es casi independiente del tamaño de las imágenes de proyección y, por tanto, del volumen reconstruido.
- Es inversamente dependiente con el número de proyecciones: a menor número de proyecciones mayor debe ser dicho factor.
- Se han proporcionado modelos que permiten determinar un intervalo recomendado para este factor con un margen de confianza dado.

Un aspecto importante de la optimización llevada a cabo en la presente tesis es que se ha hecho uso de conceptos estadísticos los cuales permiten una optimización frente a un conjunto de funciones objetivo con intereses contrapuestos (los mínimos de una función no coinciden con los mínimos de otra) cuando estas funciones objetivo presentan la característica adicional de tener un carácter aleatorio muy importante, es decir, son dependientes de variables con una fuerte variación como puede ser la realización del ruido de las imágenes (tanto a nivel de píxel como de alineamiento rotacional y traslacional), el phantom utilizado o la geometría de recolección de datos.

Con esta misma metodología de optimización se han seleccionado los valores del factor de aceleración de IDR y la región óptima de soporte para la estimación espectral paramétrica ARMA. De nuevo, las guías de empleo descritas en esta tesis se encuentran sujetas a las restricciones de las condiciones concretas de simulación empleadas aunque éstas han sido diseñadas para cubrir el mayor número de casos prácticos posible.

Durante la optimización realizada con el factor de relajación de IDR se ha encontrado que el mismo parece ser independiente del nivel de filtrado paso bajo aplicado al ruido aditivo de fondo, encontrándose este valor en el intervalo [1.8,2].

Para la apropiada elección de la región de soporte del modelado ARMA tenemos que:

- No existe un único valor óptimo sino una región de combinaciones de longitudes AR y MA indistinguibles estadísticamente en cuanto a su optimalidad.
- La región de soporte óptima es relativamente independiente de factores como el tamaño de la imagen a modelar y desenfoque de la misma.
- Por lo que se prevé que dicha región esté más relacionada con la estructura de correlación de la imagen provocada por otros factores como puede ser la naturaleza del ruido.
- Modelos ARMA con órdenes muy altos en cualquiera de sus dos componentes (AR o MA) son susceptibles de presentar una textura rugosa artificial en la función densidad espectral de potencia.

En cuanto a los modelos ARMA se deben hacer otras dos puntualizaciones. Primera, la resolución del modelo se realiza en dos pasos: en primer lugar se determina un modelo AR y posteriormente se modela como MA el error residual. Es decir, el modelo AR del ARMA se calcula exactamente igual que el AR sólo



y el modelo MA posterior debe ser entendido como una mejora sobre el AR. Segunda, modelos con órdenes altos AR ( $p$ ) o MA ( $q$ ) implican que para la textura estudiada el valor de píxeles que se encuentren a distancia  $\sqrt{2}p$  o  $\sqrt{2}q$  tienen una influencia significativa sobre el valor del píxel considerado, lo cual para muchas texturas y, en concreto la de microscopía electrónica, es más que cuestionable. En este sentido cabe señalar que los órdenes óptimos obtenidos por la simulación entran dentro de lo razonable.

En la optimización de la forma del blob y de su distanciamiento para una rejilla BCC (sección 3.1.2) se ha seguido un camino completamente distinto. La optimización ha sido realizada en función de dos criterios de optimalidad relacionados con la homogeneidad de la representación de una función constante en el espacio y la homogeneidad de la normal cuando una esfera es representada utilizando blobs como función base. Estos dos criterios definen una región donde cualquier blob escogido en esa zona es óptimo respecto a ellos. Adicionalmente se han seleccionado restricciones de máxima atenuación permitida para una frecuencia dada y optimalidad del tiempo de cómputo del algoritmo de reconstrucción con los parámetros elegidos. Es éste, como se ve, un proceso mucho más analítico de optimización que el desarrollado anteriormente. El resultado del mismo nos proporciona una función base que está diseñada para no atenuar la señal a reconstruir en las frecuencias de interés y que al mismo tiempo reduce la cantidad de artefactos producidos por una mala interacción entre blobs adyacentes tanto a nivel de homogeneidad de la reconstrucción como de sus normales.

En todo algoritmo iterativo el orden en que los datos son presentados al algoritmo pueden influir e incluso sesgar el resultado del mismo. En este sentido nos hemos planteado la optimización del orden de presentación de proyecciones entendiendo que un criterio basado en la ortogonalidad de proyecciones puede aportar más información en cada paso ([66, 59]). Es por ello que hemos tratado de responder a la pregunta obvia de cuál es el criterio de ortogonalidad óptimo, o expresado de otra manera, a cuántas proyecciones anteriores debe la siguiente proyección presentada ser lo más ortogonal posible. La respuesta después de la conveniente simulación (sección 5.2) es que a las dos anteriores, lo cual, por otra parte, es bastante intuitivo.

## Corrección de la CTF

La corrección de la función de transferencia del microscopio electrónico se convierte en una condición indispensable en el camino de la microscopía elec-

trónica tridimensional hacia la obtención de datos de alta resolución y datos cuantitativos. El principal efecto de la función de transferencia del microscopio electrónico es la inversión de fase producida a determinadas frecuencias medias la cual proyecta la masa de la partícula a esas frecuencias con un contraste invertido a como se proyecta el resto. Por este motivo reconstrucciones en las que no se corrige en absoluto dicha función de modulación deben filtrar sus resultados a una frecuencia coincidente con el primer cero de la función de la CTF.

Una corrección de la fase bastaría para evitar esta mezcla de diferentes contrastes y así poder filtrar el volumen resultante a la frecuencia a la que se considere que efectivamente se deja de tener información. Es más, existen experimentos [27, 26, 28] que nos demuestran que en una imagen convencional la mayor parte de la información de la imagen se encuentra en la fase de la transformada de Fourier, por lo que esta corrección simple sería suficiente para obtener una importante mejora en la resolución alcanzada.

