

MÁSTER EN TRATAMIENTO ESTADÍSTICO-COMPUTACIONAL DE LA
INFORMACIÓN

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Estimación robusta en el procesamiento de imágenes de criomicroscopía electrónica

Andrés Contreras Santos



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS MATEMÁTICAS

&

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE TELECOMUNICACIÓN

Tutor: Carlos Óscar Sorzano Sánchez
Ponente: Marina Mendiburu-Eliçabe Garganta

Madrid, junio 2026

Abstract

Single-particle cryo-electron microscopy is a powerful technique for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules. However, the images acquired in this setting are characterized by extremely low signal-to-noise ratios and by the presence of errors introduced at different stages of the image-processing pipeline. In particular, particle picking, 2D classification and alignment may introduce outliers or misaligned particles within a class, degrading the quality of the resulting class averages when standard non-robust estimators are used.

This work studies the application of robust statistical estimation methods to the computation of 2D class averages in cryo-electron microscopy. The problem is formulated as a signal estimation task in which the underlying class representative must be recovered from noisy and potentially contaminated observations. Special attention is given to M-estimators and their numerical implementation through iteratively reweighted least squares algorithms. Several formulations are considered, including estimators defined in real space, estimators defined in Fourier space, and a joint strategy combining information from both domains. In addition, a Gaussian-mixture-based reweighting procedure is explored as a way of exploiting the global structure of the weights produced by robust estimators to improve their outlier rejection capabilities through more extreme weight distributions.

The proposed methods are evaluated on synthetic data, where the level and nature of contamination can be controlled, and on experimental cryo-EM data. The results show that robust estimators can reduce the influence of outlying or misaligned particles and may improve the quality of class averages in contaminated settings. At the same time, the experiments highlight the difficulty of applying classical robust estimation ideas in the extremely noisy regime typical of cryo-EM. Overall, the work provides a statistical and computational framework for robust class-average estimation and identifies several directions for further improvement, including more effective aggregation of local weights and more flexible anomaly-detection strategies.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Estructura de la memoria	1
1.2. Criomicroscopía electrónica	2
1.2.1. Descripción y aplicaciones	2
1.2.2. Adquisición y formación de imágenes	3
1.2.3. Reconstrucción de partícula única en cryo-EM	4
1.3. Problema abordado	5
1.3.1. Clasificación 2D y representantes de clase	5
1.3.2. Formulación estadística del problema	5
1.3.3. Estado del arte	6
1.4. Objetivos y contribuciones	12
2. Metodología	13
2.1. Fundamentos de estimación robusta	13
2.1.1. Modelo de contaminación	13
2.1.2. Medidas de robustez	14
2.2. Estimadores M	15
2.2.1. Modelo de localización	15
2.2.2. Estimadores M y máxima verosimilitud	16
2.2.3. Propiedades teóricas	16
2.2.4. Extensión regularizada y formulación MAP	17
2.2.5. Estimadores M equivariantes por cambios de escala	18
2.2.6. Algoritmo IRLS	18
2.2.7. Estimadores M redescendentes	20
2.2.8. Estimadores M multidimensionales	21
2.3. Estimadores M en cryo-EM	23
2.3.1. Estimación en el espacio real	23
2.3.2. Estimación en el espacio de Fourier	23
2.4. Estimación conjunta en espacio real y espacio de Fourier	24
2.5. Reponderación basada en mezclas gaussianas	27
2.5.1. Extracción de puntuaciones globales	28
2.5.2. Redistribución de pesos mediante un modelo de mezcla gaussiano	28
2.5.3. Condiciones de aplicación de la reponderación	29
3. Resultados	32
3.1. Evaluación en datos sintéticos	32
3.1.1. Datos utilizados: generación sintética	32
3.1.2. Métricas evaluadas	33

3.1.3. Métodos evaluados	34
3.1.4. Resultados por método	35
3.1.5. Comparativa	45
3.2. Resultados en datos experimentales	46
3.2.1. Métricas evaluadas	46
3.2.2. Imágenes obtenidas	46
4. Conclusiones	49
4.1. Líneas de desarrollo futuro	50

Capítulo 1

Introducción

Este trabajo estudia la aplicación de técnicas de estimación robusta en el procesamiento de imagen de criomicroscopía electrónica, una técnica utilizada para tomar imágenes de macromoléculas biológicas con el fin de determinar su estructura tridimensional. El objetivo de la estimación robusta es reducir la influencia de observaciones atípicas o erróneas sobre las estimaciones producidas, de modo que los modelos utilizados toleren una cierta proporción de este tipo de errores. Esto es especialmente relevante en criomicroscopía electrónica, donde es común que se produzcan observaciones atípicas en forma de errores de selección, clasificación y alineamiento. En este contexto, los métodos de estimación robusta proporcionan un marco para diseñar procedimientos menos dependientes de las hipótesis ideales de ruido gaussiano y ausencia de contaminación.

La memoria se centra en estudiar la aplicación de técnicas de estimación robusta al cálculo de representantes de clase en criomicroscopía electrónica, con especial atención a los estimadores M y a su implementación mediante esquemas iterativos de mínimos cuadrados ponderados. A lo largo del trabajo se combinan herramientas de estadística robusta, formulaciones en el espacio real y en el espacio de Fourier, y experimentos numéricos sobre datos sintéticos y experimentales, con el fin de evaluar la capacidad de estos métodos para mejorar la calidad de los promedios de clase en presencia de observaciones atípicas.

1.1. Estructura de la memoria

La memoria se organiza en cuatro capítulos principales. En el capítulo 1 se introduce el contexto general del trabajo. En primer lugar, se describen los fundamentos de la criomicroscopía electrónica y el proceso de reconstrucción de partícula única, prestando especial atención a la etapa de clasificación 2D y al papel que desempeñan los representantes de clase dentro del flujo de procesamiento. A continuación, se formula el problema de estimación de promedios de clase desde un punto de vista estadístico, se revisan algunos de los enfoques utilizados en la literatura y en los paquetes de *software* más relevantes, y se presentan los objetivos y contribuciones principales del trabajo.

El capítulo 2 está dedicado a la metodología. En él se introducen algunos conceptos básicos de estadística robusta como el modelo de contaminación, la función de influencia y el punto de ruptura. Posteriormente se estudian los estimadores M , su relación con la máxima verosimilitud, sus propiedades teóricas y su implementación mediante algoritmos IRLS. Estos métodos se adaptan después al problema concreto de estimación de promedios de clase en criomicroscopía electrónica, considerando formulaciones en el espacio real

y en el espacio de Fourier. Además, se propone una estrategia de estimación conjunta que combina información procedente de ambos dominios, así como un procedimiento de reponderación basado en modelos de mezcla gaussianos para explotar la información contenida en los pesos generados por los estimadores robustos.

En el capítulo 3 se presentan los resultados experimentales. La evaluación se realiza primero sobre datos sintéticos, lo que permite controlar de forma explícita el tipo y nivel de contaminación introducido en las imágenes y comparar los distintos métodos en un entorno conocido. Se describen los datos utilizados, las métricas de evaluación y los estimadores considerados, y se analizan los resultados obtenidos por cada método. A continuación, se estudia el comportamiento de los procedimientos propuestos sobre datos experimentales reales, evaluando la calidad visual y cuantitativa de los promedios de clase obtenidos.

Finalmente, el capítulo 4 recoge las conclusiones principales del trabajo. En él se discuten las ventajas y limitaciones observadas en los métodos robustos estudiados, así como las dificultades que aparecen al trasladar técnicas clásicas de estimación robusta al contexto específico de la criomicroscopía electrónica. La memoria concluye con una serie de posibles líneas de desarrollo futuro, orientadas a mejorar la agregación de información procedente de los pesos, extender los esquemas de detección de observaciones atípicas y validar los métodos propuestos sobre conjuntos de datos experimentales más amplios.

1.2. Criomicroscopía electrónica

1.2.1. Descripción y aplicaciones

La criomicroscopía electrónica, comúnmente conocida como cryo-EM (del inglés *Cryo-Electron Microscopy*), es una técnica utilizada para obtener información estructural de macromoléculas biológicas a partir de un gran número de proyecciones bidimensionales [1]. La determinación de la estructura tridimensional de dichas moléculas es fundamental para comprender los mecanismos de numerosos procesos biológicos, y constituye una herramienta útil en el diseño de fármacos y tratamientos médicos.

A diferencia de otras técnicas tradicionales como la cristalografía de rayos X, en cryo-EM las muestras biológicas no necesitan ser cristalizadas. En su lugar, se suspenden en una solución acuosa y se congelan casi instantáneamente mediante una inmersión en etano líquido enfriado con nitrógeno líquido. Este proceso de enfriamiento rápido, conocido como vitrificación, evita la formación de cristales de hielo y permite preservar las macromoléculas en un estado lo más cercano posible a sus condiciones fisiológicas reales.

Una característica fundamental de las imágenes de cryo-EM es su baja relación señal a ruido. Debido a la sensibilidad de las muestras biológicas, la dosis de electrones utilizada en el microscopio debe ser baja, lo que da lugar a imágenes extremadamente ruidosas. En consecuencia, el procesamiento posterior debe combinar grandes conjuntos de imágenes para recuperar una señal interpretable. Además, las distintas etapas del flujo de procesamiento pueden introducir errores que se manifiestan como observaciones atípicas en etapas posteriores. Por ello, los métodos de estadística robusta capaces de reducir la influencia de dichas observaciones tienen potencial para mejorar los resultados del proceso de reconstrucción.

1.2.2. Adquisición y formación de imágenes

En cryo-EM, la muestra se mantiene en condiciones criogénicas, lo cual permite conservarla en un estado próximo a su estado natural incluso en el interior del microscopio. Después, la muestra es introducida en un microscopio electrónico encargado de tomar las imágenes [1]. Sin embargo, para evitar que la radiación de electrones dañe las muestras biológicas, es necesario limitar la dosis de electrones utilizada por el microscopio. En consecuencia, las imágenes obtenidas contienen una señal muy débil y claramente dominada por el ruido experimental.

Desde una perspectiva matemática y computacional, el proceso de formación de la imagen se modela como una proyección bidimensional de una estructura tridimensional, degradada por la óptica del microscopio y por ruido aleatorio [2]. Denotando por $V(\mathbf{r})$ al potencial electrostático de la macromolécula, y asumiendo que el haz de electrones incide de forma paralela al eje óptico z , la proyección ideal bidimensional $p(x, y)$ puede escribirse como

$$p(x, y) := \int_{-\infty}^{+\infty} V(x, y, z) dz. \quad (1.1)$$

En la práctica, la imagen observada no corresponde con esta proyección ideal. La interacción de los electrones con los campos magnéticos de las lentes del microscopio y el desfase inducido mediante el desenfoque para generar contraste alteran la señal [3]. Este fenómeno óptico se modela en el dominio espacial mediante la convolución de la proyección ideal con la denominada *función de dispersión de punto* (PSF, del inglés *Point Spread Function*). Por lo tanto, incluso en un modelo sin ruido, la imagen observada $I(x, y)$ vendría dada por

$$I(x, y) = p(x, y) * h(x, y),$$

donde p es la proyección bidimensional ideal, $*$ es el operador de convolución y h es la PSF del microscopio.

Además de esto, la imagen se ve corrompida por una cantidad muy significativa de ruido $n(x, y)$, de tal forma que el modelo estándar para la formación de imágenes se puede expresar como

$$I(x, y) = p(x, y) * h(x, y) + n(x, y). \quad (1.2)$$

Este modelo admite una formulación especialmente sencilla en el dominio de Fourier. Aplicando el Teorema de la Sección Central (o Teorema de Proyección de Fourier), la transformada de Fourier de una proyección bidimensional es una sección plana de la transformada de Fourier del volumen original [2]. Para expresar el modelo en el dominio de Fourier, denotaremos por \hat{f} a la transformada de Fourier de una función $f : \mathbb{R}^m \rightarrow \mathbb{R}$, independientemente de la dimensión m del dominio de f . Definiendo $\mathbf{k} := (k_x, k_y)^T$ como las frecuencias espaciales bidimensionales, la ecuación (1.2) se expresa en el modelo en el dominio de Fourier como:

$$\hat{I}(\mathbf{k}) = \hat{V}(\mathbf{k}, 0) \cdot \text{CTF}(\mathbf{k}) + \hat{n}(\mathbf{k}) \quad (1.3)$$

donde $\text{CTF}(\mathbf{k})$ es la transformada de Fourier de la PSF, denominada *función de transferencia de contraste* o CTF por el inglés *Contrast Transfer Function* [2], [3]. El modelo de observación descrito en las ecuaciones (1.2) y (1.3) es la base de la mayoría de métodos modernos de estimación, alineamiento y reconstrucción tridimensional en el procesamiento de datos en cryo-EM [4]-[6].

En el resto del trabajo, se consideran tanto métodos definidos en el espacio real, como estimadores formulados directamente en el espacio de Fourier, así como algunos métodos que combinan información procedente de ambos dominios.

1.2.3. Reconstrucción de partícula única en cryo-EM

La reconstrucción de partícula única es una de las principales aplicaciones de la criomicroscopía electrónica. En esta técnica, el objetivo es estimar una estructura tridimensional a partir de un gran número de imágenes bidimensionales ruidosas, cada una correspondiente a una proyección de la molécula bajo una orientación desconocida. El flujo de procesamiento incluye varias etapas: alineamiento de fotogramas, estimación y corrección de la CTF, selección de partículas, clasificación 2D, obtención de un volumen inicial, refinamiento tridimensional y postprocesado.

Si bien se han desarrollado numerosas técnicas para resolver cada uno de los problemas expuestos anteriormente, todavía existen oportunidades de mejora en los diversos puntos del proceso [7]. Este trabajo se centrará en la etapa de clasificación 2D, y más concretamente, en la estimación de los representantes de clase una vez que las partículas han sido agrupadas y alineadas.

En la etapa de clasificación 2D se agrupan partículas que presentan proyecciones similares de la macromolécula. Como la orientación tridimensional y la posición en el plano de cada partícula son desconocidas, el problema combina una tarea de agrupamiento no supervisado con la estimación de parámetros de alineamiento. Debido a esto, los enfoques tradicionales como el *K-means* clásico resultan insuficientes si no se integran con alineamientos multireferencia iterativos o formulaciones probabilísticas [4].

Una vez obtenidos los parámetros de alineamiento y las clases, se calcula para cada una de las clases un *representante* o *promedio* de la misma. Dicho promedio actúa como un estimador de la señal subyacente a la clase, es decir, la proyección bidimensional libre de ruido de la macromolécula. La ventaja del promedio radica en el hecho de que la agregación de las imágenes de la clase aumenta la relación señal a ruido y permite obtener imágenes valiosas e interpretables. Sin embargo, la calidad del representante puede verse degradada por falsos positivos en la selección de partículas, errores de clasificación o alineamientos incorrectos.

En cryo-EM, todas las etapas del procesamiento de imagen, incluida la clasificación 2D y la estimación de representantes de clase, se ven dificultadas por diversas limitaciones presentes en la técnica.

Desde el punto de vista estadístico, la principal dificultad reside en la muy baja relación señal a ruido de las partículas individuales. En este régimen, los errores de selección, clasificación y alineamiento son prácticamente inevitables y pueden propagarse a las etapas posteriores del procesamiento. Por tanto, la estimación de promedios de clase no debe entenderse únicamente como un problema de reducción de ruido, sino también como un problema de estimación bajo contaminación.

Desde el punto de vista computacional, los conjuntos de datos de cryo-EM pueden contener cientos de miles o millones de partículas, lo que implica un elevado coste en memoria y tiempo de cómputo. Por ello, cualquier método aplicable en este contexto debe ser no solo estadísticamente estable, sino también computacionalmente viable. Esta restricción hace que sea necesario considerar su coste computacional y la posibilidad de implementarlos mediante esquemas iterativos sencillos.

1.3. Problema abordado

1.3.1. Clasificación 2D y representantes de clase

La clasificación 2D y los representantes de clase cumplen varias funciones importantes dentro de la reconstrucción de partícula única. En primer lugar, constituyen uno de los primeros puntos del procesamiento en los que la agregación de partículas permite obtener imágenes con una relación señal a ruido suficiente para ser interpretables. Por ello, los promedios de clase proporcionan información temprana sobre la calidad del conjunto de datos y pueden guiar las etapas posteriores de reconstrucción y modelado. En segundo lugar, la clasificación 2D permite detectar falsos positivos procedentes de la selección de partículas, ya que las partículas mal seleccionadas, al no compartir una señal estructural homogénea, tienden a agruparse en clases de baja calidad que pueden identificarse a partir de sus representantes [8]. Finalmente, en algunos flujos de procesamiento, los promedios de clase pueden utilizarse también como información auxiliar para etapas posteriores, por ejemplo en la obtención de volúmenes iniciales [9].

Estas funciones hacen que la calidad de los representantes de clase tenga un impacto práctico relevante. Sin embargo, cuando una clase contiene partículas que no comparten la señal subyacente de la clase, la calidad del promedio muestral puede verse degradada. Esta situación motiva formular el cálculo del representante como un problema de estimación robusta.

A partir de este punto, se considera una única clase 2D obtenida mediante un procedimiento previo de clasificación y alineamiento. El objetivo es estimar una imagen representativa de dicha clase a partir de n partículas alineadas y_1, \dots, y_n , que comparten idealmente una misma señal subyacente pero pueden incluir observaciones contaminadas por errores de selección, clasificación o alineamiento.

1.3.2. Formulación estadística del problema

La estimación de representantes de clase admite una formulación estadística relativamente sencilla, ya que en este punto del proceso se asume que se han calculado previamente tanto las asignaciones de cada imagen a sus respectivas clases como los parámetros de alineamiento asociados a cada partícula. Si nos restringimos a las imágenes asignadas a una única clase y suponemos que dichas imágenes se encuentran correctamente alineadas, entonces todas ellas deberían corresponder a una misma proyección bidimensional de la macromolécula subyacente y ocupar una posición común dentro del plano de la imagen.

No obstante, esta hipótesis debe entenderse como una idealización del problema. Su validez depende de que tanto la clasificación como la estimación de los parámetros de alineamiento se hayan realizado de forma correcta, una suposición que puede resultar excesivamente optimista en la práctica. En [10] se muestra que, en cryo-EM, una fracción significativa de las partículas de un conjunto de datos típico puede encontrarse desalineada o mal clasificada. En consecuencia, la estimación del representante de clase no debe interpretarse únicamente como un problema de reducción de ruido, sino también como un problema potencialmente afectado por errores gruesos y observaciones atípicas, lo que proporciona una primera motivación para considerar métodos de estimación robusta.

Bajo la hipótesis de correcta clasificación y alineamiento, el modelo de formación de imagen descrito en la ecuación (1.3) permite expresar, para la partícula i -ésima y su

j -ésimo coeficiente en el espacio de Fourier,

$$\hat{y}_{ij} = \hat{H}_{ij}\hat{x}_j + \hat{n}_{ij}, \quad (1.4)$$

donde \hat{x}_j representa la verdadera transformada de Fourier de la estructura subyacente en la frecuencia asociada al coeficiente j -ésimo.

La dependencia del coeficiente \hat{H}_{ij} , que modela el efecto de la CTF, respecto de la imagen i se debe a que las partículas no necesariamente se adquieren bajo idénticas condiciones de desenfoque del microscopio, entre otros factores experimentales. En este trabajo se supondrán conocidos dichos coeficientes \hat{H}_{ij} , dado que habitualmente pueden estimarse con buena precisión en etapas previas del procesamiento. En el caso de que los efectos de la CTF hayan sido corregidos previamente, basta tomar $\hat{H}_{ij} = 1$.

La ecuación (1.4) no tiene una expresión igualmente simple en el espacio real, puesto que el efecto de la CTF se modela mediante una convolución con la PSF. Sin embargo, si se suponen corregidos los efectos de la CTF, entonces el modelo en el espacio real puede escribirse simplemente como

$$y_{ij} = x_j + n_{ij}, \quad (1.5)$$

donde x_j representa la proyección del volumen tridimensional subyacente sobre el píxel j .

Una de las suposiciones más habituales en numerosos métodos clásicos de cryo-EM, tanto en el espacio real como en el espacio de Fourier, es modelar el ruido como gaussiano e independiente. Más concretamente, se suele asumir que, fijado un píxel o frecuencia j , los términos de ruido de las distintas imágenes son independientes e idénticamente distribuidos,

$$n_{ij} \sim \mathcal{N}(0, \sigma_j^2), \quad i = 1, \dots, n.$$

Esta formulación permite que la varianza dependa de j , pero no de la imagen i . En el espacio de Fourier, al tratarse de coeficientes complejos, se adopta la hipótesis análoga

$$\hat{n}_{ij} \sim \mathcal{N}(\mathbf{0}, \sigma_j^2 I).$$

Este modelo es habitual en la literatura de cryo-EM [4], [6].

Sin embargo, esta hipótesis es principalmente una aproximación computacional conveniente, y no una descripción física exacta del proceso de adquisición en cryo-EM. En [11], los autores señalan que, si bien este modelo de ruido es una aproximación razonable, también posee ciertas lagunas, siendo la hipótesis de independencia entre píxeles especialmente discutible. Esto se debe a que diversos factores experimentales como la óptica del microscopio, la estructura del hielo circundante y la heterogeneidad estructural de las partículas inducen correlaciones espaciales en el ruido observado.

En conclusión, bajo el modelo descrito en las ecuaciones (1.4) y (1.5), la construcción de un representante de clase puede formularse como un problema de estimación, donde el parámetro de interés es la señal subyacente \hat{x}_j en el espacio de Fourier, o equivalentemente x_j en el espacio real. No obstante, el proceso de estimación puede verse afectado tanto por contaminación estructural derivada de errores de clasificación o alineamiento como por desviaciones respecto a las hipótesis sobre el ruido. Ambas consideraciones proporcionan una motivación natural para estudiar estimadores robustos frente a observaciones atípicas, distribuciones contaminadas o desviaciones moderadas del modelo probabilístico ideal.

1.3.3. Estado del arte

La estimación de promedios de clase no suele aparecer en los flujos modernos de cryo-EM como una etapa independiente, sino integrada dentro de los algoritmos de clasificación

2D. Por ello, para situar el problema abordado en este trabajo, resulta útil revisar cómo los principales paquetes de procesamiento formulan dicha clasificación y qué tipo de estimadores de promedios de clase se obtienen como consecuencia de sus modelos.

El objetivo de esta sección no es describir exhaustivamente las implementaciones de estos programas, sino identificar los elementos estadísticos más relevantes para este trabajo: el modelo probabilístico asumido para las partículas, el tratamiento de las variables latentes de clase y alineamiento, la forma en que se actualizan los representantes de clase y el papel desempeñado por los pesos o probabilidades de asignación. Esta perspectiva permite comparar los métodos estándar con el enfoque robusto estudiado posteriormente, en el que la ponderación de las partículas no depende únicamente de su compatibilidad con una clase o alineamiento, sino también de su posible carácter atípico dentro de la clase.

En particular, se revisan las formulaciones empleadas en Relion y cryoSPARC, dos de los paquetes de software más utilizados en el procesamiento de datos de cryo-EM, y se comenta después un trabajo más cercano al objetivo de esta memoria, orientado específicamente a mejorar los promedios de clase mediante técnicas de estimación robusta [12].

Algoritmos de clasificación 2D

Tanto Relion como cryoSPARC parten de una formulación estadística de la clasificación 2D. A grandes rasgos, se supone que cada partícula observada procede de una de K referencias bidimensionales desconocidas, transformada por una rotación y una traslación en el plano, y corrompida por ruido. La clase y los parámetros de alineamiento no se observan directamente, por lo que actúan como variables latentes del modelo. La estimación de los promedios de clase queda así acoplada a la inferencia sobre dichas variables latentes.

Sin embargo, sus respectivos algoritmos difieren en diversos puntos, principalmente en los esquemas de optimización utilizados para aproximar el valor de estos estimadores, aunque también en otros detalles como el empleo de ciertos métodos de búsqueda, técnicas de regularización o detalles técnicos de implementación. Algunas de las características propias de los algoritmos empleados en Relion y cryoSPARC se comentarán en este trabajo, si bien no se entrará en detalle sobre su implementación.

Modelo estadístico

El modelo estadístico que se asume para la generación de las imágenes se puede describir como sigue. Fijado un número de clases $K \in \mathbb{N}$ (que habitualmente es elección del usuario), se supone que cada imagen viene generada por una de K posibles referencias bidimensionales $\mathbf{A}_1, \dots, \mathbf{A}_K \in \mathbb{R}^p$, que harán las veces de la señal subyacente o promedio de clase. Debido al hecho de que la orientación y la posición de las imágenes es desconocida, cada imagen tiene asociados también unos parámetros de traslación y rotación, conocidos como parámetros de alineamiento. Por simplicidad, agruparemos los parámetros de alineamiento de la imagen i en un vector $\phi_i := (q_\alpha, q_x, q_y)$, compuesto por un ángulo de rotación q_α y un vector de traslación (q_x, q_y) . Además, $\mathbf{y}(\phi)$ denotará la imagen resultante de aplicar a la imagen \mathbf{y} la transformación descrita por los parámetros ϕ . De esta manera, cada imagen $\mathbf{y}_i \in \mathbb{R}^p$ corresponde a una de las K posibles referencias, rotada y trasladada según los parámetros ϕ_i , y a la cual se añade un ruido n_i que se suele considerar gaussiano.

Por tanto, el modelo de observación se puede escribir

$$\mathbf{y}_i(\phi_i) = A_{k_i} + n_i, \quad (1.6)$$

donde $k_i \in \{1, \dots, K\}$ es la clase de la imagen i y donde $n_i \sim \mathcal{N}(0, \text{diag}(\sigma_{i1}^2, \dots, \sigma_{ip}^2))$ ¹.

Usando la hipótesis de que el ruido verifica $n_i \sim \mathcal{N}(0, \text{diag}(\sigma_{i1}^2, \dots, \sigma_{ip}^2))$, y suponiendo conocidos la asignación de clase k y el alineamiento ϕ de una imagen \mathbf{y}_i , la densidad de probabilidad de observar dicha imagen bajo el modelo anterior, que denotamos por $P(\mathbf{y}_i | k, \phi, \Theta)$, verifica

$$P(\mathbf{y}_i | k, \phi, \Theta) \propto \exp \left(- \sum_{j=1}^p \frac{([\mathbf{y}_i(\phi)]_j - A_{kj})^2}{2\sigma_{ij}^2} \right) \quad (1.7)$$

donde el subíndice j recorre los píxeles de la imagen y $\mathbf{y}_i(\phi)$ denota la imagen resultante de aplicar a \mathbf{y}_i los parámetros de alineamiento ϕ .

Sin embargo, el alineamiento y la clase de cada imagen son variables latentes desconocidas del modelo. Por tanto, la verosimilitud global se obtiene marginalizando dichas variables. Denotamos la verosimilitud de un conjunto de parámetros Θ respecto del conjunto de datos $\mathbf{Y} := (\mathbf{y}_1, \dots, \mathbf{y}_n)$ como $P(\mathbf{Y} | \Theta)$. De cara a la estimación por máxima verosimilitud o MAP, es equivalente trabajar con el logaritmo de la verosimilitud, que denotaremos $L(\mathbf{Y} | \Theta)$, y se puede expresar como

$$\begin{aligned} L(\mathbf{Y} | \Theta) &= \sum_{i=1}^n \log P(\mathbf{y}_i | \Theta) \\ &= \sum_{i=1}^n \log \sum_{k=1}^K \int_{\phi} P(\mathbf{y}_i | k, \phi, \Theta) P(k, \phi | \Theta) d\phi, \end{aligned} \quad (1.8)$$

donde $P(k, \phi | \Theta)$ es la función de densidad de probabilidad conjunta de k, ϕ dado Θ . Dicha densidad conjunta debe especificarse para completar el modelo. Una posibilidad viene dada en [13], donde se trabaja con las siguientes hipótesis: en primer lugar, se asume que k y ϕ son independientes. En segundo lugar, puesto que k es un parámetro discreto, se modela mediante una distribución discreta con función de masa $P(k) = \alpha_k$. En cuanto a los parámetros de alineamiento $\phi = (q_\alpha, q_x, q_y)$, se asume que la distribución del ángulo de rotación es uniforme en $[0, 2\pi]$, mientras que el vector de traslación verifica $(q_x, q_y) \sim \mathcal{N}(0, \xi^2 I)$. Con todo esto, la densidad conjunta puede escribirse como

$$P(k, \phi | \Theta) = \alpha_k \frac{1}{2\pi\xi^2} \exp \left(- \frac{q_x^2 + q_y^2}{2\xi^2} \right) \frac{1}{2\pi}. \quad (1.9)$$

El modelo completo queda definido con las ecuaciones (1.6), (1.7) y (1.9). Su conjunto de parámetros Θ está compuesto por las imágenes de referencia A_k , las desviaciones típicas del ruido σ_{ij} ; y en caso de que se especifique la densidad conjunta de k, ϕ como en la ecuación (1.9), las probabilidades de cada estructura subyacente α_k y la desviación típica de los parámetros de traslación ξ . Una vez definido el modelo probabilístico, el problema de clasificación 2D consiste en estimar el conjunto de parámetros Θ a partir de las imágenes observadas.

¹En esta formulación general, se permite que la desviación típica del ruido varíe en cada píxel y para cada imagen. Esto coincide con el modelo presentado en [4]. Sin embargo, en la práctica se suele simplificar este modelo. Por ejemplo, en el propio [4] se comenta que, en la implementación práctica, se elimina la dependencia de la varianza del ruido respecto de la imagen.

Relion

Relion opera sobre la transformada de Fourier de las imágenes, pero utilizando el mismo modelo probabilístico descrito anteriormente, y basándose en un esquema bayesiano de estimación MAP (del inglés *maximum a posteriori*). Es decir, en lugar de maximizar la verosimilitud $P(\mathbf{Y} \mid \Theta)$, se introduce un cierto *prior* $P(\Theta)$ sobre los parámetros del modelo y se optimiza la densidad a posteriori $P(\Theta \mid \mathbf{Y})$. Por el teorema de Bayes, se tiene que $P(\Theta \mid \mathbf{Y}) \propto P(\mathbf{Y} \mid \Theta)P(\Theta)$, luego al tomar logaritmos se obtiene

$$\log P(\Theta \mid \mathbf{Y}) = \log P(\mathbf{Y} \mid \Theta) + \log P(\Theta) + C = L(\mathbf{Y} \mid \Theta) + \log P(\Theta) + C, \quad (1.10)$$

donde C es una constante aditiva que resulta irrelevante en el proceso de optimización.

El *prior* que introduce Relion consiste en una distribución normal para cada una de las frecuencias de la transformada de Fourier del promedio de clase. Concretamente, si denotamos por \mathbf{A}_k a la transformada de Fourier de la estructura de referencia para la clase k , y por \mathbf{A}_{kj} a su coeficiente correspondiente a la frecuencia j -ésima, se fija que $\mathbf{A}_{kj} \sim \mathcal{N}(0, \tau_{kj}^2 I)$. Imponer una media de cero para esta distribución a priori supone que el *prior* actuará como un término de regularización que evita que los coeficientes estimados tomen valores muy grandes, mientras que el parámetro τ_{kj} controla la fuerza de esta regularización.

Además, Relion propone la optimización de la función objetivo de la [ecuación \(1.10\)](#) mediante un algoritmo iterativo de la familia *Expectation-Maximization*, obteniendo un esquema iterativo donde la actualización de los promedios de clase A_k viene dada por

$$A_{kj}^{(t+1)} = \frac{\sum_{i=1}^n \int_{\phi} P(k, \phi \mid \mathbf{y}_i, \Theta^{(t)}) \frac{1}{\sigma_{ij}^2} [\mathbf{y}_i(\phi)]_j d\phi}{\sum_{i=1}^n \int_{\phi} P(k, \phi \mid \mathbf{y}_i, \Theta^{(t)}) \frac{1}{\sigma_{ij}^2} d\phi + \frac{1}{\tau_{kj}^2}}, \quad (1.11)$$

donde $A_{kj}^{(t+1)}$ representa el promedio de clase estimado en la iteración $t + 1$, y $\Theta^{(t)}$ denota el conjunto de parámetros del modelo estimados en la etapa anterior t .

Además, $P(k, \phi \mid \mathbf{y}_i, \Theta^{(t)})$ es la probabilidad a posteriori de asignación a la clase k y alineamiento ϕ para la imagen i , dados los parámetros $\Theta^{(t)}$ de la iteración anterior. Denotando $\omega_{ik\phi}^{(t)} := P(k, \phi \mid \mathbf{y}_i, \Theta^{(t)})$, se pueden calcular estas probabilidades como

$$\omega_{ik\phi}^{(t)} = \frac{P(\mathbf{y}_i \mid k, \phi, \Theta^{(t)})P(k, \phi \mid \Theta^{(t)})}{\sum_{k'=1}^K \int_{\phi'} P(\mathbf{y}_i \mid k', \phi', \Theta^{(t)})P(k', \phi' \mid \Theta) d\phi'}.$$

Con esta notación, y asumiendo la simplificación $\sigma_{ij}^2 \equiv \sigma_j^2$, $\tau_{kj}^2 \equiv \tau_j^2$, se puede expresar la [ecuación \(1.11\)](#) como sigue:

$$A_{kj}^{(t+1)} = \frac{\frac{1}{\sigma_j^2} \sum_{i=1}^n \int_{\phi} \omega_{ik\phi}^{(t)} [\mathbf{y}_i(\phi)]_j d\phi}{\frac{1}{\sigma_j^2} \sum_{i=1}^n \int_{\phi} \omega_{ik\phi}^{(t)} d\phi + \frac{1}{\tau_j^2}} \quad (1.12)$$

En la práctica, las integrales de la ecuación anterior se aproximan por sumas de Riemann sobre una rejilla de posibles parámetros de alineamiento, de modo que esta [ecuación \(1.12\)](#) tiene una interpretación sencilla: los promedios de clase son el resultado de una media ponderada de todas las imágenes sobre todos sus posibles alineamientos, donde los pesos vienen dados por las probabilidades $\omega_{ik\phi}^{(t)}$. Además, sobre esta media ponderada actúa el *prior* gaussiano como un término de regularización [4], y la relación entre σ_j^2 y τ_j^2 modula la fuerza de este término de regularización.

Este enfoque en el que todas las imágenes contribuyen a la estimación final ponderadas según su ajuste al promedio estimado es comúnmente conocido como *soft assignment*².

cryoSPARC

La formulación del problema en la que se basa cryoSPARC [14, nota suplementaria 1] guarda claras similitudes con la propuesta de Relion. La función objetivo de cryoSPARC se obtiene a partir del mismo modelo probabilístico general y presenta una estructura análoga a la empleada por Relion, aunque difiere en la parametrización del modelo y en la elección de los términos a priori. La elección de los términos a priori es algo más general en cryoSPARC, aunque la formulación de cryoSPARC excluye del modelo tanto la desviación típica del ruido σ_j como los parámetros asociados a las distribuciones de k, ϕ . Las distribuciones de k, ϕ se suponen uniformes, y las desviaciones típicas σ_j se actualizan de forma dinámica, pero determinista, con las iteraciones del esquema de optimización [14, nota suplementaria 1]. Por lo tanto, los únicos parámetros son los promedios de clase, que denotaremos $\mathbf{A} := (\mathbf{A}_1, \dots, \mathbf{A}_K)$.

La función objetivo utilizada por cryoSPARC puede denotarse por

$$\begin{aligned} f(\mathbf{A}) &= \sum_{i=1}^n \log P(\mathbf{y}_i | \mathbf{A}) + \sum_{k=1}^K \log P(\mathbf{A}_k) \\ &= \sum_{i=1}^n \log \left(\sum_{k=1}^K \frac{1}{K} \int_{\phi} P(\mathbf{y}_i | \phi, \mathbf{A}_k) P(\phi) d\phi \right) + \sum_{k=1}^K \log P(\mathbf{A}_k) \\ &= \sum_{i=1}^n \log U_i + \sum_{k=1}^K \log P(\mathbf{A}_k). \end{aligned} \quad (1.13)$$

Esta formulación ligeramente más general es posible gracias a que cryoSPARC no utiliza *Expectation-Maximization* como método de optimización, sino que hace uso de un esquema de ascenso en la dirección del gradiente estocástico. En cada iteración t del algoritmo se toma un subconjunto $M^{(t)}$ de las imágenes (llamado *mini-batch*) y se aproxima el gradiente de la función objetivo f por

$$\frac{\partial f}{\partial \mathbf{A}_k} \approx G_k^{(t)} := \frac{n}{|M^{(t)}|} \sum_{i \in M^{(t)}} \frac{1}{U_i^{(t)}} \frac{\partial U_i^{(t)}}{\partial \mathbf{A}_k} + \frac{\partial}{\partial \mathbf{A}_k} \log P(\mathbf{A}_k),$$

donde $U_i^{(t)}$ denota la verosimilitud de la observación i dados los parámetros estimados en la etapa t .

Después, se aplica una actualización de los promedios de clase mediante un esquema de ascenso en la dirección del gradiente con un término de momento:

$$\begin{aligned} \Delta \mathbf{A}_k^{(t)} &= \mu \Delta \mathbf{A}_k^{(t-1)} + (1 - \mu) \eta_k G_k^{(t)} \\ \mathbf{A}_k^{(t+1)} &= \mathbf{A}_k^{(t)} + \Delta \mathbf{A}_k^{(t)}, \end{aligned}$$

donde μ es el parámetro de momento, que se fija en $\mu = 0,9$, y η_k es el tamaño de paso para la clase k . Dicho tamaño de paso se calcula en cada iteración mediante una aproximación del Hessiano de la función objetivo [14, nota suplementaria 1, ecuación (9)].

²Por contraposición al *hard assignment*, donde se selecciona la mejor asignación de clase y de alineamiento para cada imagen (de acuerdo a algún criterio preestablecido) y se calcula el promedio tomando solo las imágenes asignadas a la clase correspondiente, y solo con el alineamiento establecido.

Si bien el cálculo de los promedios de clase mediante este esquema de optimización no conduce a ecuaciones con una interpretación tan directa como la obtenida para Relion en la [ecuación \(1.12\)](#), ambos métodos parten de un modelo probabilístico muy similar y persiguen esencialmente el mismo objetivo de estimación. La principal diferencia radica en la estrategia de optimización empleada: mientras que Relion utiliza un esquema iterativo de tipo *Expectation-Maximization*, cryoSPARC aproxima el gradiente de la función objetivo mediante minibatches de imágenes y actualiza los promedios de clase mediante pasos sucesivos en la dirección de dicho gradiente. Este enfoque reduce el coste computacional de cada iteración y facilita la aplicación del método a conjuntos de datos de gran tamaño.

En cualquier caso, tanto en Relion como en cryoSPARC los promedios de clase constituyen los parámetros fundamentales del modelo, por lo que la calidad de estos representantes continúa siendo un aspecto central del proceso de clasificación 2D.

Estimador de punto fijo robusto

En [12], se propone estimar el representante de una clase mediante el punto fijo de una media ponderada dependiente de la propia estimación. Es decir, fijando una función de peso $\omega(\mathbf{y}, \mathbf{T}) \geq 0$, tomar el estimador \mathbf{T} que verifique

$$\mathbf{T} = \frac{\sum_{i=1}^N \mathbf{y}_i \omega(\mathbf{y}_i, \mathbf{T})}{\sum_{i=1}^N \omega(\mathbf{y}_i, \mathbf{T})}.$$

La función de peso ω debería recompensar la similitud entre una imagen \mathbf{y}_i y la referencia \mathbf{T} , de modo que las imágenes más similares a la estimación obtienen pesos mayores. La función de peso utilizada en dicho artículo es

$$\omega(\mathbf{y}, \mathbf{T}) = \frac{|\langle \mathbf{y}, \mathbf{T} \rangle|}{\|\mathbf{y}\| \|\mathbf{T}\|} \exp \left(-\beta \left\| \mathbf{T} - \frac{\langle \mathbf{y}, \mathbf{T} \rangle}{\|\mathbf{T}\|^2} \mathbf{T} \right\|^2 \right),$$

donde $\beta > 0$ es un hiperparámetro.

El primer término de esta función de peso es la similitud del coseno, que recompensa la presencia de estructuras similares en la imagen y la referencia, además de ser invariante a cambios de escala. El segundo término se basa en la norma del residuo ortogonal, de manera que las imágenes que tengan una componente ortogonal a \mathbf{T} grande recibirán pesos muy bajos. Así, esta función de peso combina dos características intuitivas y frecuentes en procesamiento de imagen: correlación y penalización de residuos.

Por su propiedad de punto fijo, se puede calcular este estimador partiendo de una referencia inicial $\mathbf{T}^{(0)}$ (como la media o la mediana de todas las imágenes) e iterando:

$$\mathbf{T}^{(k+1)} = \frac{\sum_{i=1}^N \mathbf{y}_i \omega(\mathbf{y}_i, \mathbf{T}^{(k)})}{\sum_{i=1}^N \omega(\mathbf{y}_i, \mathbf{T}^{(k)})},$$

Además de proponer este esquema numérico y mostrar resultados sobre algunos conjuntos de datos, los autores estudian diversas propiedades teóricas del estimador, incluyendo resultados de consistencia Fisher bajo determinados modelos probabilísticos, combinando para ello argumentos analíticos y experimentos numéricos.