La corrección de amplitud vendría a completar el panorama en el que la diferente modulación a la que cada una de las componentes espectrales del volumen reconstruido ha sido sometida se corrige, para así obtener reconstrucciones en las que todas las componentes espectrales son recuperadas en su verdadera magnitud. El modo tradicional de corrección de amplitud pasa por la división en frecuencia por la función de transferencia o una división cuidadosa por esta misma función (filtrado de Wiener). Sin embargo, la primera aproximación no puede utilizarse en este caso puesto que la función de transferencia contiene valores nulos y en esas frecuencias no se puede dividir. En cuanto al filtrado de Wiener no da buenos resultados con imágenes muy ruidosas y si es aplicada al volumen no queda muy claro cómo calcular un parámetro del que depende. En la presente tesis se ha propuesto un método de corrección de la función de transferencia que evita dividir por ella y al mismo tiempo se adapta fácilmente al trabajo con otros algoritmos de reconstrucción que no sean el considerado en este trabajo. Adicionalmente el modelo de formación de la imagen introducido en el método de corrección puede ser tan flexible como se desee y puede ser extendido en un futuro para considerar las diferencias de desenfoque experimentadas por una misma partícula cuando su altura es relativamente grande, tal es el caso de la reconstrucción tomográfica de células completas o secciones de tejido.

Sin embargo, ninguna de las correcciones anteriores se podrían llevar a cabo si no se cuenta de una estimación de la función de transferencia a corregir. En este punto es donde entra en juego la estimación espectral paramétrica proporcionada por los modelos ARMA y el posterior ajuste teórico a la densidad espectral calculada. Los modelos ARMA han demostrado ser superiores a la estimación clásica

de promediado de periodogramas en un número de aplicaciones ([70, 94, 76]). En este caso también se han aplicado con éxito y su principal característica en nuestra aplicación ha sido la de producir estimaciones de la densidad espectral de potencia mucho menos ruidosas que las obtenidas por promediado de periodogramas, o lo que es lo mismo, con una menor varianza puntual. Esta propiedad se conserva incluso en la estimación espectral con imágenes sin película de carbón en la que la función de transferencia es mucho menos visible.

La correcta y limpia estimación de la densidad espectral de potencia ha posibilitado el ajuste del modelo teórico completo de CTF que de otro modo hubiese resultado impracticable. Con todo, el alto número de parámetros de dicho modelo fuerza un algoritmo de búsqueda paso a paso que evite, en la medida de lo posible, quedar atrapado en mínimos locales que no representen bien a la función de transferencia subyacente. En esta tesis se ha desarrollado un complejo algoritmo de ajuste del modelo teórico de CTF a la estimación de la densidad espectral de potencia en el que se presta especial atención al ajuste correcto de los ceros espectrales puesto que juegan un papel primordial en la corrección de CTF.

## **Información *a priori***

La tercera pieza clave para la consecución de una mejora de la calidad de las reconstrucciones obtenidas es la introducción en el proceso de información *a priori* sobre el volumen a reconstruir. En la presente tesis se ha considerado el conocimiento de la superficie de la proteína, del volumen ocupado y de posibles simetrías puntuales. Además, se ha incorporado la restricción de que la masa a reconstruir debe ser positiva puesto que no existen en la naturaleza masas negativas. Por último, se ha dotado al algoritmo de reconstrucción de un mecanismo para comenzar las iteraciones desde un punto conocido al cuál debe parecerse el volumen solución.

La superficie de la proteína es una pieza de información que se puede obtener por microscopía de fuerzas atómicas o técnicas de sombreado metálico para estructuras cristalinas. En este caso la información procedente de la microscopía complementaria debe ser integrada y alineada con la información del microscopio electrónico. Por ello se han desarrollado en esta tesis algoritmos de alineamiento entre una superficie y un volumen. Una vez que se conoce la posición exacta de la superficie en el volumen, esta información es utilizada para imponer restricciones al proceso de reconstrucción de tal manera que se concentre la masa en el interior de esta superficie.

Microscopías complementarias no son la única fuente de información superficial puesto que un análisis no lineal de un volumen reconstruido basado en filtrados morfológicos, umbralización o cualquier otra técnica de segmentación y procesado no lineal de volúmenes también proporciona información útil sobre el volumen solución final. Esta pieza de información puede ser utilizada del mismo modo que las restricciones de superficie impuestas por otras microscopías.

La masa de una proteína es un dato conocido por técnicas bioquímicas. Asumiendo una densidad constante en el interior proteína, aproximación comúnmente utilizada en el campo para segmentar los volúmenes reconstruidos, se puede conocer el volumen ocupado por la misma. En esta tesis se ha modelado un modo de introducir esta información en el propio proceso de reconstrucción de manera que en cada iteración de ART no se permita la reconstrucción de soluciones que ocupen un volumen mayor que el permitido.

La positividad del nivel de densidad a reconstruir en cada punto es una restricción habitualmente utilizada en otros campos de la tomografía y suele constituir una pieza de información clave para la consecución de resultados aceptables en campos donde se cuenta con muy poca información como SPECT (*Single Positron Emission Computed Tomography*) [78]. En microscopía electrónica el valor de los vóxeles reconstruidos están asociados a la densidad de masa existente en esa región del espacio, la cual no puede ser nunca negativa. Sin embargo, las imágenes de proyección sufren demasiadas transformaciones en su camino hacia una reconstrucción por lo que pierden su significado numérico y es habitual tener que normalizarlas antes de introducirlas en el algoritmo de reconstrucción. En esta tesis se han estudiado diversos métodos de normalización (sección 3.3) y se ha demostrado que bajo ciertas hipótesis es posible utilizar un tipo de normalización que permite la inclusión de restricciones de positividad al volumen solución. De este modo encontramos en esta restricción una nueva herramienta de lucha contra el ruido presente en el volumen final.

El mecanismo desarrollado para imponer los tres tipos de restricciones mencionados (superficie, volumen y positividad) posibilitan la traducción de volúmenes expresados en vóxeles (espacio en el que trabajan la mayoría de los algoritmos y programas de procesamiento de imagen) a blobs (espacio en el que trabaja la implementación del algoritmo de reconstrucción utilizado en esta tesis). Este hecho permite suministrar a dicho algoritmo de reconstrucción una solución inicial más cercana a la solución real. Dado que el algoritmo minimizará el error de las proyecciones de la solución con las proyecciones experimentales así como la distancia euclídea entre la solución alcanzada y la solución inicial, encontramos en este mecanismo una forma singular de condicionar la búsqueda en el espacio

de soluciones. Este condicionamiento puede favorecer la consecución de determinadas propiedades del volumen reconstruido.

La introducción de la simetría supone un destacado mecanismo de lucha contra el ruido puesto que estamos multiplicando por un factor (el cardinal del subgrupo de simetría) el número de proyecciones conocidas sobre el espécimen. En esta tesis se ha generalizado el uso de simetrías así como el estudio de sus interacciones de manera que la existencia de varios elementos de simetría en un volumen genera más información sobre la solución que la suma de las informaciones particulares asociadas a cada uno de los elementos. Los virus icosaédricos son un claro ejemplo de este caso. Especial cuidado debe aplicarse a las simetrías cristalinas en las que la regular disposición que adoptan las macromoléculas en el espacio induce nuevos elementos de simetría no puntual que pueden ser explotados por el algoritmo de reconstrucción.