Este enfoque se diferencia de los anteriores en varios aspectos. En primer lugar, se trata de un algoritmo diseñado específicamente para la estimación robusta de representantes de clase, en lugar de obtener dichos representantes como un resultado secundario de un procedimiento más amplio de clasificación y alineamiento.

Además, el trabajo pone énfasis en el diseño de un estimador robusto frente a observaciones atípicas y errores de alineamiento, mientras que en Relion y cryoSPARC los promedios de clase surgen como consecuencia de la optimización de un modelo probabilístico cuya formulación no es intrínsecamente robusta. Esta perspectiva resulta especialmente relevante en el contexto del presente trabajo, cuyo objetivo también se centra en el diseño y análisis de estimadores robustos para la obtención de representantes de clase.

1.4. Objetivos y contribuciones

El presente trabajo se centra en el estudio de métodos de estimación robusta aplicados al problema del cálculo de promedios de clase en criomicroscopía electrónica de partícula única. En particular, se aborda el efecto que la presencia de observaciones atípicas, errores de alineamiento y contaminación en los conjuntos de imágenes puede tener sobre la estimación clásica basada en la media aritmética, motivando el uso de enfoques robustos como alternativa más estable frente a este tipo de perturbaciones.

En este contexto, los objetivos principales de este trabajo son los siguientes:

1. Desarrollar un marco teórico para el estudio de estimadores robustos aplicados al problema de cálculo de promedios de clase en cryo-EM, estableciendo conexiones con métodos clásicos de estimación robusta y con los enfoques utilizados en la literatura y en los paquetes de *software* más relevantes del área.
2. Diseñar y analizar algoritmos basados en técnicas clásicas de estimación robusta, en particular esquemas iterativos de tipo IRLS (del inglés *Iteratively Reweighted Least Squares*), con el objetivo de mejorar la resistencia frente a observaciones atípicas y reducir el efecto de partículas contaminadas o mal alineadas en la estimación de representantes de clase.
3. Realizar experimentos numéricos sobre imágenes simuladas y datos experimentales con el fin de evaluar comparativamente el comportamiento de los distintos estimadores propuestos, analizando su estabilidad, robustez y calidad de reconstrucción bajo distintos niveles de contaminación.

Como principales contribuciones, este trabajo proporciona un análisis teórico del uso de estimación robusta en el contexto de promedios de clase en cryo-EM, propone variantes algorítmicas basadas en IRLS para escenarios con presencia de *outliers*, y presenta una evaluación experimental orientada a comparar su comportamiento frente a métodos de estimación convencionales.

Capítulo 2

Metodología

En el [capítulo 1](#) se expusieron las limitaciones a las que se enfrenta la criomicroscopía electrónica, entre las que destaca la baja relación señal a ruido de las imágenes. Los elevados niveles de ruido hacen prácticamente inevitable que se cometan errores de detección, clasificación o estimación en cada una de las etapas del procesamiento de imagen. Dichos errores introducen observaciones atípicas y otras desviaciones de los modelos ideales que afectan a prácticamente todas las etapas del proceso de reconstrucción, incluida la estimación de promedios de clase, donde la presencia de observaciones atípicas puede degradar la calidad de los promedios obtenidos. Por tanto, sería deseable disponer de estimadores que no se vean excesivamente afectados por las desviaciones del modelo dado en las [ecuaciones \(1.4\)](#) y [\(1.5\)](#). El marco teórico encargado de diseñar procedimientos de estimación que mantengan un buen comportamiento en presencia de desviaciones moderadas de los modelos probabilísticos ideales es la estadística robusta.

2.1. Fundamentos de estimación robusta

En inferencia estadística clásica, muchos procedimientos de estimación se construyen bajo modelos probabilísticos idealizados en los que las observaciones siguen una distribución bien definida, habitualmente bajo hipótesis de independencia, homogeneidad y ruido con comportamiento regular. Bajo estas condiciones, estimadores como la media muestral o los métodos de mínimos cuadrados presentan propiedades óptimas bien conocidas, como eficiencia o consistencia. Sin embargo, dichas propiedades dependen de la validez del modelo asumido. En presencia de desviaciones moderadas del modelo idealizado (denominado *modelo nominal*), el comportamiento de estos estimadores puede deteriorarse de manera significativa. La estadística robusta surge precisamente como un marco para diseñar procedimientos que mantengan estabilidad y un rendimiento razonable incluso cuando el modelo nominal no se corresponde exactamente con lo observado.

2.1.1. Modelo de contaminación

Para estudiar de manera sistemática el efecto de estas desviaciones, resulta útil introducir un modelo explícito de contaminación. Una manera clásica de formalizar la presencia de observaciones atípicas consiste en asumir que los datos no proceden exclusivamente de la distribución F correspondiente al modelo nominal, sino de una versión contaminada de la misma. En su forma más simple, esto puede modelarse mediante el esquema

$$F_\varepsilon = (1 - \varepsilon)F + \varepsilon G,$$

donde G es una distribución arbitraria asociada a observaciones contaminantes y ε es la fracción de contaminación. El objetivo de la estimación robusta consiste en limitar el efecto de la contaminación sobre el estimador, preservando simultáneamente un buen comportamiento bajo el modelo nominal. En este sentido, robustez y eficiencia suelen entenderse como propiedades en tensión cuyo equilibrio depende de la naturaleza del problema.

El modelo de contaminación permite introducir de forma rigurosa distintas medidas de robustez que cuantifican la sensibilidad de un estimador frente a las perturbaciones del modelo. Entre las más destacadas en la teoría clásica de estadística robusta se encuentran la función de influencia y el punto de ruptura, que se presentan a continuación.

2.1.2. Medidas de robustez

La función de influencia

A nivel intuitivo, la función de influencia describe el efecto de una contaminación infinitesimal de la distribución nominal sobre el valor del estimador, normalizado por la masa de la contaminación [15]. Formalmente, se define la función de influencia IF de un estimador T para una distribución F en el punto x como

$$\text{IF}(x; T, F) = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0^+} \frac{T((1 - \varepsilon)F + \varepsilon\delta_x) - T(F)}{\varepsilon},$$

siempre que exista el límite.

Por ejemplo, si $T = \bar{X}$ es la media muestral, se obtiene

$$\text{IF}(x; T, F) = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0^+} \frac{(1 - \varepsilon)T(F) + \varepsilon x - T(F)}{\varepsilon} = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0^+} \frac{\varepsilon x - \varepsilon T(F)}{\varepsilon} = x - T(F) \quad (2.1)$$

Una propiedad deseable en los estimadores robustos es la de poseer una función de influencia acotada, de forma que una observación atípica no pueda ejercer una distorsión arbitrariamente grande sobre el valor del estimador. En algunos estimadores robustos, denominados redescendentes, la función de influencia tiende a cero para observaciones que se desvíen mucho del modelo. En cambio, estimadores no robustos como la media muestral tienen funciones de influencia no acotadas, como se ve en la [ecuación \(2.1\)](#). Esto significa que, potencialmente, una única observación extrema podría modificar el valor del estimador de forma arbitraria. Si bien en las imágenes de cryo-EM no son frecuentes los valores muy extremos (aunque sí lo son las observaciones atípicas), esta propiedad pone de manifiesto la fragilidad de la media muestral.

Punto de ruptura

Mientras que la función de influencia describe el efecto de perturbaciones infinitesimales sobre el estimador, el punto de ruptura estudia su comportamiento frente a contaminaciones arbitrariamente grandes.

El punto de ruptura (en inglés *breakdown point*) de un estimador cuantifica la máxima proporción de contaminación que el estimador puede tolerar antes de producir estimaciones arbitrariamente alejadas del parámetro de interés [16]. De manera informal, el punto de ruptura de un estimador T para una distribución nominal F puede definirse como el mayor valor $\varepsilon^* \in [0, 1]$ tal que $T((1 - \varepsilon)F + \varepsilon G)$ permanece acotado para toda distribución contaminante G y todo $\varepsilon < \varepsilon^*$ [16]. Existen distintas formulaciones técnicas de esta

definición según el contexto considerado, pero esta descripción resulta suficiente para los propósitos del presente trabajo.

El punto de ruptura proporciona una condición necesaria para que un estimador resulte útil frente a contaminación severa, aunque no suficiente, ya que la definición únicamente exige que el estimador no diverja. Por ejemplo, el estimador idénticamente nulo tiene un punto de ruptura $\varepsilon^* = 1$, pese a carecer de interés práctico. No obstante, en problemas de localización es natural esperar que un estimador requiera una mayoría de observaciones no contaminadas. Y en efecto, se puede probar que los estimadores de localización equivariantes por traslaciones tienen $\varepsilon^* \leq 1/2$ [16].

El punto de ruptura de la media muestral es otro indicador de su falta de robustez, pues es un estimador con $\varepsilon^* = 0$. En cambio, un estimador clásicamente robusto como la mediana tiene $\varepsilon^* = 1/2$.

Las limitaciones de los estimadores clásicos motivan la búsqueda de procedimientos que combinen eficiencia estadística bajo el modelo nominal con una menor sensibilidad frente a observaciones atípicas. Entre los enfoques más importantes para construir este tipo de estimadores se encuentran los estimadores M , que constituyen una generalización robusta de los métodos clásicos de máxima verosimilitud y mínimos cuadrados.

2.2. Estimadores M

Los estimadores M son una clase de estimadores basados en la estimación por máxima verosimilitud o, equivalentemente, en la minimización de una función de pérdida. Su diferencia respecto de la estimación por máxima verosimilitud clásica radica en la elección del modelo respecto del cual se calcula la verosimilitud. Para producir estimadores robustos, es habitual elegir distribuciones con colas más pesadas, de modo que la ocurrencia de observaciones atípicas no altere excesivamente la verosimilitud del modelo. Al igual que ocurre con los estimadores clásicos, se puede distinguir entre estimadores M de localización y estimadores M de escala o dispersión. Este trabajo se centrará en los estimadores M de localización, pues la estimación de promedios de clase es un problema de localización.

2.2.1. Modelo de localización

Para formalizar el concepto de problema de localización y definir la familia de estimadores M , es necesario introducir un modelo probabilístico que describa la situación habitual de los problemas de localización. En estos casos, el resultado y_i de cada observación depende de un cierto *valor real* μ del parámetro de interés y de un cierto proceso aleatorio de error. La hipótesis más sencilla es que el error es aditivo:

$$y_i = \mu + \varepsilon_i, \quad i = 1, \dots, n. \quad (2.2)$$

Además, los términos de error ε_i se asumen independientes e idénticamente distribuidos para $i = 1, \dots, n$.

Pese a su sencillez, este modelo es suficientemente versátil para representar multitud de problemas de estimación, especialmente si se permite que la distribución de los errores sea lo bastante general. Por ejemplo, se corresponde directamente con el modelo presentado en la ecuación (1.5) para los promedios de clase en cryo-EM, y una modificación menor permitirá adaptarlo también para incorporar los efectos de la CTF en la ecuación (1.4). Por lo tanto, en el resto de esta sección se asumirá este modelo, por simplicidad.

2.2.2. Estimadores M y máxima verosimilitud

Dado el modelo de localización de la [ecuación \(2.2\)](#), supongamos que los errores ε_i tienen una distribución dada por la función de densidad p . Entonces, la densidad conjunta de las observaciones (o función de verosimilitud) viene dada por

$$L(y_1, \dots, y_n; \mu) = \prod_{i=1}^n p(y_i - \mu).$$

En esta situación, el valor del estimador de máxima verosimilitud para μ se define como el valor μ_{ML} que maximiza $L(y_1, \dots, y_n; \mu)$:

$$\mu_{\text{ML}} = \arg \max_{\mu} L(y_1, \dots, y_n; \mu).$$

Por simplicidad, y puesto que el logaritmo es una función creciente, es habitual tomar el logaritmo de la verosimilitud (o log-verosimilitud), trabajando con $\ell = \log L$. Además, por convención se suele tomar el opuesto de la log-verosimilitud para transformar el problema en uno de minimización. De ese modo,

$$\mu_{\text{ML}} = \arg \min_{\mu} -\ell(\mu) = \arg \min_{\mu} \sum_{i=1}^n \rho(y_i - \mu), \quad (2.3)$$

donde $\rho = -\log p$, o equivalentemente $p = \exp(-\rho)$.

La formulación dada en la [ecuación \(2.3\)](#) permite una generalización natural: considerar la función ρ como una función de pérdida, no necesariamente ligada a una distribución de probabilidad para los términos de error. Precisamente en esta generalización se basa la definición de los estimadores M . En el contexto del modelo de localización de la [ecuación \(2.2\)](#), y dada una función de pérdida ρ , (generalmente no negativa y con $\rho(0) = 0$) se define el estimador M de localización asociado a ρ como

$$\tilde{\mu} := \arg \min_{\mu} \sum_{i=1}^n \rho(y_i - \mu). \quad (2.4)$$

Los estimadores M constituyen, por tanto, una familia muy amplia de estimadores obtenidos como solución de un problema de optimización. La media muestral, que coincide con el estimador de máxima verosimilitud para un modelo de errores gaussianos, se recupera con la elección $\rho \propto u^2$. En cambio, la elección $\rho \propto |u|$ proporciona la mediana como estimador M resultante [16]. En general, la elección de la función de pérdida determina las propiedades del estimador, incluyendo su eficiencia bajo el modelo nominal y su robustez frente a desviaciones de dicho modelo. En la práctica, suelen emplearse funciones de pérdida aproximadamente cuadráticas cerca del cero para favorecer la eficiencia bajo un modelo nominal gaussiano. Por otro lado, se busca que presenten crecimiento subcuadrático para residuos grandes, lo cual está relacionado con la robustez frente a observaciones atípicas.

2.2.3. Propiedades teóricas

Suponiendo que ρ es diferenciable, la condición de primer orden para el problema de optimización dado en la [ecuación \(2.4\)](#) se puede escribir como

$$\sum_{i=1}^n \psi(y_i - \tilde{\mu}) = 0, \quad (2.5)$$

ecuación que algunos autores denominan *ecuación normal del estimador*, y que es de vital importancia para el análisis de las propiedades teóricas de los estimadores M , así como el algoritmo que se utiliza habitualmente para calcularlos en la práctica, como se verá en la [sección 2.2.6](#).

El desarrollo riguroso de las propiedades estadísticas de esta familia de estimadores está fuera de los objetivos de este trabajo. El lector puede encontrar un tratamiento más completo y riguroso en [15] o [16]. En lo que respecta a este trabajo, nos limitaremos a citar algunas de sus propiedades más destacadas. Fijemos para ello una función de pérdida ρ , $\psi = \rho'$ y $\tilde{\mu}$ el estimador M asociado a ρ . Entonces, se tiene que:

- La función de influencia de $\tilde{\mu}$ es proporcional a ψ :

$$\text{IF}(y_0; \tilde{\mu}, F) = k \cdot \psi(y_0 - \tilde{\mu}),$$

donde $k \in \mathbb{R}$ es una constante [16].

- Bajo condiciones adicionales, ciertos estimadores robustos de localización pueden alcanzar puntos de ruptura elevados, hasta $\varepsilon^* = 1/2$ en casos clásicos [16]. No obstante, esta propiedad no se transfiere automáticamente a cualquier estimador M ni a su implementación iterativa.

2.2.4. Extensión regularizada y formulación MAP

En la [sección 2.2.2](#), se expuso cómo los estimadores M generalizan el concepto de estimación por máxima verosimilitud. En esta sección, se muestra cómo estos estimadores se pueden adaptar para incorporar también una distribución a priori para el parámetro de localización, que actuará como un término de regularización en el problema de optimización.

Siguiendo el modelo de localización dado en la [ecuación \(2.2\)](#), supongamos como antes una densidad p para los términos de error ε_i . Supongamos también que se tiene una distribución a priori para μ dada por una función de densidad q . Entonces, por el teorema de Bayes, la densidad a posteriori para μ verifica

$$q(\mu \mid y_1, \dots, y_n) \propto L(y_1, \dots, y_n; \mu) \cdot q(\mu).$$

El análogo del estimador de máxima verosimilitud en esta situación es el estimador MAP (del inglés *maximum a posteriori*), que maximiza la densidad a posteriori. Trabajando de forma análoga al caso de máxima verosimilitud, tomamos el logaritmo de la densidad a posteriori y convertimos el problema en uno de minimización, de modo que

$$\mu_{\text{MAP}} := \arg \min_{\mu} \sum_{i=1}^n \rho(y_i - \mu) + \phi(\mu), \quad (2.6)$$

donde $\rho := -\log p$ y $\phi := -\log q$.

Observemos que la introducción de una distribución a priori para μ se ha traducido en un nuevo término aditivo $\phi(\mu) = -\log q(\mu)$ en la función objetivo. De esta manera, es claro que la formulación de los estimadores M dada en la [ecuación \(2.4\)](#) puede ser extendida de forma natural para incorporar información a priori sin más que incluir un término adicional en la función objetivo del problema que los define.

Así, definimos el estimador M asociado a la función de pérdida ρ y regularizado por la función ϕ como

$$\tilde{\mu} := \arg \min_{\mu} \sum_{i=1}^n \rho(y_i - \mu) + \phi(\mu). \quad (2.7)$$

Al igual que ocurre con la función de pérdida, la formulación del estimador como solución a un problema de optimización permite una mayor generalidad en la elección de la función ϕ , que podría no estar asociada a una distribución a priori válida para el parámetro. Decimos que esta función *regulariza* el estimador M porque su efecto sobre el problema de optimización de la [ecuación \(2.7\)](#) es muy similar al de la regularización en otras técnicas clásicas de estimación.

La introducción de estos términos de conocimiento a priori o regularización tiene importancia en el contexto de cryo-EM, donde el enfoque bayesiano ha ganado mucha relevancia en los últimos años [6], [17]. En este contexto, una elección destacada como distribución a priori es la distribución normal [17]. La elección de la distribución a priori $\mu \sim \mathcal{N}(\mu_0, \tau^2)$ introduce una regularización cuadrática en la [ecuación \(2.7\)](#), de modo que el problema de optimización se escribe

$$\tilde{\mu} := \arg \min_{\mu} \sum_{i=1}^n \rho(y_i - \mu) + \frac{1}{2\tau^2}(\mu - \mu_0)^2. \quad (2.8)$$

2.2.5. Estimadores M equivariantes por cambios de escala

Un problema que presentan los estimadores M definidos anteriormente es que no son equivariantes por cambios de escala. Es decir, dado un $c \in \mathbb{R}$, podría no verificarse $\tilde{\mu}(cy_1, \dots, cy_n) = c \cdot \tilde{\mu}(y_1, \dots, y_n)$. Generalmente, esta propiedad es deseable en un estimador de localización, pues favorece su estabilidad y simplifica considerablemente el ajuste de sus parámetros. Una manera de garantizarla para los estimadores M es mediante la adición de un parámetro de escala σ a la [ecuación \(2.4\)](#). De esta forma, el estimador M asociado a la función de pérdida ρ y la regularización ϕ vendría dado por

$$\tilde{\mu} := \arg \min_{\mu} \sum_{i=1}^n \rho\left(\frac{y_i - \mu}{\sigma}\right) + \phi\left(\frac{\mu}{\sigma}\right). \quad (2.9)$$

El parámetro de escala σ se puede suponer conocido, o estimarse de forma conjunta con la localización. En el resto de esta sección, cuando consideremos estimadores definidos como en la [ecuación \(2.9\)](#), supondremos conocido el parámetro de escala σ .

A nivel de notación, fijaremos una función de pérdida ρ y denotaremos por $\tilde{\mu}$ al estimador M asociado. Asimismo, en caso de que ρ sea diferenciable, escribiremos $\psi := \rho'$. En el caso de que la función ϕ provenga de una distribución normal $\mathcal{N}(\mu_0, \tau^2)$ a priori para μ ([ecuación \(2.8\)](#)), escribiremos el término de regularización $\phi(\mu/\sigma)$ simplemente como $\frac{1}{2\tau^2}(\mu - \mu_0)^2$, asumiendo que el parámetro de escala se ha absorbido en los parámetros μ_0, τ^2 de la distribución a priori.

2.2.6. Algoritmo IRLS

En general, los estimadores M no poseen una expresión analítica cerrada, pues el problema de optimización dado en la [ecuación \(2.9\)](#) puede ser complejo de resolver. Esto abre una importante cuestión, pues en la práctica es necesario disponer de procedimientos para

calcular el valor del estimador. Además, en el contexto específico de cryo-EM, las características de los conjuntos de datos imponen importantes limitaciones computacionales sobre los métodos utilizados en el procesamiento de imagen.

Afortunadamente, existe un procedimiento eficiente para computar una amplia familia de estimadores M . En concreto, consideraremos en esta sección los estimadores equivariantes por cambios de escala y regularizados por una distribución a priori normal. Esto es, aquellos estimadores $\tilde{\mu}$ dados por

$$\tilde{\mu} = \arg \min_{\mu} \sum_{i=1}^n \rho \left(\frac{y_i - \mu}{\sigma} \right) + \frac{1}{2\tau^2} (\mu - \mu_0)^2 = \arg \min_{\mu} \ell(\mu) \quad (2.10)$$

Supondremos además que ρ es diferenciable, y manteniendo la notación $\psi = \rho'$, también que $\psi(0) = 0$ y ψ es derivable en 0. Dada la interpretación de ρ como función de pérdida evaluada sobre los residuos, es natural pensar que ρ debería alcanzar un mínimo en el cero, por lo que la condición $\psi(0) = 0$ resulta razonable.

En estas condiciones, y para simplificar la expresión del algoritmo, se introduce la siguiente notación:

$$r_i(\mu) := \frac{y_i - \mu}{\sigma}, \quad \omega(r) := \begin{cases} \frac{\psi(r)}{r}, & \text{si } r \neq 0, \\ \psi'(0), & \text{si } r = 0. \end{cases}$$

La cantidad $r_i(\mu)$ se denomina *residuo* (estandarizado) de la observación i respecto de la referencia μ , mientras que $\omega(r)$ se denomina *peso* asociado al residuo r . Además, llamaremos peso de la observación i (respecto de la referencia μ) a $\omega_i(\mu) := \omega(r_i(\mu))$.

Con dicha notación, la derivada de la función de pérdida ℓ de la [ecuación \(2.10\)](#) respecto del parámetro μ puede escribirse como

$$\begin{aligned} \frac{\partial \ell}{\partial \mu} &= \sum_{i=1}^n -\frac{1}{\sigma} \psi \left(\frac{y_i - \mu}{\sigma} \right) + \frac{1}{\tau^2} (\mu - \mu_0) \\ &= -\frac{1}{\sigma^2} \sum_{i=1}^n \omega_i(\mu) (y_i - \mu) + \frac{1}{\tau^2} (\mu - \mu_0). \end{aligned}$$

Por tanto, de la condición de primer orden $\frac{\partial \ell}{\partial \mu} = 0$ se deduce la ecuación

$$\left(\frac{1}{\sigma^2} \sum_{i=1}^n \omega_i(\mu) + \frac{1}{\tau^2} \right) \mu = \frac{1}{\sigma^2} \sum_{i=1}^n \omega_i(\mu) y_i + \frac{1}{\tau^2} \mu_0,$$

expresada de forma equivalente como

$$\mu = \frac{\frac{1}{\sigma^2} \sum_{i=1}^n \omega_i(\mu) y_i + \frac{1}{\tau^2} \mu_0}{\frac{1}{\sigma^2} \sum_{i=1}^n \omega_i(\mu) + \frac{1}{\tau^2}}. \quad (2.11)$$

Esta última ecuación no proporciona una expresión analítica cerrada para el parámetro μ , pues los pesos ω_i de su segundo término dependen de dicho parámetro. Sin embargo, sí permite deducir que la solución óptima buscada es un punto de fijo de una cierta función, definida por el segundo término de la [ecuación \(2.11\)](#). Esto sugiere la utilización de un esquema iterativo para la resolución del problema: partiendo de una referencia inicial $\mu^{(0)}$ (por ejemplo, la media o la mediana muestral), se sigue el esquema definido por

$$\mu^{(k+1)} = \frac{\frac{1}{\sigma^2} \sum_{i=1}^n \omega_i(\mu^{(k)}) y_i + \frac{1}{\tau^2} \mu_0}{\frac{1}{\sigma^2} \sum_{i=1}^n \omega_i(\mu^{(k)}) + \frac{1}{\tau^2}}. \quad (2.12)$$

Para simplificar la expresión de las iteraciones, se definen las siguientes cantidades:

$$\begin{aligned}\omega_i^{(k)} &= \omega_i(\mu^{(k)}), \\ S_1^{(k)} &= \sum_{i=1}^N \omega_i^{(k)} y_i, \\ S_2^{(k)} &= \sum_{i=1}^N \omega_i^{(k)},\end{aligned}$$

de modo que la ecuación (2.12) se puede expresar de forma escueta como

$$\mu^{(k+1)} = \frac{\frac{1}{\sigma_j^2} S_1^{(k)} + \frac{\mu_0}{\tau^2}}{\frac{1}{\sigma_j^2} S_2^{(k)} + \frac{1}{\tau^2}} = \frac{S_1^{(k)} + \frac{\sigma^2}{\tau^2} \mu_0}{S_2^{(k)} + \frac{\sigma^2}{\tau^2}}. \quad (2.13)$$

En el caso en que no se considere una distribución a priori (o término de regularización ϕ) sobre μ , la ecuación anterior se reduce a

$$\mu^{(k+1)} = \frac{S_1^{(k)}}{S_2^{(k)}} = \frac{\sum_{i=1}^n \omega_i(\mu^{(k)}) y_i}{\sum_{i=1}^n \omega_i},$$

que también es el resultado de tomar el límite $\tau^2 \rightarrow \infty$ en la ecuación (2.13). Además, esta última ecuación proporciona una interpretación intuitiva de los estimadores M como una media ponderada de las observaciones, donde el peso asignado a cada observación depende de su residuo r_i , así como de la función de influencia del estimador ψ . En el caso completo de la ecuación (2.13), se tiene la misma media ponderada regularizada por el término proveniente de la distribución a priori para μ , donde la fuerza del término de regularización está regulada por el cociente $\frac{\sigma^2}{\tau^2}$.

2.2.7. Estimadores M redescendentes

De los desarrollos previos de esta sección se desprende que la influencia (o equivalentemente, el peso) de una observación depende directamente de la derivada de la función de pérdida evaluada en su correspondiente residuo. Por lo tanto, la capacidad de un estimador M para rechazar observaciones atípicas depende fuertemente de la elección de su función de pérdida, y más concretamente del comportamiento de su derivada. Muchas funciones de pérdida robustas crecen más lentamente para residuos grandes, pero tienen una derivada $\psi(r) = \rho'(r)$ que se mantiene alejada de cero —formalmente, existe a tal que $\psi(r) \geq a > 0$ para todo $r \in \mathbb{R}$.

Esto quiere decir que, si bien la influencia de las observaciones atípicas se reduce para residuos muy elevados, dicha influencia no se anula nunca. Los estimadores M redescendentes se caracterizan matemáticamente por la condición

$$\lim_{|r| \rightarrow \infty} \psi(r) = 0.$$

Es decir, son estimadores cuya función de influencia crece cerca de $r = 0$, alcanza un máximo en un residuo moderado y después regresa hacia cero según $|r| \rightarrow \infty$. De este modo se consigue que las observaciones con residuos grandes apenas tengan influencia sobre la estimación. En términos de los pesos otorgados por estos estimadores, se puede

pensar que actúan como detectores de *inliers*, dando peso máximo a los residuos pequeños, pesos algo menores a residuos moderados y finalmente rechazando los residuos grandes por completo.

Los estimadores redescendentes proporcionan una detección de observaciones atípicas más agresiva, permitiendo desde un punto de vista teórico eliminar por completo la influencia de los *outliers*. Sin embargo, sus funciones de pérdida asociadas son necesariamente no convexas, lo cual puede complicar el problema de optimización subyacente introduciendo mínimos locales, problemas de convergencia o pérdida de eficiencia cuando las desviaciones del modelo nominal son pequeñas. Estas desventajas pueden ser mitigadas mediante una buena inicialización de los métodos iterativos, así como técnicas de regularización sobre las iteraciones del algoritmo IRLS.

En el contexto de cryo-EM, puede entenderse el uso de estos estimadores redescendentes como la suposición de que las desviaciones pequeñas del modelo (como ligeros errores de alineamiento) se comportan de manera aproximadamente gaussiana; mientras que las desviaciones mayores que un cierto parámetro de escala corresponden a *outliers* que deberían ser ignorados como partículas mal seleccionadas, contaminación o un mal alineamiento severo.

2.2.8. Estimadores M multidimensionales

Una de las ventajas que presentan los estimadores M es que su generalización al caso multidimensional es muy sencilla. Esto es importante en cryo-EM, donde las observaciones son imágenes, que pueden entenderse como vectores cuyas entradas son cada uno de los píxeles de la imagen. En el contexto multidimensional, denotaremos por \mathbf{y}_i a la observación i -ésima, con $i = 1, \dots, n$; siendo y_{ij} su entrada j -ésima, con $j = 1, \dots, p$. Además, el parámetro de localización se denotará por \mathbf{x} , siendo x_j su entrada j -ésima.

Con esta notación, para generalizar los estimadores M al caso multidimensional basta adaptar la función de pérdida ρ y el término de regularización ϕ para aceptar entradas de la dimensión adecuada. De este modo, el estimador M asociado, que denotamos por \mathbf{x}_M , queda definido por

$$\mathbf{x}_M = \arg \min_{\mathbf{x}} \sum_{i=1}^n \rho(\mathbf{y}_i - \mathbf{x}) + \phi(\mathbf{x}).$$

En el caso multidimensional también es posible introducir un parámetro de escala, potencialmente multidimensional, σ . Si dicho parámetro es multidimensional, $\sigma = (\sigma_j)_{j=1}^p$, denotaremos por simplicidad $\mathbf{v}/\sigma = (v_j/\sigma_j)_{j=1}^p$ para $\mathbf{v} \in \mathbb{R}^p$. Entonces, el problema de optimización correspondiente puede escribirse como

$$\mathbf{x}_M = \arg \min_{\mathbf{x}} \sum_{i=1}^n \rho\left(\frac{\mathbf{y}_i - \mathbf{x}}{\sigma}\right) + \phi(\mathbf{x}).$$

Una manera sencilla de reducir el problema multidimensional anterior al modelo unidimensional es separar el problema componente a componente. Desde el punto de vista de los estimadores M como solución a un problema de optimización, esto se puede conseguir asumiendo que tanto la función de pérdida ρ como la regularización ϕ son aditivas componente a componente:

$$\rho(\mathbf{y}_i, \mathbf{x}) = \sum_{j=1}^p \rho_0(y_{ij}, x_j), \quad \phi(\mathbf{x}) = \sum_{j=1}^p \phi_0(x_j),$$

donde ρ_0 y ϕ_0 son funciones escalares. Desde el punto de vista de la formulación estadística de los estimadores M , esto equivale a suponer que el término de error es independiente componente a componente.

Computacionalmente, esto reduce el problema multidimensional a la resolución de p instancias del problema unidimensional. Cada una de estas instancias unidimensionales puede resolverse con el procedimiento iterativo descrito en la [sección 2.2.6](#).

En otro caso, y considerando un término de regularización de tipo gaussiano

$$\phi(\mathbf{x}) = \frac{1}{2} \left\| \frac{\mathbf{x} - \mathbf{x}_0}{\tau} \right\|^2,$$

el problema de optimización puede escribirse como

$$\ell(\mathbf{x}) = \sum_{i=1}^n \rho \left(\frac{\mathbf{y}_i - \mathbf{x}}{\sigma} \right) + \frac{1}{2} \left\| \frac{\mathbf{x} - \mathbf{x}_0}{\tau} \right\|^2. \quad (2.14)$$

Entonces, derivando respecto de la componente j -ésima del vector \mathbf{x} se obtiene que

$$\frac{\partial \ell}{\partial x_j} = \sum_{i=1}^n -\frac{\partial \rho}{\partial x_j} \left(\frac{\mathbf{y}_i - \mathbf{x}}{\sigma} \right) \frac{1}{\sigma_j} + \frac{1}{\tau_j^2} (x_j - x_{0j}),$$

de modo que definiendo

$$\omega_{ij}(\mathbf{x}) := \frac{\partial \rho}{\partial x_j} \left(\frac{\mathbf{y}_i - \mathbf{x}}{\sigma} \right) \cdot \left(\frac{y_{ij} - x_j}{\sigma_j} \right)^{-1} \quad (2.15)$$

se obtiene que la condición de primer orden $\frac{\partial \ell}{\partial x_j} = 0$ se puede expresar de forma equivalente como

$$x_j = \frac{\frac{1}{\sigma_j^2} \sum_{i=1}^n \omega_{ij}(\mathbf{x}) y_{ij} + \frac{1}{\tau_j^2} x_{0j}}{\frac{1}{\sigma_j^2} \sum_{i=1}^n \omega_{ij}(\mathbf{x}) + \frac{1}{\tau_j^2}},$$

lo cual conduce a un esquema iterativo muy similar al de la [sección 2.2.6](#).

Adicionalmente, si se considera una función de pérdida dependiente de la norma euclídea del residuo

$$\rho = \rho_0 \left(\left\| \frac{\mathbf{y}_i - \mathbf{x}}{\sigma} \right\| \right),$$

entonces se puede definir

$$\omega_i(\mathbf{x}) := \rho'_0 \left(\left\| \frac{\mathbf{y}_i - \mathbf{x}}{\sigma} \right\| \right) \cdot \left\| \frac{\mathbf{y}_i - \mathbf{x}}{\sigma} \right\|^{-1},$$

y de imponer la condición $\nabla_{\mathbf{x}} \ell = 0$ resulta un esquema iterativo con pesos globales dado por

$$\mathbf{x} = \frac{\frac{1}{\sigma^2} \odot \sum_{i=1}^n \omega_i(\mathbf{x}) \mathbf{y}_i + \frac{1}{\tau^2} \odot \mathbf{x}_0}{\frac{1}{\sigma^2} \sum_{i=1}^n \omega_i(\mathbf{x}) + \frac{1}{\tau^2}},$$

donde las expresiones $\frac{1}{\sigma^2}$, $\frac{1}{\tau^2}$ representan operaciones componente a componente sobre los vectores de escala, y \odot es el producto componente a componente.

Esto puede invitar a pensar que el estimador propuesto en [12] como punto fijo de un esquema de pesos globales puede expresarse como un estimador M multidimensional respecto de una cierta función de pérdida global. Sin embargo, puesto que la función de

peso utilizada para dicho estimador no depende exclusivamente de la norma del residuo, lo discutido en esta sección no aplica a dicho caso. Desde una perspectiva matemática, dada una función de reponderación ω arbitraria, la existencia de una función de pérdida objetivo ρ no está garantizada. Para que dicha ρ exista, el campo vectorial subyacente definido por las ecuaciones de optimalidad debe ser conservativo, lo que impone estrictas condiciones de integrabilidad (simetría de las derivadas cruzadas del Jacobiano) que las métricas globales basadas en correlación cruzada o propiedades geométricas del dominio no suelen cumplir.

2.3. Estimadores M en cryo-EM

En esta sección, se describe cómo aplicar los estimadores M al problema central del trabajo, que es la estimación de representantes de clase en cryo-EM. El trabajo teórico se realizó en la [sección 2.2](#), por lo que en este apartado nos limitaremos a comentar algunas de las particularidades del problema abordado, y las pequeñas modificaciones que se deben introducir para aplicar la teoría desarrollada anteriormente para su resolución.

2.3.1. Estimación en el espacio real

El modelo de observación para los promedios de clase en cryo-EM en el espacio real ([ecuación \(1.5\)](#)) se corresponde exactamente con el modelo de localización estudiado en la [sección 2.2](#), por lo que los métodos descritos en dicha sección aplican directamente a este problema. La única salvedad es que la [ecuación \(1.5\)](#) suponía corregido el efecto de la CTF sobre las imágenes, por lo que la corrección de la CTF es un paso previo imprescindible a la aplicación de cualquier estimador.

2.3.2. Estimación en el espacio de Fourier

Los estimadores M pueden ser utilizados de igual modo en el espacio de Fourier, en cuyo caso el objetivo de la estimación es determinar la transformada de Fourier del promedio de clase. Si se quiere recuperar una estimación en el espacio real (por ejemplo, por interpretabilidad), basta tomar la transformada inversa de la estimación obtenida.

Para el modelo en el espacio de Fourier, denotaremos por $\hat{\mathbf{y}}_i$ a la transformada de Fourier de la imagen i -ésima, con $i = 1, \dots, n$; siendo $\hat{\mathbf{y}}_{ik}$ su componente para la frecuencia k -ésima, para $k = 1, \dots, d$. La señal subyacente (la transformada de Fourier del promedio de clase) se denotará por $\hat{\mathbf{x}}$, y los estimadores M tendrán la notación $\hat{\mathbf{x}}_M$.

El modelo de cryo-EM para el espacio de Fourier difiere ligeramente del modelo expuesto en la [sección 2.2](#) en dos puntos. Por un lado, los coeficientes de Fourier de las imágenes son números complejos, en lugar de números reales como se supuso de forma implícita en la [sección 2.2](#). Por otro lado, el modelo de observación ([ecuación \(1.4\)](#)) no coincide con el modelo de localización debido a la presencia del término \hat{H}_{ij} causado por la CTF del microscopio. Veremos a continuación cómo ninguna de estas dos diferencias supone un problema a la hora de aplicar la teoría de la [sección 2.2](#) a cryo-EM, aunque sí requerirán ciertas modificaciones o apreciaciones sobre los métodos anteriormente descritos.

A nivel teórico, ninguna de estas diferencias dificulta la definición de los estimadores M , puesto que pueden seguir formulándose como solución a un problema de optimización. Basta seleccionar una función de pérdida $\rho : \mathbb{C}^d \times \mathbb{C}^d \rightarrow \mathbb{R}$, así como un término de

regularización $\phi : \mathbb{C}^d \rightarrow \mathbb{R}$, y definir el estimador $\hat{\mathbf{x}}_M$ como

$$\hat{\mathbf{x}}_M := \arg \min_{\hat{\mathbf{x}}} \sum_{i=1}^n \rho(\hat{\mathbf{y}}_i, \hat{\mathbf{x}}) + \phi(\hat{\mathbf{x}}).$$

Sin embargo, para que el estimador resultante sea razonable deben tomarse ciertas precauciones, principalmente debido a la modificación en el modelo de observación. En caso de que la función de pérdida ρ dependa de los residuos —esto es, de la diferencia entre la señal estimada y lo observado—, no tendría sentido tomar como residuo $r_i(\hat{\mathbf{x}}) = \hat{\mathbf{y}}_i - \hat{\mathbf{x}}$, pues la observación esperada para $\hat{\mathbf{y}}_i$ no es $\hat{\mathbf{x}}$, sino su versión corrompida por la CTF $\hat{\mathbf{H}}_i \odot \hat{\mathbf{x}}$, donde \odot representa el producto componente a componente o de Hadamard. Por tanto, la elección natural y coherente con el modelo de observación de la [ecuación \(1.4\)](#) es definir el residuo como $r_i(\hat{\mathbf{x}}) := \hat{\mathbf{y}}_i - \hat{\mathbf{H}}_i \odot \hat{\mathbf{x}}$, de modo que

$$\rho(\hat{\mathbf{y}}_i, \hat{\mathbf{x}}) = \rho \left(\frac{\hat{\mathbf{y}}_i - \hat{\mathbf{H}}_i \odot \hat{\mathbf{x}}}{\sigma} \right),$$

donde, como antes, $\sigma \in \mathbb{R}^d$ es un parámetro de escala que supondremos conocido.

Para tratar con los coeficientes complejos, varios enfoques son posibles. Por un lado, se puede separar el problema en parte real e imaginaria, y resolver dos problemas independientes, o identificar $\mathbb{C}^d \equiv \mathbb{R}^{2d}$ y trabajar como en el caso real. En ese caso, si se quiere separar el problema en problemas unidimensionales, tanto por parte real e imaginaria como por frecuencia, puede tomarse

$$\rho(\hat{\mathbf{y}}_i, \hat{\mathbf{x}}) = \sum_{k=1}^d \rho_0(\operatorname{Re}(\hat{\mathbf{y}}_{ik}), \operatorname{Re}(\hat{\mathbf{x}}_k)) + \rho_0(\operatorname{Im}(\hat{\mathbf{y}}_{ik}), \operatorname{Im}(\hat{\mathbf{x}}_k))$$

Sin embargo, tratar las partes real e imaginaria de cada coeficiente de manera independiente puede no resultar natural. Otra formulación posible consiste en que la función de pérdida dependa de la norma del residuo complejo. Entonces, y separando el problema por frecuencias, se tendría

$$\rho(\hat{\mathbf{y}}_i, \hat{\mathbf{x}}) = \sum_{k=1}^d \rho_0 \left(\left| \frac{\hat{\mathbf{y}}_{ik} - \hat{H}_{ik} \hat{\mathbf{x}}_k}{\sigma_j} \right| \right).$$

En este caso, procediendo de manera similar a la [sección 2.2.6](#), se puede deducir un esquema iterativo dado por

$$\hat{\mathbf{x}}_k^{(t+1)} = \frac{\frac{1}{\sigma_k^2} \sum_{i=1}^n \omega(|r_i^{(t)}|) \hat{H}_{ik} \hat{\mathbf{y}}_{ik} + \frac{\mu_k}{\tau_k^2}}{\frac{1}{\sigma^2} \sum_{i=1}^n \omega(|r_i^{(t)}|) \hat{H}_{ik}^2 + \frac{1}{\tau^2}}, \quad (2.16)$$

donde $\omega(r) = \rho'(r)/r$, y se ha supuesto una distribución a priori $\mathcal{N}(\mu_k, \tau_k^2 I)$ para la frecuencia $\hat{\mathbf{x}}_k$.