Para finalizar tenemos que añadir el hecho de que la inclusión de información *a priori* es tanto más valiosa cuanto mayor sea el desconocimiento por microscopía electrónica de la partícula en estudio ya sea por motivos de escaso número de proyecciones, por una cobertura angular insuficiente o por una relación señal a ruido o contraste especialmente deteriorados.

## Resultados

Todos los algoritmos e ideas desarrolladas en la tesis se han llevado a la práctica para el análisis de partículas reales por microscopía electrónica de transmisión. Para ello se han desarrollado más de 250.000 líneas de código en C++ organizadas en una serie de librerías y programas disponibles públicamente que se integran en el paquete de procesamiento de imágenes de microscopía Xmipp [97]. Con este paquete ya se han realizado estudios estructurales de macromoléculas como [137, 8, 91, 101]

Se han realizado simulaciones con el objetivo de determinar el grado de mejora de la calidad obtenido en las reconstrucciones al aplicar toda la serie de técnicas mencionadas. Al ser conocida la verdadera solución se pueden establecer criterios objetivos que determinen la cuantía de la mejora. De hecho, son estos criterios objetivos los que han posibilitado la optimización y sintonización de los parámetros libres de los distintos algoritmos al problema concreto a resolver. Los resultados con dichas simulaciones confirman la hipótesis inicial de mejora de la calidad. Los resultados con partículas reales muestran la misma tendencia y en aquellos casos en los que es posible medir el aumento de resolución también se aprecia un

sustancial aumento.

Este incremento de la calidad supone un paso importante en el camino de la microscopía electrónica de transmisión hacia su establecimiento como una técnica de alta resolución. Este hecho cada vez es más una realidad dados el amplio espectro de partículas susceptibles de ser estudiadas con esta técnica, la automatización de muchos procesos tales como la toma de micrografías y la selección de partículas lo cual posibilita reconstrucciones con un número muy alto de proyecciones, mejoras en la preparación de la muestra con lo que las proyecciones cada vez arrojan información de mayor calidad, y por último, el avance de las técnicas de procesamiento de imagen inevitablemente asociadas a este tipo de microscopía.

La consecución de estructuras tridimensionales de calidad en biología está sirviendo para una mayor comprensión de los complicados mecanismos moleculares que definen en último término la forma de vida de la célula. Del mismo modo que la interacción del campo del procesamiento de imágenes -tradicionalmente ocupado por matemáticos aplicados, físicos, ingenieros de telecomunicación y electrónicos e informáticos- con el mundo de la biología estructural está produciendo importantes y fructíferos avances científicos, la convergencia entre la biología estructural y otras ramas de la biología como la proteómica, la genómica y la biología celular nos llevarán a destacados avances médicos y a un mejor entendimiento de nuestro entorno.



## **Parte V**

# **Conclusiones y planes de futuro**





# Capítulo 7

## Conclusiones

Las principales aportaciones de esta tesis han sido:

- Haber puesto a punto en el laboratorio un paquete de software para la determinación de la estructura tridimensional de macromoléculas mediante métodos iterativos con la incorporación de diferentes tipos de funciones base y rejillas. Este paquete de software ya ha sido empleado en análisis estructurales de importante complejos macromoleculares.
- Haber desarrollado un método de optimización basado en conceptos estadísticos útil en entornos con una alta variabilidad, un amplio número de variables independientes y múltiples funciones objetivo a optimizar.
- Haber desarrollado un método de ajuste de un modelo teórico de función de transferencia del microscopio a una estimación de la densidad espectral de potencia. Dicha estimación se realiza por medio de modelos paramétricos ARMA.
- Haber desarrollado un mecanismo de corrección de la función de transferencia de contraste (CTF), tanto en fase como en amplitud. La corrección en amplitud se realiza por medio del algoritmo iterativo IDR en el que se elimina la necesidad de dividir por la CTF, evitando así los problemas con los que se enfrentan los métodos convencionales en el campo.
- Haber optimizado una gran variedad de parámetros utilizados durante el proceso de reconstrucción tales como el factor de relajación del algoritmo de reconstrucción ART con blobs, el factor de aceleración del algoritmo

de corrección de función de transferencia IDR, la región de soporte de los modelos ARMA empleados en la correcta detección de la CTF, parámetros de forma de la rejilla y función base en la expansión en serie del volumen solución producida durante la reconstrucción, y el orden de presentación de las proyecciones al algoritmo iterativo.

- Haber incorporado mecanismos de introducción de información *a priori* en el propio proceso de reconstrucción. Esta información hace referencia a la existencia de simetría, la superficie de la macromolécula, su volumen ocupado y restricciones de positividad en los niveles de densidad. Para esta última restricción se ha llevado a cabo un análisis exhaustivo de los métodos existentes de normalización de proyecciones y se han propuesto dos métodos adicionales.
- Extensión de los métodos iterativos de reconstrucción tridimensional, y todas las mejoras presentadas en esta tesis, para la determinación de la estructura tridimensional de especímenes biológicos que forman cristales bidimensionales.
- Todas estas aportaciones han contribuido a una mejora de la calidad de los volúmenes obtenidos redundando en una mejora apreciable de la resolución alcanzada. Este punto es de vital importancia en la interpretación biológica de los resultados y para su interacción con otros campos como pueden ser imágenes procedentes de otras microscopías, integración con datos a resolución atómica o predicción de estructuras.

# Capítulo 8

## Planes de futuro

El trabajo realizado en esta tesis deja abierto el camino a una serie de nuevos estudios que aumenten aún más desde el apoyo del procesamiento de imagen la potencia de la microscopía electrónica como técnica de resolución estructural:

- Estudiar la influencia del número de iteraciones en la calidad de los resultados obtenidos.
- Estudiar otros algoritmos iterativos como alternativa a ART. En concreto, *Component Averaging* se perfila como un candidato de propiedades de convergencia conocidas cuyo código es paralelizable.
- Estudiar la influencia de parámetros tales como el número de imágenes, tamaño de las mismas y variación en la CTF en la región de óptimo rendimiento en el factor de relajación de IDR.
- Estudiar la incorporación de otros tipos de conocimientos *a priori* como son la naturaleza discreta de las proteínas y la distribución estadística *a priori* del conjunto de volúmenes solución.
- Estudiar la introducción durante el proceso de reconstrucción de operadores no lineales que realcen el contenido de la imagen y eliminen el ruido.
- Estudiar la posibilidad de describir una función objetivo tal que el proceso de reconstrucción no se vea afectado por la presencia de un ruido perfectamente caracterizado.

- Estudiar los efectos de técnicas estadísticas de muestreo como *bootstrap* para combinar distintas reconstrucciones de una misma partícula con un mismo conjunto de proyecciones y comprobar su capacidad de eliminación de variabilidad de la reconstrucción final.
- Estudiar la manera de informar sobre la variabilidad local de las reconstrucciones, de manera que se puede asignar un grado de fiabilidad a los niveles de densidad obtenidos.
- Estudiar mecanismos de preprocesado de las imágenes con la intención de eliminar ruido de ellas sin deteriorar la señal y de postprocesado del volumen de manera que se realce su contenido biológico frente al ruido existente.

# Bibliografía

- [1] R. Albertini. *Developing sustainable studies on environmental health*. Mutation Research, 480-481:317–331, 2001.
- [2] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, y J. D. Watson. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York, 3rd edición, 1994.
- [3] J. M. Amigó, J. L. Briansó, M. C. Briansó, R. Coy, y J. Solans Huguet. *Cristalografía*. Ed. Rueda, 1981.
- [4] L. A. Amos, R. Henderson, y P. Unwin. *Three-dimensional structure determination by electron microscopy of two-dimensional crystals*. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 39:183–231, 1982.
- [5] A. Andersen y A. Kak. *Simultaneous algebraic reconstruction technique (SART): a superior implementation of the ART algorithm*. Ultrasonic Imaging, 6:81–94, 1984.
- [6] M. Auer. *Electron cryo-microscopy as a powerful tool in molecular medicine*. J. Molecular Medicine, 78:191–202, 2000.
- [7] A. J. Avila-Sakar, T. L. Guan, T. Arad, M. F. Schmid, T. W. Loke, A. Yonath, J. Piefke, F. Franceschi, y W. Chiu. *Electron cryomicroscopy of bacillus stearothermophilus 50S ribosomal subunits crystallized on phospholipid monolayers*. J. Molecular Biology, 239:689–697, 1994.
- [8] M. Bárcena, L. Donate, T. Ruiz, N. Dixon, M. Radermacher, y J. M. Carazo. *The Dnab-Dnac complex: a structure based on interactions among assymmetric dimers*. EMBO Journal, 20(6):1462–1468, 2001.

- [9] R. H. T. Bates, K. L. Garden, y T. M. Peters. *Overview of computerized tomography with emphasis on future developments*. Proc. IEEE, 71(3):356–372, 1983.
- [10] J. G. Berryman. *Lecture notes on nonlinear inversion and tomography*, 1991.
- [11] A. Björk. *Numerical Methods for Least Squares Problems*. SIAM, 1996.
- [12] N. Boisset y F. Mouche. *Sepia officinalis Hemocyanin: A refined 3D structure from Field Emission Gun microscopy*. J. Molecular Biology, 296:459–472, 2000.
- [13] N. Boisset, P. Penczek, J. C. Taveau, V. You, F. de Haas, y J. Lamy. *Overabundant single-particle electron microscope views induce a three-dimensional reconstruction artifact*. Ultramicroscopy, 74:201–207, 1998.
- [14] J. Brink, H. Gross, P. Tittmann, M. Sherman, y W. Chiu. *Reduction of charging in protein electron cryomicroscopy*. J. Microscopy, 1:67–73, 1998.
- [15] J. M. Carazo y J. L. Carrascosa. *Restoration of direct Fourier three-dimensional reconstructions of crystalline specimens by the method of convex projections*. J. Microscopy, 145:159–177, 1987.
- [16] J. M. Carazo, L. E. Donate, L. Herranz, J. P. Secilla, y J. L. Carrascosa. *Three-dimensional reconstruction of the connector of bacteriophage  $\phi 29$  at 1.8 nm resolution*. J. Molecular Biology, 192:853–867, 1986.
- [17] Y. Censor y T. Elfving. *Block-iterative algorithms with diagonally scaled oblique projections for the linear feasibility problem*. SIAM J. Matrix Analysis and Applications, 2002.
- [18] Y. Censor, T. Elfving, y G. T. Herman. *A method of iterative data refinement and its applications*. Mathematical Methods in Applied Sciences, 7:108–123, 1985.
- [19] Y. Censor, D. Gordon, y R. Gordon. *Component averaging: An efficient iterative parallel algorithm for large and sparse unstructured problems*. Parallel computing, 27:777–808, 2001.

- [20] Y. Censor y S. A. Zenios. *Parallel Optimization: Theory, Algorithms and Applications*. Oxford University Press, New York, NY, USA, 1997.
- [21] T. A. Ceska y R. Henderson. *Analysis of high resolution electron diffraction patterns from purple membrane labelled with heavy atoms*. *J. Molecular Biology*, 213:539–560, 1990.
- [22] T. A. Ceska, R. Henderson, J. M. Baldwin, F. Zemlin, E. Beckmann, y K. Downing. *An atomic model for the structure of bacteriorhodopsin, a seven-helix membrane protein*. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 607:31–40, 1992.
- [23] R. Chellappa y A. Jain. *Markov Random Fields: Theory and Application*. Academic Press, San Diego, 1993.
- [24] W. Chiu. *What does electron cryomicroscopy provide that X-ray crystallography and NMR spectroscopy cannot*. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure*, 22:233–255, 1993.
- [25] Collaborative computational project no. 4. *The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography*. *Acta Crystallographica*, D50:760–763, 1994.
- [26] K. Cowtan. *Modified phased translation functions and their application to molecular fragment location*. *Acta Crystallographica*, D54:750–756, 1998.
- [27] K. Cowtan y P. Main. *Phase combination and cross validation in iterated density modification calculations*. *Acta Crystallographica*, D52:43–48, 1996.
- [28] K. Cowtan y K. Y. J. Zhang. *Density modification for macromolecular phase improvement*. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 72:245–270, 1999.
- [29] R. A. Crowther, D. J. DeRosier, y F. R. S. Klug. *The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy*. *Proc. Royal Society of London A*, 317:310–340, 1970.
- [30] R. A. Crowther, R. Henderson, y J. M. Smith. *MRC image processing programs*. *J. Structural Biology*, 116:9–16, 1996.