2.4. Estimación conjunta en espacio real y espacio de Fourier

Los métodos discutidos anteriormente pueden aplicarse tanto en el espacio real como en el espacio de Fourier, pero ninguno de ellos actúa de forma conjunta en ambos dominios.

Si bien la representación de las imágenes en el espacio de Fourier y en el espacio real contienen la misma información, distintas maneras de representar la información pueden facilitar la detección de distintos errores. Por este motivo, algunos métodos de cryo-EM hacen uso explícito de ambas representaciones de las imágenes [18].

En esta sección, se introduce una familia de estimadores (que formalmente está incluida dentro de los estimadores M) que combina la estimación en el espacio real con el espacio de Fourier de forma explícita. El objetivo es proporcionar una estimación \mathbf{x} que combine robustez en ambos dominios, permitiendo que el método suprima *outliers* a nivel de píxel, así como picos espurios en coeficientes de Fourier, dentro de un mismo marco de estimación.

Para ello, definiremos nuevamente un estimador como solución a un problema de optimización, donde en este caso la función de pérdida estará compuesta por dos términos: uno correspondiente al espacio real y otro correspondiente al espacio de Fourier. Antes de ello, fijamos la siguiente notación:

- \mathcal{F} denotará la transformada de Fourier. Adoptaremos la convención en que \mathcal{F} es un operador unitario.
- $\mathbf{y}_i \in \mathbb{R}^p$ denotará la imagen i -ésima, $\hat{\mathbf{y}}_i = \mathcal{F}\mathbf{y}_i \in \mathbb{R}^d$ su transformada de Fourier, y $\mathbf{y}_i^W \in \mathbb{R}^p$ será el resultado de corregir la CTF sobre la imagen en el espacio real.
- Se utilizará el subíndice j para recorrer los píxeles de una imagen en el espacio real, mientras que el subíndice k recorrerá las frecuencias en el espacio de Fourier.
- \hat{H}_i será el valor de la CTF para la imagen i .

Con esta notación, el estimador viene dado por la resolución de un problema de optimización que combina una pérdida robusta en el dominio real con otra pérdida robusta en el dominio de Fourier. Por simplicidad, omitiremos los posibles parámetros de escala en uno y otro dominio, de modo que

$$\arg \min_{\mathbf{x}} \sum_{i=1}^n \rho_R(\mathbf{y}_i^W - \mathbf{x}) + \lambda \sum_{i=1}^n \rho_F(\hat{\mathbf{y}}_i - \hat{\mathbf{H}}_i \odot \mathcal{F}\mathbf{x}), \quad (2.17)$$

donde $\lambda > 0$ es una constante que equilibra los términos del espacio real y el espacio de Fourier. Puesto que estamos asumiendo una transformada de Fourier unitaria, ambos dominios están expresados en la misma escala, por lo que una elección natural es $\lambda = 1$.

Para simplificar la resolución del problema de optimización, desacoplamos los términos \mathbf{x} y $\hat{\mathbf{x}} := \mathcal{F}\mathbf{x}$, pero añadiendo su relación como una restricción al problema de optimización. De este modo, la ecuación (2.17) se lee

$$\begin{aligned} \arg \min_{\mathbf{x}, \hat{\mathbf{x}}} \quad & \sum_{i=1}^n \rho_R(\mathbf{y}_i^W - \mathbf{x}) + \lambda \sum_{i=1}^n \rho_F(\hat{\mathbf{y}}_i - \hat{\mathbf{H}}_i \odot \hat{\mathbf{x}}) \\ \text{sujeto a} \quad & \hat{\mathbf{x}} = \mathcal{F}\mathbf{x}. \end{aligned} \quad (2.18)$$

Puesto que la transformada de Fourier \mathcal{F} es un operador lineal, esta formulación del problema permite utilizar el método *Alternating Direction Method of Multipliers* (ADMM) [19]. Con variables duales \mathbf{u} y parámetro de penalización $\mu > 0$, el lagrangiano aumentado (sin escalar) es

$$\mathcal{L}_\mu(\mathbf{x}, \hat{\mathbf{x}}, \hat{\mathbf{u}}) = \sum_{i=1}^n \rho_R(\mathbf{y}_i^W - \mathbf{x}) + \lambda \sum_{i=1}^n \rho_F(\hat{\mathbf{y}}_i - \hat{\mathbf{H}}_i \odot \hat{\mathbf{x}}) + \langle \hat{\mathbf{u}}, \hat{\mathbf{x}} - \mathcal{F}\mathbf{x} \rangle + \frac{1}{2}\mu \|\hat{\mathbf{x}} - \mathcal{F}\mathbf{x}\|_2^2,$$

donde $\|\cdot\|_2$ denota la norma euclídea usual. El método ADMM consiste en las iteraciones

$$\mathbf{x}^{(t+1)} := \arg \min_{\mathbf{x}} \mathcal{L}_\mu(\mathbf{x}, \hat{\mathbf{x}}^{(t)}, \hat{\mathbf{u}}^{(t)}), \quad (2.19)$$

$$\hat{\mathbf{x}}^{(t+1)} := \arg \min_{\hat{\mathbf{x}}} \mathcal{L}_\mu(\mathbf{x}^{(t+1)}, \hat{\mathbf{x}}, \hat{\mathbf{u}}^{(t)}), \quad (2.20)$$

$$\hat{\mathbf{u}}^{(t+1)} := \hat{\mathbf{u}}^{(t)} + \mu(\hat{\mathbf{x}}^{(t+1)} - \mathcal{F}\mathbf{x}^{(t+1)}). \quad (2.21)$$

Nos centramos ahora en el problema dado en la [ecuación \(2.19\)](#), que es la manera de actualizar la estimación en el espacio real. En primer lugar, simplicamos los términos de acoplamiento y penalización del lagrangiano \mathcal{L}_μ ,

$$\langle \hat{\mathbf{u}}, \hat{\mathbf{x}} - \mathcal{F}\mathbf{x} \rangle + \frac{1}{2}\mu\|\hat{\mathbf{x}} - \mathcal{F}\mathbf{x}\|_2^2.$$

Fijando $\hat{\mathbf{x}} = \hat{\mathbf{x}}^{(t)}$ y $\hat{\mathbf{u}} = \hat{\mathbf{u}}^{(t)}$, escribimos

$$\Phi(\mathbf{x}) = \langle \hat{\mathbf{u}}^{(t)}, \hat{\mathbf{x}}^{(t)} - \mathcal{F}\mathbf{x} \rangle + \frac{1}{2}\mu\|\hat{\mathbf{x}}^{(t)} - \mathcal{F}\mathbf{x}\|_2^2.$$

Utilizando la bilinealidad del producto escalar $\langle \cdot, \cdot \rangle$ y la identidad

$$\|\mathbf{v} - \mathbf{w}\|_2^2 = \|\mathbf{v}\|_2^2 - 2\langle \mathbf{v}, \mathbf{w} \rangle + \|\mathbf{w}\|_2^2, \quad (2.22)$$

podemos expandir Φ como sigue:

$$\begin{aligned} \Phi(\mathbf{x}) &= \langle \hat{\mathbf{u}}^{(t)}, \hat{\mathbf{x}}^{(t)} \rangle - \langle \hat{\mathbf{u}}^{(t)}, \mathcal{F}\mathbf{x} \rangle + \frac{\mu}{2} (\|\hat{\mathbf{x}}^{(t)}\|_2^2 - 2\langle \hat{\mathbf{x}}^{(t)}, \mathcal{F}\mathbf{x} \rangle + \|\mathcal{F}\mathbf{x}\|_2^2) \\ &= \frac{\mu}{2}\|\mathcal{F}\mathbf{x}\|_2^2 - \mu\langle \hat{\mathbf{x}}^{(t)}, \mathcal{F}\mathbf{x} \rangle + \frac{1}{\mu}\langle \hat{\mathbf{u}}^{(t)}, \mathcal{F}\mathbf{x} \rangle + \underbrace{\langle \hat{\mathbf{u}}^{(t)}, \hat{\mathbf{x}}^{(t)} \rangle + \frac{\mu}{2}\|\hat{\mathbf{x}}^{(t)}\|_2^2}_{\text{constante en } \mathbf{x}}. \end{aligned}$$

Entonces, introduciendo el centro

$$\hat{\mathbf{q}}^{(t)} := \hat{\mathbf{x}}^{(t)} + \frac{1}{\mu}\hat{\mathbf{u}}^{(t)},$$

y utilizando nuevamente la identidad de la [ecuación \(2.22\)](#) se obtiene que

$$\frac{\mu}{2}\|\mathcal{F}\mathbf{x}\|_2^2 - \mu\langle \hat{\mathbf{q}}^{(t)}, \mathcal{F}\mathbf{x} \rangle = \frac{\mu}{2}\|\mathcal{F}\mathbf{x} - \hat{\mathbf{q}}^{(t)}\|_2^2 - \frac{\mu}{2}\|\hat{\mathbf{q}}^{(t)}\|_2^2.$$

Por lo tanto,

$$\begin{aligned} \Phi(\mathbf{x}) &= \frac{\mu}{2}\|\mathcal{F}\mathbf{x} - \hat{\mathbf{q}}^{(t)}\|_2^2 + \left(\langle \hat{\mathbf{u}}^{(t)}, \hat{\mathbf{x}}^{(t)} \rangle + \frac{\mu}{2}\|\hat{\mathbf{x}}^{(t)}\|_2^2 - \frac{\mu}{2}\|\hat{\mathbf{q}}^{(t)}\|_2^2 \right) \\ &= \frac{\mu}{2}\|\mathbf{x} - \mathcal{F}^{-1}\hat{\mathbf{q}}^{(t)}\|_2^2 + \underbrace{\left(\langle \hat{\mathbf{u}}^{(t)}, \hat{\mathbf{x}}^{(t)} \rangle + \frac{\mu}{2}\|\hat{\mathbf{x}}^{(t)}\|_2^2 - \frac{\mu}{2}\|\hat{\mathbf{q}}^{(t)}\|_2^2 \right)}_{\text{constante en } \mathbf{x}}, \end{aligned}$$

donde en la segunda igualdad se ha utilizado que \mathcal{F} es una isometría. De este modo, el problema dado en la [ecuación \(2.19\)](#) para la actualización de \mathbf{x} se puede expresar como

$$\mathbf{x}^{(t+1)} = \arg \min_{\mathbf{x}} \sum_{i=1}^n \rho_R(\mathbf{y}_i^W - \mathbf{x}) + \frac{\mu}{2}\|\mathbf{x} - \mathcal{F}^{-1}\hat{\mathbf{q}}^{(t)}\|_2^2. \quad (2.23)$$

Esta formulación es ventajosa porque permite identificar que el problema de optimización es idéntico al de la definición general de estimador M planteado en la [ecuación \(2.14\)](#) (salvo por la omisión del parámetro de escala que se ha hecho en esta sección). Por lo tanto, todo lo expuesto en la [sección 2.2](#) aplica a este problema, y en particular el algoritmo IRLS como esquema iterativo para su resolución.

Procediendo de manera análoga al caso del espacio real, se puede expresar el subproblema de $\hat{\mathbf{x}}$ como

$$\hat{\mathbf{x}}^{(t+1)} = \arg \min_{\hat{\mathbf{x}}} \lambda \sum_{i=1}^n \rho_F(\hat{\mathbf{y}}_i - \hat{\mathbf{H}}_i \odot \hat{\mathbf{x}}) + \frac{\mu}{2} \|\hat{\mathbf{x}} - \hat{\mathbf{z}}^{(t)}\|_2^2 \quad (2.24)$$

donde $\hat{\mathbf{z}}^{(t)} := \mathcal{F}\mathbf{x}^{(t+1)} - \frac{1}{\mu}\hat{\mathbf{u}}^{(t)}$. Nuevamente, este problema es idéntico al planteado para definir los estimadores M^μ robustos en el espacio de Fourier, por lo que todo lo discutido en las [secciones 2.2](#) y [2.3.2](#) aplica a la resolución de este problema.

En resumen, las iteraciones del método ADMM se pueden escribir como sigue:

$$\mathbf{x}^{(t+1)} = \arg \min_{\mathbf{x}} \sum_{i=1}^n \rho_R(\mathbf{y}_i^W - \mathbf{x}) + \frac{\mu}{2} \|\mathbf{x} - \mathcal{F}^{-1}(\hat{\mathbf{x}}^{(t)} + \frac{1}{\mu}\hat{\mathbf{u}}^{(t)})\|_2^2 \quad (2.25)$$

$$\hat{\mathbf{x}}^{(t+1)} = \arg \min_{\hat{\mathbf{x}}} \lambda \sum_{i=1}^n \rho_F(\hat{\mathbf{y}}_i - \hat{\mathbf{H}}_i \odot \hat{\mathbf{x}}) + \frac{\mu}{2} \|\hat{\mathbf{x}} - (\mathcal{F}\mathbf{x}^{(t+1)} - \frac{1}{\mu}\hat{\mathbf{u}}^{(t)})\|_2^2 \quad (2.26)$$

$$\hat{\mathbf{u}}^{(t+1)} = \hat{\mathbf{u}}^{(t)} + \mu(\hat{\mathbf{x}}^{(t+1)} - \mathcal{F}\mathbf{x}^{(t+1)}) \quad (2.27)$$

donde los subproblemas dados en las [ecuaciones \(2.25\)](#) y [\(2.26\)](#) son idénticos a los que definen los estimadores tratados en la [sección 2.2](#), por lo que se utilizará el algoritmo IRLS para resolverlos.

Puesto que el algoritmo IRLS se reduce a un esquema iterativo de medias reponderadas, es posible introducir una pequeña generalización de este esquema de estimación, consistente en sustituir los esquemas de pesos derivados de una función de pérdida robusta clásica por un esquema de pesos genérico no necesariamente proveniente de una función de pérdida, como es el caso del estimador dado en [\[12\]](#). Sin embargo, hay que señalar que esto rompe la conexión con las derivaciones teóricas de esta sección, y en consecuencia se pierden las garantías teóricas de optimización que los métodos como ADMM proporcionan.

2.5. Reponderación basada en mezclas gaussianas

Los estimadores robustos descritos en las secciones anteriores presentan propiedades teóricas bien establecidas, tales como funciones de influencia acotadas y, en el caso de los estimadores redescendentes, la capacidad teórica para anular completamente la contribución de observaciones con residuos suficientemente grandes. Sin embargo, como se mostrará en el [capítulo 3](#), estas propiedades no siempre se traducen en una capacidad elevada para discriminar entre imágenes válidas y observaciones atípicas en escenarios realistas de cryo-EM.

Una posible explicación es que muchos procedimientos robustos se diseñan buscando un compromiso entre robustez y eficiencia bajo el modelo nominal. En consecuencia, los mecanismos de ponderación suelen estar calibrados para evitar pérdidas significativas de eficiencia cuando la mayoría de las observaciones son correctas, lo que limita el grado de

penalización aplicado a observaciones potencialmente contaminadas. Por otra parte, la extremadamente baja relación señal a ruido característica de cryo-EM dificulta que los residuos reflejen las discrepancias estructurales entre imágenes. Cuando el nivel de ruido domina la señal, la diferencia entre los residuos de una imagen genuina y los de una imagen atípica es pequeña en comparación con la magnitud del propio ruido. Los pesos ω_i que el estimador M asigna a las observaciones quedan entonces gobernados principalmente por las fluctuaciones del ruido, más que por diferencias estructurales en la señal que pudiesen denunciar la presencia de contaminación.

Desde un punto de vista práctico, esto implica que los pesos obtenidos por los métodos robustos pueden no ser suficientemente discriminativos cuando el objetivo es identificar y descartar imágenes de baja calidad. Por lo tanto, si se busca un método con mayor capacidad discriminativa, es necesario modificar la asignación de pesos que produce el estimador M . En esta sección, se propone un procedimiento heurístico que redistribuye esos pesos de manera más agresiva, explotando estructura aproximadamente bimodal que un modelo de contaminación como el de la [sección 2.1.1](#) podría inducir sobre la distribución de puntuaciones de las imágenes.

2.5.1. Extracción de puntuaciones globales

El primer paso del procedimiento consiste en resumir en un único escalar $s_i \in \mathbb{R}$ la información sobre la calidad de cada imagen i que los pesos del estimador M proporcionan. Dicha puntuación puede calcularse en cada iteración del algoritmo IRLS, sin necesidad de iteraciones adicionales, o bien a partir de los pesos obtenidos tras la convergencia, a cambio de un mayor coste computacional.

La definición concreta de s_i depende del tipo de pesos que produce el estimador considerado. Si el estimador asigna un único peso escalar por imagen ω_i —como ocurre cuando la función de influencia se evalúa sobre un residuo global de la imagen—, la puntuación se puede identificar directamente con dicho peso:

$$s_i := \omega_i.$$

Cuando el estimador produce pesos locales a nivel de píxel ω_{ij} o de frecuencia ω_{ik} , la puntuación global puede obtenerse mediante algún operador de agregación, como la media aritmética:

$$s_i := \frac{1}{p} \sum_{j=1}^p \omega_{ij} \quad \text{o} \quad s_i := \frac{1}{d} \sum_{k=1}^d \omega_{ik}.$$

Esta operación de agregación implica prescindir de la variabilidad espacial o espectral de los pesos, sacrificando así una de las ventajas de los estimadores que los producen.

2.5.2. Redistribución de pesos mediante un modelo de mezcla gaussiano

La hipótesis que motiva el método es que, bajo un modelo de contaminación como el descrito en la [sección 2.1.1](#), una fracción $(1 - \varepsilon)$ de las imágenes pertenece al modelo nominal (imágenes genuinas) y una fracción ε proviene de una distribución arbitraria G . Si la puntuación s_i refleja adecuadamente la bondad de ajuste de cada imagen, ambas poblaciones darán lugar a distribuciones de puntuaciones diferenciadas, de modo que la

distribución conjunta $\{s_i\}_{i=1}^n$ puede presentar una estructura bimodal, análoga al propio modelo de contaminación.

Esta estructura bimodal o de contaminación se puede tratar de aproximar mediante un modelo de mezcla gaussiano (GMM). Dado que el objetivo es distinguir entre observaciones compatibles con el modelo nominal y observaciones contaminadas, se restringe el modelo a dos componentes:

$$p(s; \boldsymbol{\theta}) = \pi_1 \mathcal{N}(s; m_1, \eta_1^2) + \pi_2 \mathcal{N}(s; m_2, \eta_2^2),$$

cuyos parámetros $\boldsymbol{\theta} = (\pi_1, \pi_2; m_1, m_2; \eta_1, \eta_2)$ se estiman mediante máxima verosimilitud utilizando el algoritmo EM [20].

Cabe señalar, sin embargo, que no hay una justificación teórica que garantice que la distribución de puntuaciones siga exacta o aproximadamente un modelo de mezcla gaussiana. El modelo se utiliza como una aproximación pragmática destinada a detectar posibles estructuras multimodales en la distribución de puntuaciones.

Una vez ajustado el modelo, se identifica la componente correspondiente a las imágenes genuinas con aquella cuya media estimada sea mayor, dado que dichas imágenes presentan puntuaciones más elevadas:

$$j^* = \arg \max_{j \in \{1, 2\}} \hat{m}_j,$$

ya que las puntuaciones elevadas corresponden, por construcción, a observaciones que han recibido un mayor grado de confianza por parte del estimador robusto.