- [31] M. Cyrklaff, M. Adrian, y J. Dubochet. *Evaporation during preparation of unsupported thin vitrified aqueous layers for cryo-electron microscopy*. J. Electron Microscopy Technique, 16(4):351–355, 1990.
- [32] H. Davies. *General preparation of material and staining of sections*. Methods in Molecular Biology, 117:1–11, 1999.
- [33] Dillon, R. William, y M. Goldstein. *Multivariate analysis: methods and applications*. John Wiley, New York, NY, USA, 1984.
- [34] E. Dimmeler, R. Marabini, P. Tittmann, y H. Gross. *Correlation of topographic surface and volume data from 3D electron microscopy*. J. Structural Biology, 2002. Under revision.
- [35] S. Dowdy y S. Wearden. *Statistics for Research*. John Wiley & Sons, New York, 1991.
- [36] K. H. Downing y D. A. Grano. *Analysis of photographic emulsions for electron microscopy of two-dimensional crystalline specimens*. Ultramicroscopy, 7:381–404, 1982.
- [37] D. E. Dudgeon y R. M. Mersereau. *Multidimensional digital signal processing*. Prentice-Hall, 1984.
- [38] A. Engel y D. J. Muller. *Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope*. Nature Structural Biology, 7(9):715–718, 2000.
- [39] K. B. Eom. *Long-correlation image models for textures with circular and elliptical correlation structures*. IEEE Trans. Image Processing, 10(7):1047–1055, 2001.
- [40] N. A. Farrow y F. P. Ottensmeyer. *A posteriori of relative projection directions of arbitrarily oriented macromolecules*. J. Optical Society of America A, 9(10):1749–1760, 1992.
- [41] N. A. Farrow y F. P. Ottensmeyer. *Automatic 3D alignment of projection images of randomly oriented objects*. Ultramicroscopy, 52:141–156, 1993.
- [42] J. J. Fernández y J. M. Carazo. *Analysis of structural variability within two-dimensional biological crystals by a combination of patch averaging techniques and self organizing maps*. Ultramicroscopy, 65:81–93, 1996.

- [43] J. J. Fernández, J. Sanjurjo, y J. M. Carazo. *A spectral estimation approach to contrast transfer function detection in electron microscopy*. *Ultramicroscopy*, 64:267–295, 1997.
- [44] J. J. Fernández, J. M. Valpuesta, J. R. Sanjurjo, J. L. Carrascosa, y J. M. Carazo. *Image processing of two-dimensional biological crystals in transmission electron microscopy*. En *Proc. VII National Symposium on Pattern Recognition and Image Analysis*, tomo 1, págs. 221–226. 1997.
- [45] Y. Fong, L. Moldawer, y S. Lowry. *Experimental and clinical applications of molecular cell biology in nutrition and metabolism*. *J. Parenteral & Enteral Nutrition*, 16(5):477–486, 1992.
- [46] J. Frank. *The envelope of electron microscopic transfer functions for partially coherent illumination*. *Optik*, 38:519–536, 1973.
- [47] J. Frank. *Three Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 1996.
- [48] J. Frank y P. Penczek. *On the correction of the contrast transfer function in biological electron microscopy*. *Optik*, 98:125–9, 1995.
- [49] J. Frank, P. Penczek, y W. Liu. *Alignment, classification, and three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice*. *Scanning Microscopy Supplement*, 6:11–20, 1996.
- [50] K. G. Fuchs, P. Tittmann, K. Krusche, y H. Gross. *Reconstruction and representation of surface data from two-dimensional crystalline biological macromolecules*. *Bioimaging*, 3:12–24, 1995.
- [51] S. D. Fuller, S. J. Butcher, R. H. Cheng, y T. S. Baker. *Three-dimensional reconstruction of icosahedral particles - the uncommon line*. *J. Structural Biology*, 116:48–55, 1996.
- [52] S. S. Furuie, G. T. Herman, T. K. Narayan, P. E. Kinahan, J. S. Karp, R. M. Lewitt, y S. Matej. *A methodology for testing for statistically significant differences between fully 3D PET reconstruction algorithms*. *Physics in Medicine & Biology*, 39:341–354, 1994.
- [53] I. S. Gabashvili, R. K. Agrawal, C. M. Spahn, R. A. Grassucci, D. I. Svergun, J. Frank, y P. Penczek. *Solution structure of the E. coli 70S ribosome at 11.5 Å resolution*. *Cell*, 100:537–49, 2000.

- [54] E. Garduño y G. T. Herman. *Optimization of basis functions for both reconstruction and visualization*. En G. T. H. Sébastien Fourey y T. Y. Kong, editores, *Electronic Notes in Theoretical Computer Science*, tomo 46. Elsevier Science Publishers, 2001.
- [55] P. Gilbert. *Iterative methods for the three-dimensional reconstruction of an object from projections*. *J. Theoretical Biology*, 36:105–117, 1972.
- [56] H. S. Ginsberg, editor. *The adenoviruses*. Plenum Press, New York, 1984.
- [57] R. Gordon, R. Bender, y G. T. Herman. *Algebraic reconstruction techniques (ART) for three-dimensional electron microscopy and X-ray photography*. *J. Theoretical Biology*, 29:471–481, 1970.
- [58] N. Grigorieff, T. A. Ceska, K. H. Downing, J. M. Baldwin, y R. Henderson. *Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin*. *J. Molecular Biology*, 259:393–421, 1996.
- [59] H. Guan y R. Gordon. *A projection access order for speedy convergence of ART (algebraic reconstruction technique): a multilevel scheme for computed tomography*. *Physics in Medicine & Biology*, 39:2005–2022, 1994.
- [60] A. Guasch, A. Parraga, J. Pous, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa, y M. Coll. *Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the bacteriophage  $\phi$ 29 connector particle*. *FEBS Letters*, 430:283–287, 1998.
- [61] P. W. Hawkes. *The electron microscope as a structure projector*. En J. Frank, editor, *Electron Tomography*, págs. 17–38. Plenum, 1992.
- [62] W. Z. He, J. M. Carazo, y J. J. Fernández. *A new phase consistency criterion and its application in electron crystallography*. *Ultramicroscopy*, 85:73–91, 2000.
- [63] R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, y K. H. Downing. *Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy*. *J. Molecular Biology*, 213:899–929, 1990.
- [64] G. T. Herman. *Image Reconstruction from Projections: The Fundamentals of Computerized Tomography*. Academic Press, New York, 1980.

- [65] G. T. Herman. *Geometry of Digital Spaces*. Birkhauser, Boston, 1998.
- [66] G. T. Herman y L. B. Meyer. *Algebraic reconstruction techniques can be made computationally efficient*. IEEE Trans. Medical Imaging, 12(3):600–609, 1993.
- [67] G. T. Herman y D. Ro. *Image recovery using iterative data refinement with relaxation*. Optical Engineering, 29:513–523, 1990.
- [68] A. Hoenger y U. Aebi. *3-D reconstructions from ice-embedded and negatively stained biomacromolecular assemblies: A critical comparison*. J. Structural Biology, 117:99–116, 1996.
- [69] A. K. Jain. *Fundamentals of digital image processing*. Prentice-Hall, 1989.
- [70] S. Jangi y Y. Jain. *Embedding spectral analysis in equipment*. IEEE Spectrum, 28(2):40–43, 1991.
- [71] B. K. Jap, P. J. Walian, y K. Gehring. *Structural architecture of an outer membrane channel as determined by electron crystallography*. Nature, 350:167–169, 1991.
- [72] M. Jatteau y C. Berche. *Review of image reconstruction techniques in medical transaxial computed tomography*. Annals of Radiology, 26(1):13–22, 1983.
- [73] G. M. Jenkins y D. G. Watts. *Spectral Analysis and its applications*. Holden Day, 1968.
- [74] A. Kak y M. Slaney. *Principles of computerized tomographic imaging*. IEEE Press, 1987.
- [75] O. Kallioniemi. *Biochip technologies in cancer research*. Annals of Medicine, 33(2):142–147, 2001.
- [76] G. G. Karady y F. Amarh. *Signature analysis for leakage current waveforms of polluted insulators*. En *Proc. of the IEEE 1999 Conference on Transmission and Distribution Conference*, tomo 2, págs. 806–811. 1999.
- [77] R. L. Kashyap. *Characterization and estimation of two-dimensional ARMA models*. IEEE Trans. Information Theory, IT-30(5):736–745, 1984.

- [78] J. Kay. *Statistical models for PET and SPECT data*. Statistical Methods in Medical Research, 3(1):5–21, 1994.
- [79] S. M. Kay. *Modern Spectral Estimation*. Prentice Hall, 1988.
- [80] S. M. Kay. *Spectral estimation*. En J. S. Lim y A. V. Oppenheim, editores, *Advanced Topics in Signal Processing*, págs. 58–122. Prentice Hall, 1988.
- [81] W. Kühlbrandt, D. N. Wang, y Y. Fujiyoshi. *Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography*. Nature, 367:614–621, 1994.
- [82] Lamzin, V. S. y Perrakis, A. *Current state of automated crystallographic data analysis*. Nature Structural Biology, 7 Suppl.:978–981, 2000.
- [83] J. P. Langmore y M. F. Smith. *Quantitative energy-filtered electron microscopy of biological molecules in ice*. Ultramicroscopy, 46:349–373, 1992.
- [84] S. Lanzavecchia, P. L. Bellon, y M. Radermacher. *Fast and accurate three-dimensional reconstruction from projections with random orientations via radon transforms*. J. Structural Biology, 128(2):152–164, 1999.
- [85] M. Lawrence, M. Jaffer, y B. Sewell. *The application of the maximum entropy method to electron microscopic tomography*. Ultramicroscopy, 31(3):285–301, 1989.
- [86] F. A. Lenz. *Transfer of image information in the electron microscope*. En U. Valdrè, editor, *Electron Microscopy in Material Sciences*, págs. 540–569. Academic Press, 1971.
- [87] R. Lewitt. *Reconstruction algorithms: transform methods*. Proc. IEEE, 71(3):390–408, 1983.
- [88] R. M. Lewitt. *Multidimensional digital image representations using generalized Kaiser-Bessel window functions*. J. Optical Society of America A, 7:1834–1846, 1990.
- [89] J. S. Lim. *Multidimensional spectral estimation*. En T. Huang, editor, *Advances in Computer Vision and Image Processing*, tomo 2, págs. 275–322. Jai Press, 1986.

- [90] S. Lipschutz. *Algebra lineal*. Schaum. McGraw-Hill, 1991.
- [91] O. Llorca, M. G. Smyth, J. L. Carrascosa, K. R. Willison, R. Radermacher, S. Steinbacher, y J. M. Valupuesta. *3D reconstruction of the ATP-bound form of CCT reveals assymetric folding conformation of a type II chaperonin*. *Nature Structural Biology*, 7:639–642, 1999.
- [92] S. J. Ludtke, P. R. Baldwin, y W. Chiu. *EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions*. *J. Structural Biology*, 128:82–97, 1999.
- [93] S. J. Ludtke, J. Jakana, J. Song, D. T. Chuang, y W. Chiu. *A 11.5 Å single particle reconstruction of GroEL using EMAN*. *J. Molecular Biology*, 314:253–262, 2001.
- [94] A. S. Madhukumar y A. B. Premkumar. *Wavelet Quantization Of Noisy Speech Using Constrained Wiener Filtering*. En *Proc. of the 31st ASILOMAR Conference on Signals, Systems, and Computers*. 1997.
- [95] E. Mancini, M. Clarke, B. Gowen, T. Rutten, y S. Fuller. *Cryo-electron microscopy reveals the functional organization of an enveloped virus, Semliki Forest virus*. *Molecular Cell*, 5(2):255–266, 2000.
- [96] R. Marabini, G. T. Herman, y J. M. Carazo. *3D reconstruction in electron microscopy using ART with smooth spherically symmetric volume elements (blobs)*. *Ultramicroscopy*, 72:53–65, 1998.
- [97] R. Marabini, I. M. Masegosa, S. M. M. C. San Martín, J. J. Fernández, C. V. L. G. de la Fraga, y J. M. Carazo. *Xmipp: An image processing package for electron microscopy*. *J. Structural Biology*, 116:237–240, 1996.
- [98] R. Marabini, E. Rietzel, R. Schröder, G. T. Herman, y J. M. Carazo. *Three-dimensional reconstruction from reduced sets of very noisy images acquired following a single-axis tilt schema: Application of a new three-dimensional reconstruction algorithm and objective comparison with weighted backprojection*. *J. Structural Biology*, 120:363–371, 1997.
- [99] L. D. Marks. *Wiener-filter enhancement of noisy HREM images*. *Ultramicroscopy*, 62:43–52, 1996.