El peso final asignado a la imagen i se define entonces como la probabilidad a posteriori de que pertenezca a la componente genuina, dada su puntuación s_i :

$$\tilde{\omega}_i := p(j = j^* | s_i; \hat{\boldsymbol{\theta}}) = \frac{\hat{\pi}_{j^*} \mathcal{N}(s_i; \hat{m}_{j^*}, \hat{\eta}_{j^*}^2)}{\sum_{j=1}^2 \hat{\pi}_j \mathcal{N}(s_i; \hat{m}_j, \hat{\eta}_j^2)}.$$

A diferencia de los pesos directos ω_i del estimador M , el peso $\tilde{\omega}_i$ toma en consideración la distribución global de puntuaciones del conjunto completo de imágenes antes de tomar la decisión de pertenencia. La distribución de pesos resultante tiende a ser más extrema: las imágenes cuya puntuación se asocia a la componente genuina obtienen valores $\tilde{\omega}_i \approx 1$, mientras que las imágenes cuya puntuación se asocia a la componente contaminante obtienen valores $\tilde{\omega}_i \approx 0$; pudiendo haber también imágenes con pesos intermedios.

De este modo, el procedimiento actúa como una redistribución más agresiva de los pesos del estimador M , cuya eficacia en la detección de imágenes atípicas se evaluará experimentalmente en el [capítulo 3](#). El objetivo no es incorporar información adicional, sino explotar la posible estructura multimodal presente en las puntuaciones para obtener una separación más marcada entre observaciones.

2.5.3. Condiciones de aplicación de la reponderación

Como se ha comentado anteriormente, la redistribución de pesos basada en el modelo GMM tiende a producir ponderaciones más extremas que las obtenidas directamente mediante los estimadores M . Si bien esto permite descartar las imágenes atípicas con mayor agresividad, también trae consigo un riesgo asociado: imágenes con información valiosa podrían estar descartándose por completo si su puntuación es ligeramente inferior a la media, mientras que imágenes atípicas podrían contribuir con peso ≈ 1 si su puntuación

resulta ser buena. Además, en caso de que la distribución de las puntuaciones no tenga el comportamiento bimodal esperado, el ajuste del GMM puede ser inestable y producir resultados inesperados. En este apartado, se proponen ciertas restricciones o condiciones necesarias para la aplicación de esta redistribución de pesos, con el fin de evitar estas situaciones.

Criterios de bondad de ajuste

Una posible regla consiste en permitir la redistribución de pesos únicamente cuando la evidencia a favor de un modelo de mezcla sea suficientemente fuerte. Para ello, puede compararse el ajuste de un modelo gaussiano de una única componente frente al modelo GMM de dos componentes mediante criterios de selección de modelos como el AIC o el BIC.

Si L denota la verosimilitud del modelo, p el número de parámetros libres y n el número de observaciones, dichos criterios se definen como

$$\begin{aligned} \text{AIC} &= -2 \log L + 2p, \\ \text{BIC} &= -2 \log L + p \log n. \end{aligned}$$

Ambos criterios penalizan la complejidad del modelo, de modo que valores más pequeños indican un mejor compromiso entre bondad de ajuste y número de parámetros.

Tomando como referencia el BIC, si denotamos

$$\Delta\text{BIC} := \text{BIC}_1 - \text{BIC}_2,$$

donde BIC_1 y BIC_2 corresponden respectivamente a los modelos de una y dos componentes, puede fijarse un umbral $U_{\text{BIC}} > 0$ y aplicar la redistribución de pesos únicamente cuando

$$\Delta\text{BIC} \geq U_{\text{BIC}}.$$

De esta forma, la reponderación solo se activa cuando la hipótesis de una distribución bimodal recibe un respaldo suficiente por parte de los datos.

Criterios numéricos

Incluso cuando el modelo de dos componentes proporciona un mejor ajuste global, las dos gaussianas ajustadas pueden estar fuertemente solapadas. En tal situación, la clasificación de las observaciones resulta incierta y las probabilidades a posteriori calculadas por el GMM pueden ser poco informativas.

Sean $\hat{m}_j, \hat{\eta}_j^2$ la media y la varianza estimadas para la componente j . Puede exigirse que ambas componentes estén suficientemente separadas mediante la condición

$$\frac{|\hat{m}_1 - \hat{m}_2|}{\sqrt{\hat{\eta}_1^2 + \hat{\eta}_2^2}} \geq \varepsilon_m,$$

donde $\varepsilon_m > 0$ es un parámetro de tolerancia.

Esta magnitud puede interpretarse como una medida adimensional de separación entre componentes. Valores pequeños indican que las dos gaussianas presentan un elevado solapamiento y que, por tanto, la hipótesis de dos grupos claramente diferenciados resulta poco plausible.

Tamaño mínimo de las componentes

Otra situación problemática aparece cuando una de las componentes del GMM contiene una fracción muy pequeña de las observaciones. En estos casos, el algoritmo EM puede ajustar una componente espuria para modelar una cola de la distribución o unas pocas observaciones aisladas. En aplicaciones donde se observe una tendencia del algoritmo EM a generar componentes degeneradas, puede imponerse adicionalmente una condición de tamaño mínimo de las componentes gaussianas del modelo.

Si $\hat{\pi}_1$ y $\hat{\pi}_2$ denotan las proporciones estimadas de cada componente, puede imponerse la condición

$$\min(\hat{\pi}_1, \hat{\pi}_2) \geq \varepsilon_\pi,$$

donde $\varepsilon_\pi > 0$ representa una proporción mínima admisible.

Esta restricción evita activar la redistribución de pesos cuando la supuesta estructura bimodal está sustentada únicamente por un número reducido de observaciones.

Pese a la introducción de estas restricciones, la introducción del paso de reponderación rompe las garantías de convergencia habituales del esquema IRLS. En consecuencia, el procedimiento debe interpretarse como una heurística empírica cuyo comportamiento se evalúa experimentalmente en el capítulo siguiente.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Evaluación en datos sintéticos

Para evaluar los métodos de estimación presentados en el [capítulo 2](#), se han realizado experimentos sobre datos sintéticos que tratan de simular el modelo de contaminación en cryo-EM.

3.1.1. Datos utilizados: generación sintética

La generación de los datos sintéticos se ha realizado de la siguiente manera: para generar un promedio de clase simulado como señal subyacente, se ha tomado una estructura tridimensional conocida del Protein Data Bank, correspondiente al proteasoma 20S [21]. Dicha estructura fue convertida en un mapa tridimensional de potencial electrostático, tras lo cual se tomaron distintas proyecciones bidimensionales de dicho mapa tridimensional como imágenes de referencia, todo ello mediante el *software* de procesamiento de imagen para cryo-EM *Scipion* [22].

Para la generación de un conjunto de datos, el procedimiento ha sido el siguiente: tras elegir una de las imágenes de referencia como promedio de clase subyacente, se genera una cierta cantidad de copias de dicha imagen. Para simular errores de alineamiento pequeños (admisibles), se aplica una rotación bidimensional a cada una de estas imágenes, con un ángulo elegido de manera uniforme en el intervalo $[-2,5, 2,5]$ (en grados). Estas imágenes, que llamaremos *imágenes genuinas* o *inliers*, representarán las observaciones no contaminadas, consistentes con el modelo de observación descrito en la [ecuación \(1.5\)](#).

Para simular una cierta proporción ε de observaciones contaminadas, se introducen dos tipos de *outliers* entre los datos:

- Imágenes que contienen el mismo promedio de clase subyacente que las imágenes genuinas, pero que se encuentran sustancialmente mal alineadas. Diremos que son imágenes o outliers *mal alineados*.
- Imágenes que contienen una proyección bidimensional distinta de la estructura tridimensional inicial. Estas imágenes, que denominamos imágenes o outliers *mal clasificados*, simulan ser errores de clasificación provenientes de la clasificación 2D.

En conjunto, diremos que estas imágenes son *imágenes contaminadas* o *contaminantes*.

Después, cada imagen i se modifica con ruido gaussiano aditivo $\varepsilon_i \sim \mathcal{N}(0, \sigma_i^2 I)$, con el objetivo de alcanzar una cierta relación señal a ruido (SNR), dependiente del experimento realizado. Aunque el ruido presente en datos reales de cryo-EM puede exhibir

estructuras más complejas, el modelo gaussiano isotrópico resulta suficiente para estudiar el comportamiento de los estimadores frente a distintos niveles de ruido.

Los experimentos cuyos resultados se muestran a continuación consideran un total de $n = 1500$ imágenes, de las cuales una proporción $\varepsilon = \frac{1}{3}$ son imágenes contaminadas. Entre estas imágenes contaminadas, la mitad representarán errores de alineamiento y la otra mitad, errores de clasificación. Se ha elegido esta configuración por considerarse representativa de la situación habitual en la estimación de representantes de clase en cryo-EM.

3.1.2. Métricas evaluadas

Los experimentos con datos sintéticos permiten evaluar distintas métricas sobre la capacidad de los métodos para descartar las imágenes contaminantes y producir promedios de clase que representen fielmente la señal subyacente. Las métricas consideradas se pueden dividir en dos grupos:

- Métricas de reconstrucción. Se centran en medir la similitud (o diferencia) del promedio de clase producido por el método con la señal utilizada para generar las imágenes de la clase mayoritaria. Las métricas concretas utilizadas serán la raíz del error cuadrático medio (RMSE) y la correlación. El RMSE cuantifica errores absolutos de intensidad, mientras que la correlación mide similitud estructural independientemente de cambios globales de escala.

Estas métricas son de gran importancia, puesto que el objetivo de la estimación es la producción de promedios de clase de calidad, no la resolución de un problema de clasificación. Sin embargo, las características de las imágenes de cryo-EM provocan que las medidas de similitud puedan estar dominadas por el ruido, de modo que se deben tomar con cierta precaución. Por lo tanto, se medirá también la capacidad de los estimadores para producir pesos coherentes con la estructura del conjunto de datos generado, de modo que concedan pesos mayores a las imágenes de la clase mayoritaria.

- Métricas de clasificación. Se centran en la evaluación de los pesos producidos por cada uno de los métodos. Estos pesos pueden ser entendidos como una puntuación concedida a cada imagen en función de su calidad, además de tener una clara participación en el cálculo del promedio de clase. Puesto que el cálculo de métricas de clasificación para cada uno de los píxeles de la imagen puede ser tedioso y de difícil interpretación, los pesos locales por píxel o por frecuencia se agregarán por imagen como en la [sección 2.5](#).

Para calcular estas métricas, fijaremos como clase positiva la detección de *inliers*. Puesto que el problema de fondo no es de clasificación, sino que estamos interesados en el efecto de estos pesos sobre el promedio de clase resultante, no fijaremos un umbral para realizar el cálculo de las métricas de clasificación, sino que se utilizarán directamente los valores de los pesos o las puntuaciones por imagen. Seguiremos el esquema dado en [12], donde las métricas calculadas no son las clásicas precisión y sensibilidad para problemas de clasificación binaria, sino sus análogos para pesos definidos en dicho artículo:

$$\hat{P} = \frac{\sum_{i \in S} s_i}{\sum_{i=1}^n s_i}, \quad \text{y} \quad \hat{R} = \frac{\sum_{i \in S} \min\left(1, \frac{s_i}{\sum_{j=1}^n s_j} n_{\text{in}}\right)}{n_{\text{in}}},$$

donde S es el conjunto de índices de *inliers*, s_i son las puntuaciones globales por imagen y n_{in} es el número de *inliers* ($n_{\text{in}} = |S|$). \hat{P} mide la fracción del peso total que el método asigna a imágenes genuinas, por lo que se propone como sustituto de la precisión; mientras que \hat{R} mide la proporción de imágenes genuinas que reciben una cantidad significativa de peso, por lo que se propone como sustituto de la sensibilidad [12].

Adicionalmente, se calculan las métricas de *ROC-AUC* y *average precision*. Estas métricas son independientes de la escala absoluta de los pesos y dependen únicamente de su capacidad para ordenar correctamente las observaciones. Si bien esto no representa la actuación de los pesos dentro del cálculo del promedio de clase, permitirá distinguir si, en general, las imágenes atípicas están recibiendo pesos menores que las imágenes correctas. Esta es una propiedad deseable del método, e indica, por ejemplo, si es un buen candidato para la reponderación propuesta en la [sección 2.5](#).

3.1.3. Métodos evaluados

El objetivo de esta sección es evaluar y comparar los diversos métodos de estimación robusta propuestos en el [capítulo 2](#), con el fin de estudiar su comportamiento frente a distintos niveles de ruido o de contaminación y determinar cuáles son los más prometedores para aplicar a casos reales.

Los métodos de estimación robusta a evaluar son:

- **Estimadores M en el espacio real o en el espacio de Fourier** ([secciones 2.3.1](#) y [2.3.2](#)). Se considerarán distintas funciones de pérdida por píxel o por frecuencia basadas en los residuos: $\rho = \sum_{j=1}^p \rho\left(\frac{y_{ij} - x_j}{\sigma_j}\right)$ en el caso del espacio real; y $\rho = \sum_{k=1}^d \rho\left(\frac{\hat{y}_{ik} - \hat{x}_k}{\sigma_k}\right)$ para el espacio de Fourier. Las funciones de peso consideradas serán:

- **Huber:**

$$\omega(r) = \min\left(1, \frac{\delta}{|r|}\right), \quad (3.1)$$

donde $\delta > 0$ es un hiperparámetro.

- **Student:**

$$\omega(r) = \frac{\nu + 1}{\nu + r^2}, \quad (3.2)$$

donde $\nu > 0$ es un hiperparámetro.

- **Cauchy:**

$$\omega(r) = \frac{1}{1 + (r/c)^2}, \quad (3.3)$$

donde $c > 0$ es un hiperparámetro.

- **Redescendente suave:**

$$\omega(r) = \frac{2}{\delta^2} \exp\left(-\frac{r^2}{\delta^2}\right) \propto \exp\left(-\frac{r^2}{\delta^2}\right), \quad (3.4)$$

donde $\delta > 0$ es un hiperparámetro.

Para cada una de estas funciones de peso, se realizará una búsqueda en rejilla con distintos valores del hiperparámetro para seleccionar un valor adecuado. Posteriormente, se comparará su rendimiento utilizando en cada función tan solo el valor seleccionado previamente.

Además, en el caso del espacio real se evaluará también el esquema de pesos globales propuesto en [12]:

$$\omega(\mathbf{y}_i, \mathbf{x}) = \frac{|\langle \mathbf{y}_i, \mathbf{x} \rangle|}{\|\mathbf{y}_i\| \|\mathbf{x}\|} \exp \left(-\beta \|\mathbf{y}_i - \frac{\langle \mathbf{y}_i, \mathbf{x} \rangle}{\|\mathbf{x}\|^2} \mathbf{x}\|^2 \right), \quad (3.5)$$

con $\beta > 0$ un hiperparámetro que en [12] se recomienda fijar a $\beta = \bar{\beta}/\sigma^2$, donde σ^2 es la varianza del ruido de las imágenes y $\bar{\beta} = 10^{-5}$. Si bien $\bar{\beta}$ se considera una constante en [12], en este trabajo también se estudiará el efecto de diversos valores del parámetro β y $\bar{\beta}$ sobre las propiedades del método.

- **Estimadores conjuntos en espacio real y de Fourier** (sección 2.4). Esta clase de estimadores requiere de la elección de una función de pérdida (y por tanto, de un esquema de pesos) para el espacio real y otra para el espacio de Fourier. Aunque cualquier combinación es posible en principio, nos restringiremos a considerar casos en que el esquema de pesos en el espacio real es idéntico al del espacio de Fourier, utilizando las funciones descritas anteriormente. La única excepción será la utilización de los pesos de [12] en el espacio real junto con los pesos redescendentes (ecuación (3.4)) en Fourier. Esta combinación se incluye por combinar los esquemas que mostraron mejor comportamiento cuando se evaluaron por separado en cada dominio.
- **Reponderación con GMM** (sección 2.5). Con el fin de limitar el número de combinaciones evaluadas, la reponderación mediante GMM se aplicará únicamente al esquema de pesos de [12] (ecuación (3.5)). La elección se basa en que dicho método produce un único peso global por imagen, lo que simplifica la interpretación de las puntuaciones empleadas por el GMM.

Además, a modo de base, dichos métodos se compararán siempre con la media muestral. Para el cálculo de métricas de clasificación, se considera que la media muestral es un estimador que asigna peso idénticamente 1 a todas las observaciones.

Para aquellos métodos o funciones de peso que poseen hiperparámetros ajustables, se ha realizado una búsqueda en rejilla para algunos valores representativos del hiperparámetro. Posteriormente se han seleccionado aquellos que producían un mejor rendimiento global, evaluando en conjunto las métricas de clasificación y de reconstrucción, y valorando especialmente un rendimiento consistente para diferentes niveles de la relación señal a ruido.

3.1.4. Resultados por método

Presentamos en esta sección, para cada familia de métodos, los resultados obtenidos por distintas elecciones posibles para la función de pérdida (o equivalentemente, para el esquema de pesos). Para aquellas funciones que poseen hiperparámetros ajustables, se han utilizado siempre los seleccionados en el apartado anterior.

Estimadores M en el espacio real.

En la figura 3.1, se muestran las métricas de precisión \hat{P} (figura 3.1a) y sensibilidad \hat{R} (figura 3.1b) (definidas en la sección 3.1.2) obtenidas por cada uno de los estimadores M evaluados en el espacio real, además de la media muestral.

Ambas métricas muestran un comportamiento idéntico: en primer lugar, destaca claramente el esquema de pesos de [12], que obtiene precisión y sensibilidad de en torno a 0,72 en todos los niveles de relación señal a ruido. Si bien el comportamiento de todos los estimadores se degrada con niveles de ruido más elevados, el esquema de pesos de [12] mantiene un buen rendimiento en todos los niveles evaluados. En comparación, el resto de estimadores apenas superan a la media muestral.

Esta diferencia puede deberse a las limitaciones comentadas en la [sección 2.5](#), además del hecho de que estos otros métodos trabajan con esquemas de pesos por píxel. Por un lado, diferenciar imágenes genuinas de imágenes contaminadas a nivel de píxel es una tarea claramente más difícil que hacerlo a nivel global, por lo que un rendimiento menor es esperable. Por otro lado, hay que recordar que estas métricas están calculadas a partir de las puntuaciones globales, que en el caso de los esquemas de pesos por píxel se han calculado como la media agregada por píxel. Por tanto, los píxeles de fondo, que son iguales en las imágenes genuinas y las imágenes contaminadas, podrían estar diluyendo diferencias presentes en los píxeles que contienen señal.

Esta segunda interpretación está apoyada por las métricas de *average precision* y *ROC-AUC* ([figura 3.2](#)), que solo dependen de la capacidad del estimador para ordenar las observaciones. En dichas métricas, vemos que estos estimadores sí poseen cierta capacidad para diferenciar imágenes genuinas de imágenes contaminadas. A pesar de que se siguen viendo superadas por el esquema de pesos global, en este caso sí que se muestran claramente superiores a la media muestral. Además de esto, en general destacan los valores que obtienen todos los estimadores en estas métricas, por encima de 0,8 o 0,75 para los niveles de ruido no muy extremos.

Sin embargo, en las métricas de reconstrucción el rendimiento es acorde a lo que muestran la precisión ([figura 3.1a](#)) y la sensibilidad ([figura 3.1b](#)): el único estimador que mejora a la media muestral de manera consistente es el basado en los pesos de [12]. La imagen correspondiente a la estimación producida por este método se puede encontrar en la [figura 3.14b](#). El resto de estimadores obtienen resultados prácticamente idénticos o incluso inferiores en algunos casos.

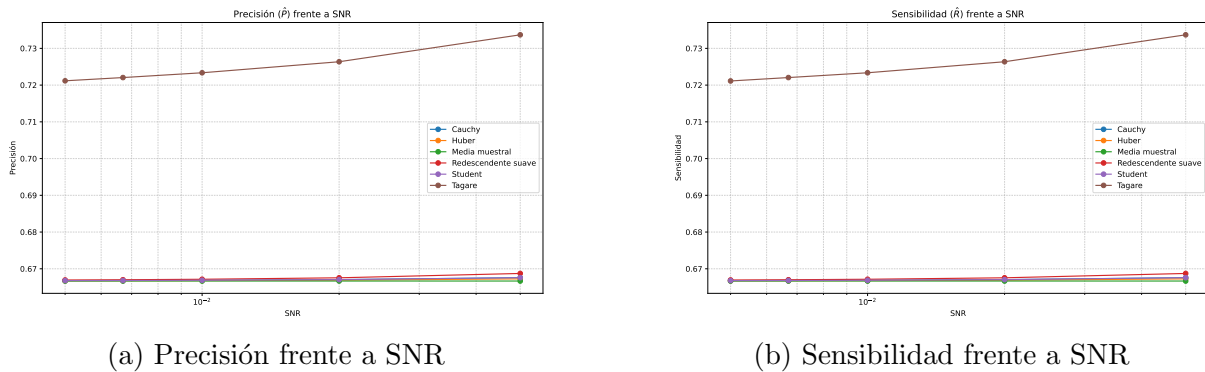
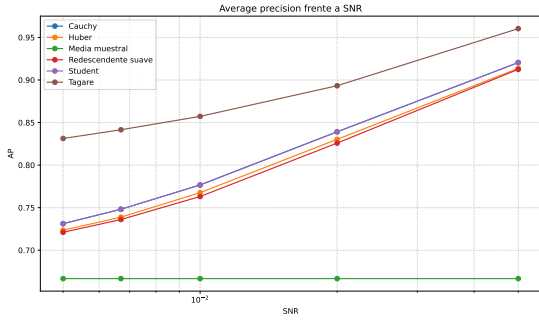
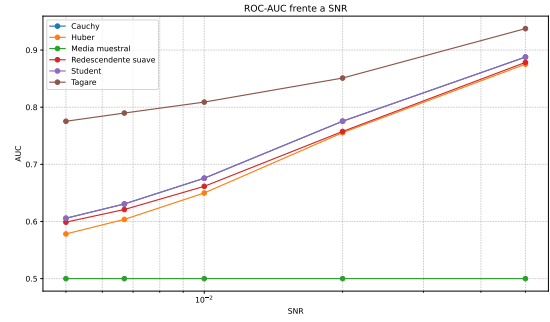


Figura 3.1: Métricas de clasificación para los pesos agregados de estimadores M en el espacio real para distintas funciones de peso: precisión y sensibilidad.

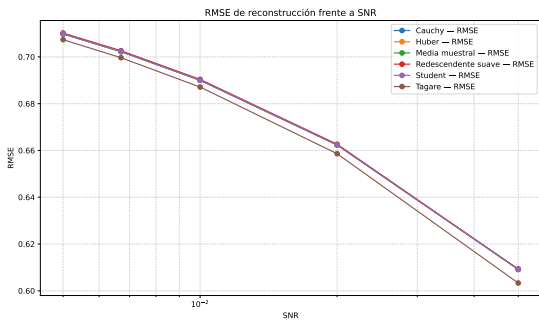


(a) *Average precision* frente a SNR

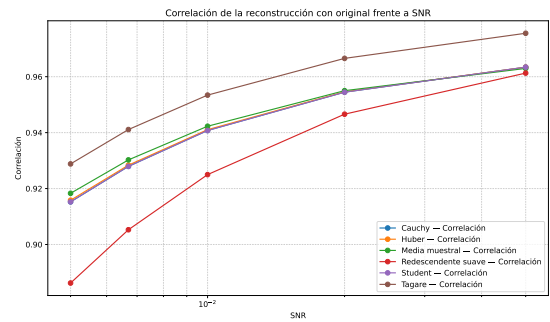


(b) *ROC-AUC* frente a SNR

Figura 3.2: Métricas de clasificación para los pesos agregados de estimadores M en el espacio real para distintas funciones de peso: *average precision* y *ROC-AUC*.



(a) RMSE frente a SNR



(b) Correlación frente a SNR

Figura 3.3: Métricas de reconstrucción (RMSE y correlación) para los estimadores M en el espacio real para distintas funciones de peso.

Estimadores M en el espacio de Fourier.

Realizamos un análisis similar al anterior para el caso de los estimadores que trabajan sobre la representación de las imágenes en el espacio de Fourier. En este caso, los resultados de las métricas de clasificación son prácticamente idénticos a los obtenidos por los estimadores en el espacio real: en cuanto a precisión y sensibilidad (figura 3.4), el esquema de pesos de [12] obtiene buenos resultados, mientras que los esquemas de pesos por frecuencia apenas superan a la media muestral. En *average precision* y *ROC-AUC* (figura 3.5), los esquemas de pesos por frecuencia sí superan claramente a la media muestral, aunque los pesos de [12] siguen siendo algo superiores.

En cambio, y a diferencia de lo que sucede en el espacio real, en las métricas de reconstrucción (figura 3.6) se aprecia que los estimadores que emplean esquemas de pesos por frecuencia sí obtienen buenos resultados, que superan a la media muestral de forma consistente para todos los niveles de ruido, y en algunos casos incluso al esquema de pesos globales. Para niveles de ruido bajos o moderados, los mejores resultados son los obtenidos por los pesos redescendentes suaves.

Esta diferencia de comportamiento entre las métricas de clasificación y las métricas de reconstrucción puede deberse a la distribución de la información en las distintas frecuencias de la transformada de Fourier de las imágenes. Debido a los altos niveles de ruido, las altas frecuencias apenas contienen información, por lo que resultan poco relevantes para la reconstrucción. En cambio, las frecuencias bajas y medias concentran más información,

por lo que un buen rendimiento sobre unas pocas frecuencias puede tener un gran impacto sobre la estimación final. A modo representativo, en la [figura 3.7](#) se muestra la imagen original junto con la estimación producida con la media muestral y con el método de pesos redescendentes.

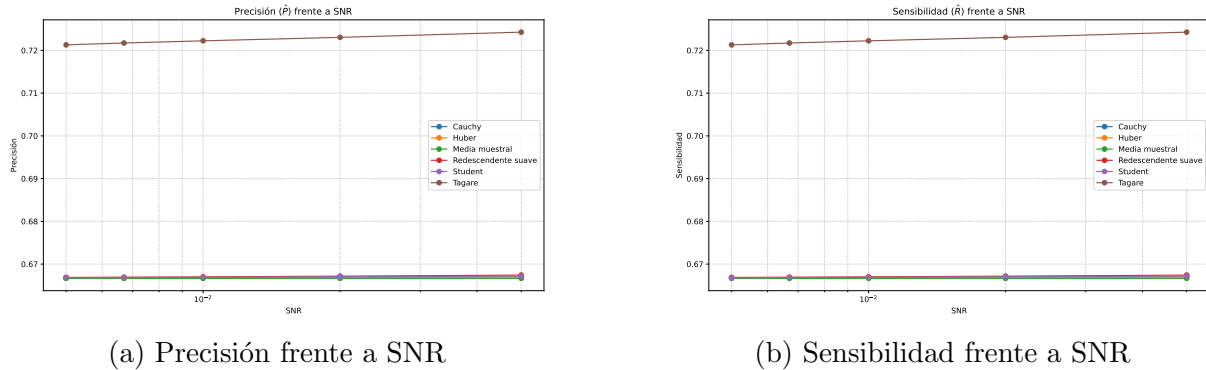


Figura 3.4: Métricas de clasificación para los pesos agregados de estimadores M en el espacio de Fourier para distintas funciones de peso: precisión y sensibilidad.

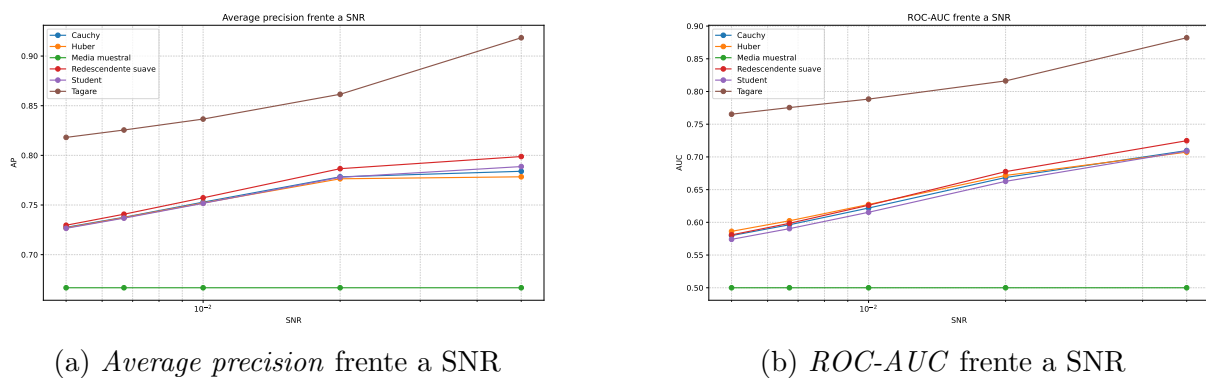


Figura 3.5: Métricas de clasificación para los pesos agregados de estimadores M en el espacio de Fourier para distintas funciones de peso: *average precision* y *ROC-AUC*.

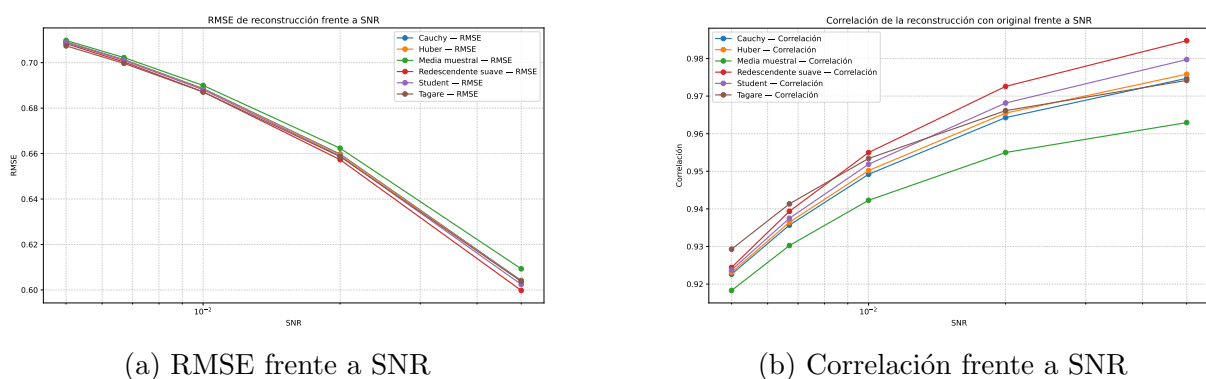


Figura 3.6: Métricas de reconstrucción para los estimadores M en el espacio de Fourier para distintas funciones de peso: RMSE y correlación.

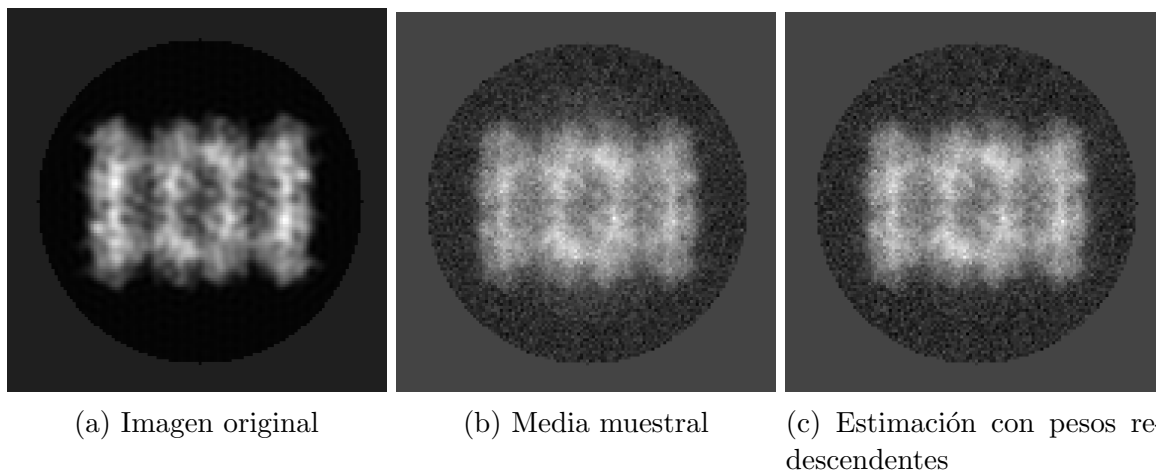


Figura 3.7: Imagen original e imágenes obtenidas con distintos métodos de estimación en el espacio de Fourier (media muestral y pesos redescendentes), con relación señal a ruido $\text{SNR} = 0,01$.

Estimación conjunta en el espacio real y de Fourier

En el caso de los estimadores que actúan de forma conjunta en el espacio real y el espacio de Fourier, el análisis se centrará en estudiar si el proceso de estimación simultánea sobre ambos dominios puede mejorar el rendimiento de los estimadores en cada uno de dichos dominios de forma individual. A modo representativo, se muestran los resultados para los dos esquemas que obtuvieron mejores resultados en los experimentos anteriores: los pesos globales de [12] (ecuación (3.5)) en el espacio real y los pesos redescendentes de la ecuación (3.4) en el espacio de Fourier. Dichos métodos se comparan con dos esquemas de estimación conjunta:

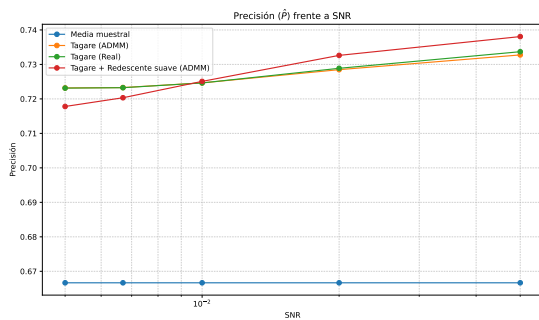
1. Un estimador conjunto que utiliza el esquema de pesos globales de [12] en ambos dominios.
2. Un estimador conjunto que utiliza el esquema de pesos globales de [12] en el espacio real, y pesos redescendentes por frecuencia en el espacio de Fourier. Puesto que este esquema concede una importancia mayor al espacio de Fourier, donde se asigna un peso por frecuencia, se ha tomado el valor $\lambda = 0,2$ (ecuación (2.17)) para equilibrar ambos dominios.

Estos estimadores, actuando de forma conjunta en el espacio real y el espacio de Fourier, producen un conjunto de pesos en cada dominio, por lo que se pueden estudiar sus métricas de clasificación por separado. En el caso de los pesos en el espacio real, en la figura 3.8 se puede apreciar que el esquema combinado de pesos globales en el espacio real y pesos redescendentes por frecuencia en Fourier mejora ligeramente a la utilización de pesos globales únicamente en el espacio real para niveles de ruido bajos y moderados, aunque su rendimiento resulta peor en niveles de ruido elevados. En cambio, la utilización de pesos globales en ambos dominios apenas presenta diferencia con los pesos globales tan solo en el espacio real. En cuanto a los pesos en el espacio de Fourier, se ha observado un comportamiento análogo al de la figura 3.4: tan solo el esquema de pesos globales obtiene métricas de precisión y sensibilidad claramente superiores a la media muestral.

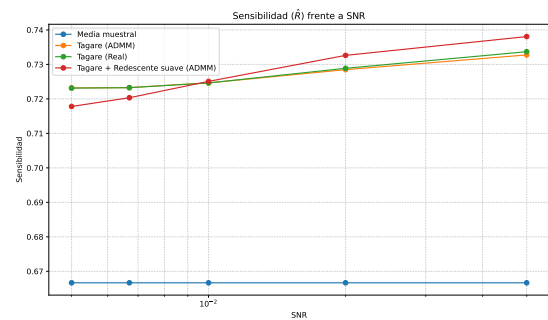
En términos de *average precision*, la figura 3.9 muestra que, en el espacio real (figura 3.9a), el estimador conjunto que combina pesos globales con redescendentes también

mejora al resto de estimadores, en este caso manteniendo un buen rendimiento para niveles de ruido elevados. En el espacio de Fourier (figura 3.9b), vemos que los dos esquemas que utilizan pesos por frecuencia obtienen resultados muy similares, superando a la media muestral, pero siendo superados por el esquema de pesos globales.

Sin embargo, las métricas de reconstrucción de la figura 3.10 muestran que el rendimiento de los estimadores conjuntos apenas difiere de los estimadores que actúan en un solo dominio: el esquema con pesos globales en ambos dominios se comporta de forma prácticamente idéntica al esquema de pesos globales en el espacio real; mientras que el esquema con pesos globales en el espacio real y redescendentes en Fourier imita al estimador que únicamente utiliza pesos redescendentes en Fourier.

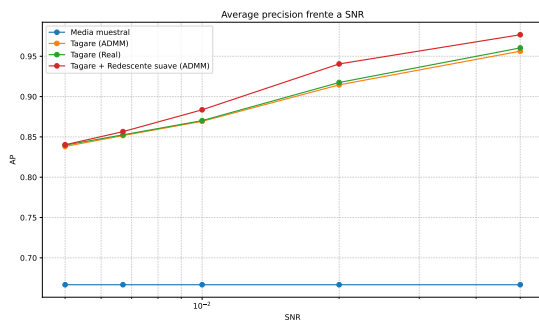


(a) Precisión frente a SNR

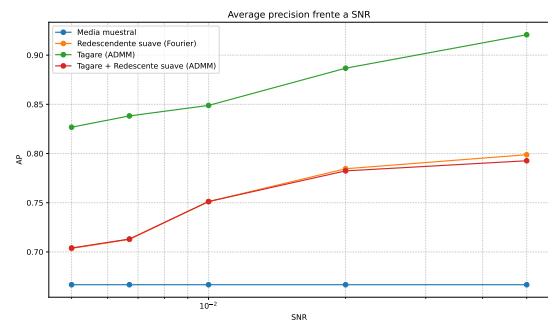


(b) Sensibilidad frente a SNR

Figura 3.8: Métricas de clasificación para los pesos en el espacio real agregados de los estimadores que combinan estimación en espacio real y de Fourier, así como sus equivalentes en un solo dominio: precisión y sensibilidad.

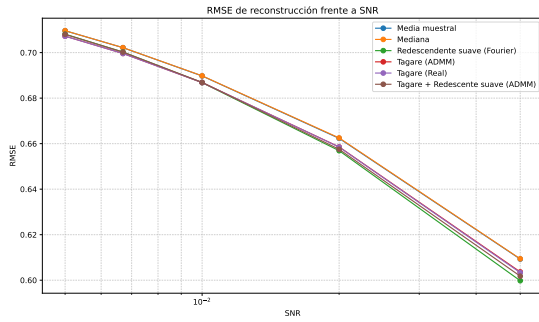


(a) *Average precision* frente a SNR para pesos en el espacio real

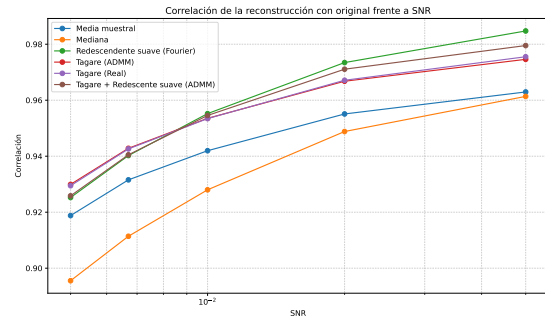


(b) *Average precision* frente a SNR para pesos en el espacio de Fourier

Figura 3.9: *Average precision* para los pesos agregados de los estimadores que combinan estimación en espacio real y de Fourier, así como sus equivalentes en un solo dominio.



(a) RMSE frente a SNR



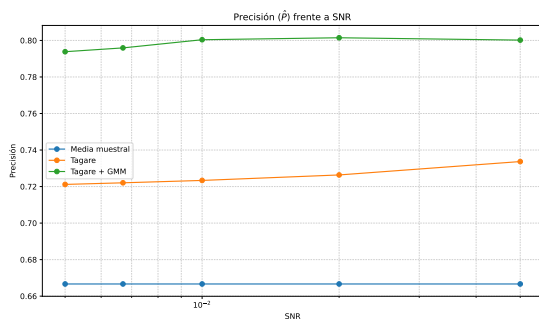
(b) Correlación frente a SNR

Figura 3.10: Métricas de reconstrucción para los estimadores que combinan estimación en espacio real y de Fourier, así como sus equivalentes en un solo dominio: RMSE y correlación.

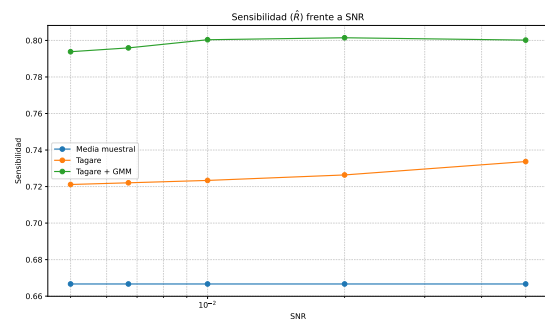
Reponderación GMM.

Como se comentó anteriormente, se ha ensayado la reponderación GMM de la [sección 2.5](#) sobre el esquema de pesos globales de la [ecuación \(3.5\)](#), en simulaciones idénticas a las anteriores. Los resultados muestran que, en las simulaciones realizadas, el método de reponderación consigue mejorar la distribución de los pesos del método, como muestran las métricas de precisión y sensibilidad ([figura 3.11](#)). Esta mejora en la distribución de los pesos se traduce en promedios de mayor calidad, como muestran las métricas de reconstrucción de la [figura 3.13](#). Las imágenes obtenidas con estos métodos se pueden comparar en la [figura 3.14](#).