- [100] M. C. S. Martin, C. Gruss, y J. M. Carazo. *Six molecules of SV40 large T Antigen assemble in a propeller-shaped particle around a channel*. J. Molecular Biology, 268:15–20, 1997.
- [101] M. C. S. Martin, M. Radermacher, B. Wolpensinger, A. Engel, C. S. Miles, N. E. Dixon, y J. M. Carazo. *Three-dimensional reconstructions from cryoelectron microscopy images reveal an intimate complex between helicase DnaB and its loading partner DnaC*. Structure with Folding Design, 6:501–509, 1998.
- [102] S. Matej, S. S. Furuie, y G. T. Herman. *Relevance of statistically significant differences between reconstruction algorithms*. IEEE Trans. Image Processing, 5:554–556, 1996.
- [103] S. Matej, G. T. Herman, T. K. Narayan, S. S. Furuie, R. M. Lewitt, y P. E. Kinahan. *Evaluation of task-oriented performance of several fully 3D PET reconstruction algorithms*. Physics in Medicine & Biology, 39:355–367, 1994.
- [104] S. Matej y R. M. Lewitt. *Efficient 3D grids for image reconstruction using spherically-symmetric volume elements*. IEEE Trans. Nuclear Science, 42:1361–1370, 1995.
- [105] S. Matej y R. M. Lewitt. *Practical considerations for 3-D image reconstruction using spherically symmetric volume elements*. IEEE Trans. Medical Imaging, 15:68–78, 1996.
- [106] B. Mazur. *Developing transgenic grains with improved oils, proteins and carbohydrates*. En *Novartis Foundation Symposium*, tomo 236, págs. 233–239. 2001.
- [107] G. A. Meek. *Practical Electron Microscopy for Biologists*. John Wiley and Sons, 1982.
- [108] D. C. Montgomery y G. C. Runge. *Applied Statistics and Probability for Engineers*. John Wiley & Sons, New York, 1994.
- [109] Mood, A. M., Graybill, F. A., y Boes, D. C. *Introduction to the theory of statistics*. McGraw-Hill, New York, 1974.

- [110] F. Mouche, N. Boisset, y P. Penczek. *Lumbricus terrestris* hemoglobin - the architecture of linker chains and structural variation of the central toroid. J. Structural Biology, 133(2 & 3):176–192, 2001.
- [111] F. Mueller, I. Sommer, P. Baranov, R. Matadeen, M. Stoldt, J. Wohnert, M. Gorch, M. van Heel, y R. Brimacombe. *The 3D arrangement of the 23 S and 5 S rRNA in the Escherichia coli 50 S ribosomal subunit based on a cryo-electron microscopic reconstruction at 7.5 Å resolution*. J. Molecular Biology, 298(1):35–59, 2000.
- [112] D. J. Müller, A. Engel, J. L. Carrascosa, y M. Vélez. *The bacteriophage  $\phi$ 29 head-tail connector imaged at high resolution with the atomic force microscope in buffer solution*. EMBO Journal, 16:2547–2553, 1997.
- [113] F. Natterer. *Algorithms in tomography*. En *Proceedings State of the Art in Numerical Analysis*. Ork, 1996.
- [114] F. Natterer. *Numerical methods in tomography*. En *Acta numerica*, tomo 8, capítulo 4. Cambridge University Press, 1999.
- [115] F. Natterer y F. Wübbeling. *Mathematical methods in image reconstruction*. Monographs on mathematical modeling and computation. SIAM, Philadelphia, 2001.
- [116] D. Nelson y M. Cox. *Lehninger Principles of biochemistry*. Worth publishers, 3rd. edición, 2000.
- [117] E. Nogales, S. Wolf, y K. Downing. *Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography*. Nature, 391(6663):199–203, 1998.
- [118] A. V. Oppenheim y R. W. Schaffer. *Discrete-Time Signal Processing*. Prentice Hall, 1989.
- [119] A. Papoulis. *Probability, Random Variables and Stochastic Processes*. McGraw Hill, 1991.
- [120] P. Penczek, M. Radermacher, y J. Frank. *Three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice*. Ultramicroscopy, 40:33–53, 1992.



- [121] P. A. Penczek, R. A. Grasucci, y J. Frank. *The ribosome at improved resolution: new techniques for merging and orientation refinement in 3D cryo-electron microscopy of biological particles*. Ultramicroscopy, 53(3):251–270, 1994.
- [122] P. A. Penczek, J. Zhu, y J. Frank. *A common-lines based method for determining orientations for  $N \geq 3$  particle projections simultaneously*. Ultramicroscopy, 63:205–218, 1996.
- [123] J. P. W. Pluim, J. B. A. Maintz, y M. A. Viergever. *Image registration by maximization of combined mutual information and gradient information*. IEEE Trans. Medical Imaging, 19(8):809–814, 2000.
- [124] W. K. Pratt. *Digital image processing*. Wiley-Interscience, 2nd edición, 1991.
- [125] W. Press, S. Teukolsky, W. Vetterling, y B. Flannery. *Numerical recipes in C*. Cambridge University Press, 2 edición, 1992.
- [126] M. Radermacher. *Weighted back-projection methods*. En J. Frank, editor, *Electron Tomography*, págs. 91–115. Plenum, 1992.
- [127] M. Radermacher. *3-dimensional reconstruction from random projections - orientational alignment via random transforms*. Ultramicroscopy, 2:271–282, 1994.
- [128] M. Radermacher, T. Ruiz, H. Wiczorek, y G. Gruber. *The structure of the V(1)-ATPase determined by three-dimensional electron microscopy of single particles*. J. Structural Biology, 135(1):26–37, 2001.
- [129] E. Rietzel, P. Schorsch, H. Müller, R. Marabini, C. O. S. Sorzano, J. M. Carazo, U. Schimpf, C. Leue, K. C. Holmes, y R. Schröder. *Zero-loss P-contrast in EFTEM*. En *Proc. of the 14th International Congress on Electron Microscopy*, tomo IV, págs. 421–422. 1998.
- [130] M. F. Schmid, R. Dargahi, y M. W. Tam. *SPECTRA: a system for processing electron images of crystals*. Ultramicroscopy, 48:251–264, 1993.
- [131] R. R. Schröder, E. Hofmann, y J. F. Menetret. *Zero-loss energy filtering as improved imaging mode in cryo-electron microscopy of frozen-hydrated specimens*. J. Structural Biology, 105:28–34, 1990.

- [132] D. Sherwood. *Crystals, X-rays and Proteins*. Longman, 1976.
- [133] U. Skoglund, L. G. Ofverstedt, R. Burnett, y G. Bricogne. *Maximum-entropy three-dimensional reconstruction with deconvolution of the contrast transfer function: A test application with adenovirus*. J. Structural Biology, 117:173–188, 1996.
- [134] P. R. Smith y J. Kistler. *Surface reliefs computed from micrographs of heavy metal-shadowed specimens..* J. Ultrastruct. Res., 61:124–133, 1977.
- [135] P. R. Smith y J. Kistler. *Surface reliefs computed from micrographs of isolated heavy metal shadowed particles..* J. Ultrastruct. Res., 71:25–36, 1980.
- [136] C. O. S. Sorzano, J. J. Fernández, R. Marabini, G. T. Herman, Y. Censor, y J. M. Carazo. *Transfer function restoration in 3D electron microscopy via iterative data refinement*. En *Proc. of the sixth international meeting on fully three-dimensional image reconstruction in radiology and nuclear medicine*, págs. 133–136. 2001.
- [137] C. O. S. Sorzano, R. Marabini, N. Boisset, E. Rietzel, R. Schröder, G. T. Herman, y J. M. Carazo. *The effect of overabundant projection directions on 3D reconstruction algorithms*. J. Structural Biology, 133(2):108–118, 2001.
- [138] H. Stark, E. V. Orlova, J. Rinke-Appel, N. Junke, F. Mueller, M. Rodnina, W. Wintermeyer, R. Brimacombe, y M. van Heel. *Arrangement of tRNAs in pre- and posttranslocational ribosomes revealed by electron cryomicroscopy*. Cell, 88:19–29, 1997.
- [139] M. Stewart. *Introduction to the computer image processing of electron micrographs of two-dimensionally ordered biological structures*. J. Electron Microscopy Technique, 9:301–324, 1988.
- [140] R. Tait. *The application of molecular biology*. Current Issues in Molecular Biology, 1(1-2):1–12, 1999.
- [141] I. M. Thomas y M. F. Schmid. *A cross-correlation method for merging electron crystallographic image data*. J. Optical Society of America, 1(4):167–173, 1995.

- [142] C. Toyoshima y N. T. P. Unwin. *Contrast transfer for frozen-hydrated specimens: determination from pairs of defocused images*. Ultramicroscopy, 25:279–292, 1988.
- [143] C. Toyoshima, K. Yonekura, y H. Sasabe. *Contrast transfer for frozen-hydrated specimens II: amplitude contrast at very low frequencies*. Ultramicroscopy, 48:165–176, 1993.
- [144] H. J. Trussell. *A priori knowledge in algebraic reconstruction methods*. En T. S. Huang, editor, *Advances in Computer Vision and Image Processing*, tomo 1, págs. 265–316. Jai Press, 1984.
- [145] V. Tsuprun, D. Anderson, y E. H. Egelman. *The bacteriophage  $\phi$ -29 head-tail connector shows 13-fold symmetry in both hexagonally packed arrays and as single particles*. Biophysical Journal, 66:2139–2150, 1994.
- [146] M. Unser, B. Trus, y A. Steven. *Normalization procedures and factorial representations for classification of correlation-aligned images: a comparative study*. Ultramicroscopy, 30(3):299–310, 1989.
- [147] P. Unwin y R. Henderson. *Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens*. J. Molecular Biology, 94:425–440, 1975.
- [148] M. Valle, C. Gruss, L. Halmer, J. Carazo, y L. Donate. *Large T-Antigen double hexamers imaged at the simian virus 40 origin of replication*. Molecular and Cellular Biology, 20:34–41, 2000.
- [149] J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa, y R. Henderson. *Analysis of electron microscope images and electron diffraction patterns of thin crystals of  $\phi$ -29 connectors in ice*. J. Molecular Biology, 240:281–287, 1994.
- [150] M. van Heel. *Angular reconstitution: A posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction*. Ultramicroscopy, 21:111–124, 1987.
- [151] M. van Heel. *Similarity measures between images*. Ultramicroscopy, 21:95–100, 1987.
- [152] S. B. Vardeman. *Statistics for engineering problem solving*. Academic Press, Boston, 1994.

- [153] R. H. Wade. *A brief look at imaging and contrast transfer*. Ultramicroscopy, 46:145–156, 1992.
- [154] R. H. Wade y J. Frank. *Electron microscope transfer functions for partially coherent axial illumination and chromatic defocus spread*. Optik, 49:81–92, 1977.
- [155] W. Wikoff, L. Liljas, R. Duda, H. Tsuruta, R. Hendrix, y J. Johnson. *Topologically linked protein rings in the bacteriophage HK97 capsid*. Science, 289(5847):2129–2133, 2000.
- [156] C. Xu, W. Rice, W. He, y D. Stokes. *A Structural Model for the Catalytic Cycle of Ca<sup>2+</sup>-ATPase*. To be published.
- [157] P. Yale. *Geometry and symmetry*. Dover Publications Inc., 1988.
- [158] M. Yeager, V. Unger, y A. Mitra. *Three-dimensional structure of membrane proteins determined by two-dimensional crystallization, electron cryomicroscopy, and image analysis*. Methods in Enzymology, 294:135–180, 1999.
- [159] Z. H. Zhou y W. Chiu. *Prospects for using an IVEM with a FEG for imaging macromolecules towards atomic resolution*. Ultramicroscopy, 49:407–416, 1993.
- [160] Z. H. Zhou, S. Hardt, B. Wang, M. B. Sherman, J. Jakana, y W. Chiu. *CTF determination of images of ice-embedded single particles using a graphics interface*. J. Structural Biology, 116:216–222, 1996.
- [161] J. Zhu y J. Frank. *Accurate retrieval of transfer function from defocus series*. En *Proc. 13th International Congress on Electron Microscopy*, tomo 1, págs. 465–466. 1994.
- [162] J. Zhu, P. A. Penczek, R. Schröder, y J. Frank. *Three-dimensional reconstruction with contrast transfer function correction from energy-filtered cryoelectron micrographs: Procedure and application to the 70S Escherichia coli ribosome*. J. Structural Biology, 118:197–219, 1997.
- [163] X. Zou. *Electron crystallography of inorganic structures - Theory and practice*. Tesis Doctoral, Stockholm Univ., 1995.