También se produce una ligera mejora en las métricas de *average precision* y *ROC-AUC* ([figura 3.12](#)), lo cual puede resultar sorprendente, ya que estas métricas deberían ser invariantes a un cambio monótono en la distribución de los pesos. Sin embargo, la naturaleza iterativa del método posibilita esta mejora, ya que una mejor distribución de los pesos provoca que la referencia utilizada en la siguiente iteración sea de mayor calidad.

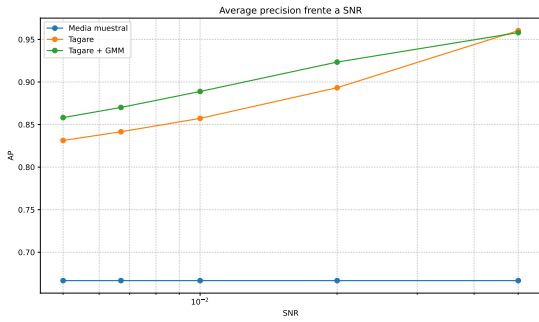


(a) Precisión frente a SNR

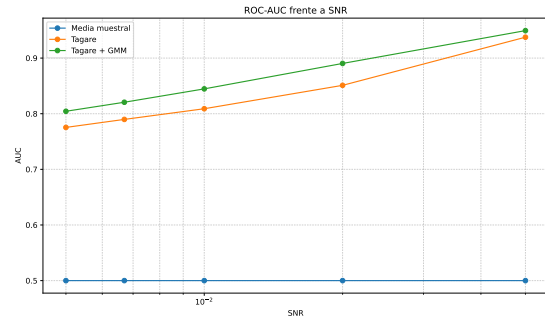


(b) Sensibilidad frente a SNR

Figura 3.11: Métricas de clasificación para el método de pesos globales de [12] y su reponderación mediante GMM: precisión y sensibilidad

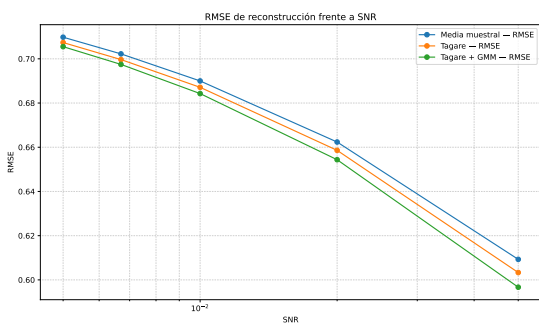


(a) *Average precision* frente a SNR

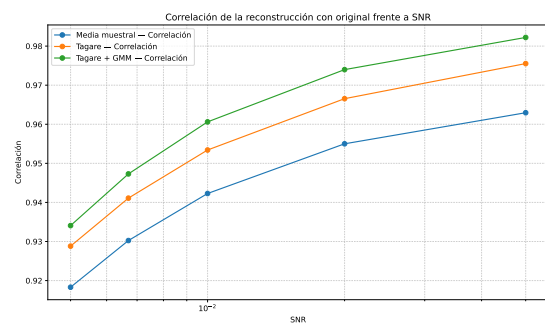


(b) *ROC-AUC* frente a SNR

Figura 3.12: Métricas de clasificación para el método de pesos globales de [12] y su reponderación mediante GMM: *average precision* y *ROC-AUC*.

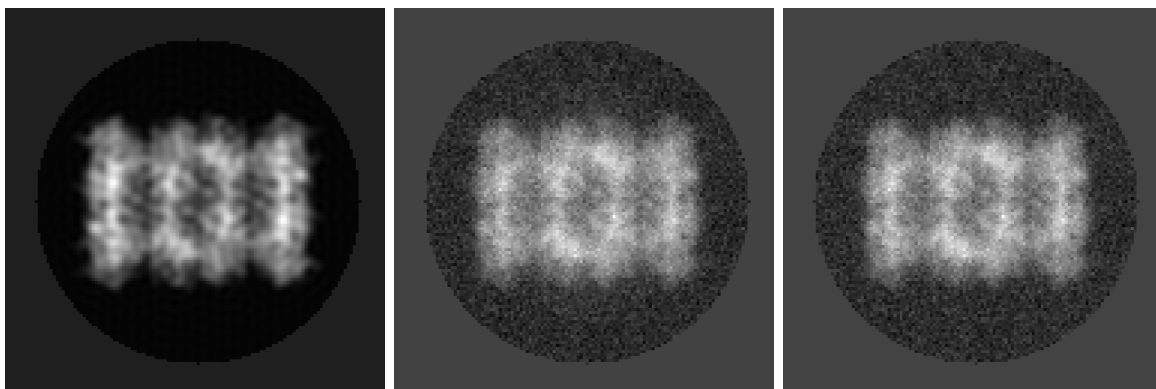


(a) RMSE frente a SNR



(b) Correlación frente a SNR

Figura 3.13: Métricas de reconstrucción (RMSE y correlación) para el método de pesos globales de [12] y su reponderación mediante GMM



(a) Imagen original

(b) Estimación con pesos de [12]

(c) Estimación con GMM sobre pesos de [12]

Figura 3.14: Imagen original e imágenes obtenidas con el esquema de pesos globales, con y sin reponderación GMM, con relación señal a ruido $SNR = 0,01$

En este caso, estudiamos también las distribuciones de pesos producidas por cada uno de los dos métodos para un nivel de relación señal a ruido representativo de 0,01. Se reproducen las distribuciones de pesos en la figura 3.15. Se puede ver que las imágenes mal alineadas obtienen un peso claramente inferior al resto de imágenes cuando se utilizan los

pesos globales sin reponderación (figura 3.15a). Esto permite al modelo GMM distinguir este tipo de imágenes del resto del conjunto de datos, de modo que todas ellas obtienen pesos muy próximos a cero (figura 3.15b).

Sin embargo, en el caso de las imágenes mal clasificadas, la separación no es tan clara, y eso provoca que el GMM asigne pesos muy cercanos a 1 para estas imágenes. Este comportamiento es esperable, pues el modelo de mezcla separa las imágenes en tan solo dos clases, y en este caso la diferencia entre imágenes mal alineadas y el resto es mayor que la diferencia entre imágenes mal clasificadas e imágenes genuinas. Este comportamiento no invalida necesariamente el método, pues si se trabaja de forma iterativa, es posible descartar en una primera instancia un grupo de imágenes, y luego continuar refinando la estimación. Esto, sin embargo, plantea una cuestión sobre el rendimiento de este método si se eliminan las imágenes mal alineadas que se han detectado en primera instancia como atípicas.

Por ello, repetimos el mismo experimento eliminando del conjunto de datos las imágenes mal alineadas, reproduciendo las distribuciones de pesos obtenidas en la figura 3.16. En este caso, se observa que la separación entre imágenes genuinas e imágenes mal clasificadas en el esquema de pesos globales es también limitada (figura 3.16a). En consecuencia, la reponderación GMM no es capaz de separar por completo ambos grupos de imágenes. Mientras que prácticamente todas las imágenes mal clasificadas reciben pesos casi nulos, también asigna pesos cercanos a cero a una cantidad considerable de imágenes genuinas.

En términos de métricas, estudiamos también el comportamiento de ambos métodos en estas condiciones para diversos niveles de relación señal a ruido. Las métricas de precisión y sensibilidad resumen el comportamiento descrito en el párrafo anterior: el método con reponderación GMM obtiene muy buena precisión, pero una sensibilidad mala para niveles elevados de ruido (figura 3.17). En cambio, en las métricas de *average precision* y *ROC-AUC* sigue presentando una ligera mejora respecto del esquema de pesos globales (figura 3.18). En cuanto a métricas de reconstrucción, el RMSE y la correlación se comportan de maneras distintas: mientras que en RMSE el método con reponderación GMM mantiene un mejor rendimiento para todos los niveles de ruido, sus resultados en cuanto a correlación empeoran rápidamente para niveles de ruido elevados (figura 3.19).

Este análisis sugiere que el método de reponderación GMM podría ser útil para descartar imágenes contaminantes, pero en ciertos casos de una manera excesivamente agresiva, puesto que también puede asignar pesos prácticamente nulos a imágenes genuinas. En cualquier caso, el análisis también pone de manifiesto la necesidad de realizar un estudio más profundo de la sensibilidad del método de reponderación frente a diversas condiciones, prestando especial atención a la estabilidad de sus resultados.

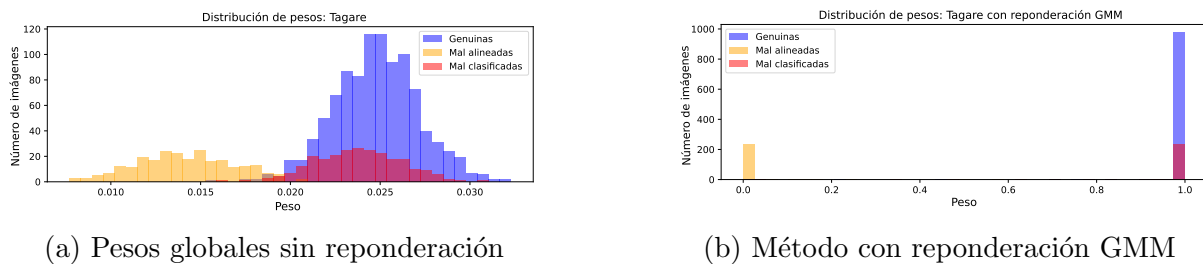
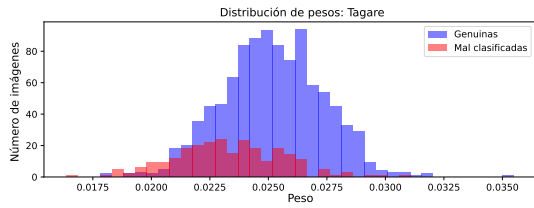
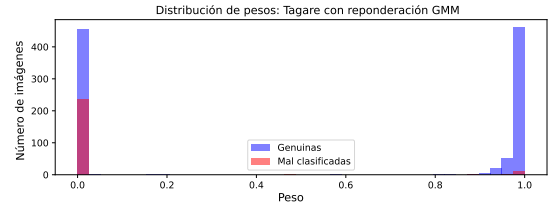


Figura 3.15: Distribuciones de pesos producidos en la última iteración del método de pesos globales de [12] y su reponderación mediante GMM

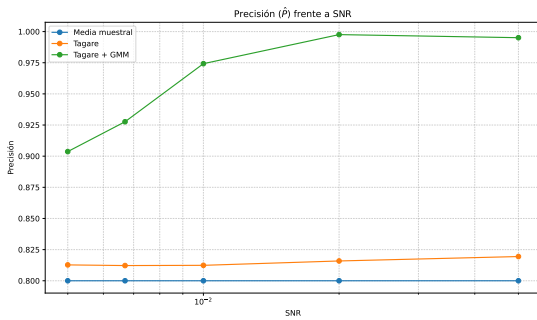


(a) Pesos globales sin reponderación

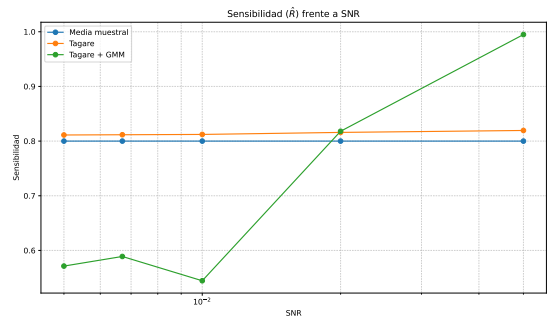


(b) Método con reponderación GMM

Figura 3.16: Distribuciones de pesos producidos en la última iteración del método de pesos globales de [12] y su reponderación mediante GMM; tomando un conjunto de datos que solo contiene imágenes mal clasificadas e imágenes genuinas

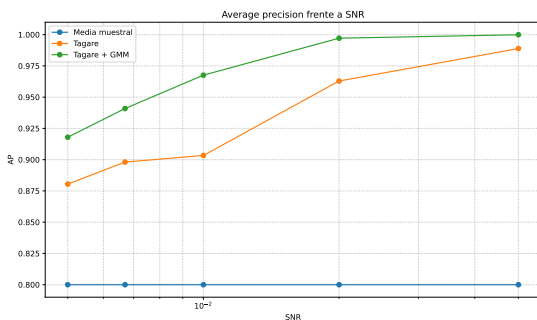


(a) Precisión frente a SNR

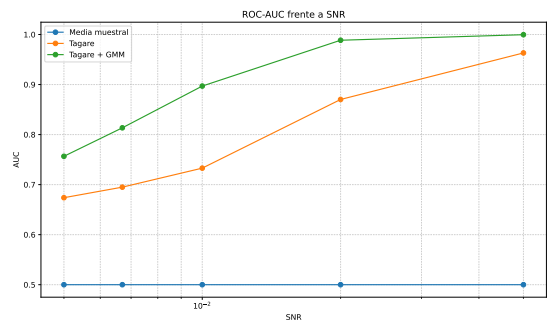


(b) Sensibilidad frente a SNR

Figura 3.17: Métricas de clasificación para el método de pesos globales de [12] y su reponderación mediante GMM: precisión y sensibilidad; tomando un conjunto de datos que solo contiene imágenes mal clasificadas e imágenes genuinas

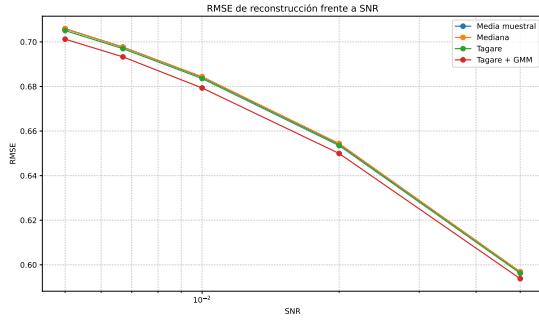


(a) *Average precision* frente a SNR

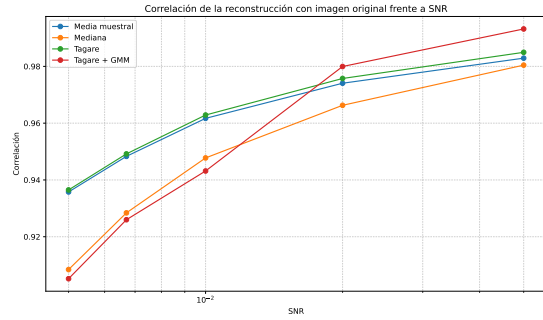


(b) *ROC-AUC* frente a SNR

Figura 3.18: Métricas de clasificación para el método de pesos globales de [12] y su reponderación mediante GMM: *average precision* y *ROC-AUC*; tomando un conjunto de datos que solo contiene imágenes mal clasificadas e imágenes genuinas



(a) RMSE frente a SNR



(b) Correlación frente a SNR

Figura 3.19: Métricas de reconstrucción (RMSE y correlación) para el método de pesos globales de [12] y su reponderación mediante GMM

3.1.5. Comparativa

Se pueden extraer diversas conclusiones de los experimentos anteriores. En primer lugar, entre los estimadores que actúan en el espacio real, tan solo el esquema de pesos globales de [12] parece tener suficiente capacidad discriminativa para separar imágenes genuinas de imágenes contaminantes. Por ello, es el único cuyas estimaciones superan en términos de RMSE y correlación a la media muestral.

En cuanto a los estimadores en el espacio de Fourier, las métricas de clasificación reflejan un comportamiento análogo al del espacio real, siendo los esquemas de pesos por frecuencia poco discriminativos. Sin embargo, en este caso la calidad de sus estimaciones sí resulta superior a la media muestral, y en algunos casos incluso superior a los esquemas de pesos globales. Esto puede ser explicado por la distribución de la señal entre las frecuencias de la transformada de Fourier de las imágenes: generalmente, las bajas y medias frecuencias contienen una señal más intensa. Por un lado, esto significa que los residuos en dichas componentes contienen más información, por lo que es más sencillo que los estimadores puedan asignar pesos discriminativos. Por otro lado, una buena precisión sobre unas pocas de estas frecuencias puede resultar muy relevante para la calidad de las estimaciones obtenidas, de modo que las reconstrucciones pueden mejorar aunque la capacidad discriminativa global de los estimadores sea limitada.

Los esquemas de estimación combinada en el espacio real y de Fourier muestran propiedades interesantes. Estos esquemas podrían mejorar el rendimiento de los estimadores que operan en un solo dominio, pero no en todos los casos (figuras 3.8 y 3.9). Sin embargo, en muchos casos la calidad de las reconstrucciones no es superior a la estimación en un solo dominio (figura 3.10). Esto pone de manifiesto la necesidad de ajustar convenientemente los parámetros y las funciones de peso de estos métodos, por lo que un estudio más detallado podría ser necesario.

Por último, el esquema de reponderación descrito en la sección 2.5 muestra resultados prometedores, consiguiendo mejorar la distribución de los pesos para aumentar la capacidad discriminativa de los estimadores y mejorar sus estimaciones. Las métricas de *average precision* y *ROC-AUC* muestran que los esquemas de pesos globales son un buen candidato para la reponderación, aunque una correcta agregación de los pesos locales también podría conducir a buenos resultados.

3.2. Resultados en datos experimentales

En esta sección, se presentan los resultados de aplicar algunos de los métodos descritos anteriormente sobre un conjunto de imágenes experimentales. El conjunto de datos utilizado es la entrada EMPIAR-10061 del repositorio público EMPIAR, y corresponde a una molécula conocida como β -galactosidasa [23]. Sobre dicho conjunto de imágenes se realizó una clasificación 2D mediante el *software* de procesamiento de imagen cryoSPARC [14]. Se eligió este conjunto de datos porque una de las clases producidas por dicho *software* presentaba un promedio de calidad mejorable, y una aplicación de otra etapa de clasificación 2D considerando tan solo las imágenes de dicha clase revelaba la presencia de distintas estructuras diferentes dentro de ella.

3.2.1. Métricas evaluadas

Puesto que en este caso tratamos con imágenes experimentales, no se dispone de etiquetas con las que evaluar las capacidades de clasificación de cada uno de los métodos de estimación, ni tampoco se dispone de un *ground truth* con el que comparar las estimaciones producidas por cada uno de ellos. En consecuencia, no se podrán evaluar las métricas de clasificación ni de reconstrucción que se analizaron en la [sección 3.1](#). Por lo tanto, la evaluación de los métodos en este caso estará más limitada.

Se han seleccionado algunos de los métodos con mejor rendimiento en los datos sintéticos:

1. El esquema de pesos globales de la [ecuación \(3.5\)](#) [12], aplicado en el espacio real.
2. El esquema de pesos redescendentes ([ecuación \(3.4\)](#)), aplicado por frecuencia en el espacio de Fourier.
3. El estimador combinado que utiliza los pesos globales en el espacio real y pesos redescendentes por frecuencia en Fourier.
4. El esquema de pesos globales con reponderación GMM.

Para cada uno de estos métodos, podemos evaluar cuánto varía la estimación producida respecto del punto de partida, que es la media aritmética de todas las imágenes de la clase. Esto no debe entenderse como una medida de la calidad de las estimaciones, sino tan solo como una manera de determinar qué métodos producen diferencias significativas que merezcan ser estudiadas. Medimos este cambio mediante la raíz del error cuadrático medio entre ambas imágenes. Los resultados se detallan en la [tabla 3.1](#), donde se ve que el método que produce diferencias más significativas con la media original es la reponderación GMM sobre el esquema de pesos globales.

3.2.2. Imágenes obtenidas

Puesto que no se dispone de una referencia *verdadera* con la que comparar, una alternativa para evaluar la calidad de las estimaciones consiste en inspeccionar las imágenes, comparando la media aritmética original con la estimación producida por este método. Dichas imágenes se muestran en la [figura 3.20](#). En la [figura 3.20a](#) se ve la media aritmética de las imágenes de la clase, que muestra una clara estructura subyacente, pero también ciertas zonas de baja resolución. En la [figura 3.20b](#) se expone la estimación producida por

Método	Diferencia con la media
Pesos globales [12] (Esp. real)	0,0108
Pesos redescendentes (Esp. Fourier)	0,0089
Pesos globales + pesos redescendentes	0,0083
Pesos globales con reponderación GMM	0,0309

Tabla 3.1: Métricas de diferencia con la media obtenidas por los distintos métodos evaluados sobre las imágenes experimentales. Puesto que las imágenes fueron estandarizadas a media 0 y desviación típica 1, la métrica obtenida puede interpretarse en unidades relativas de desviación típica.

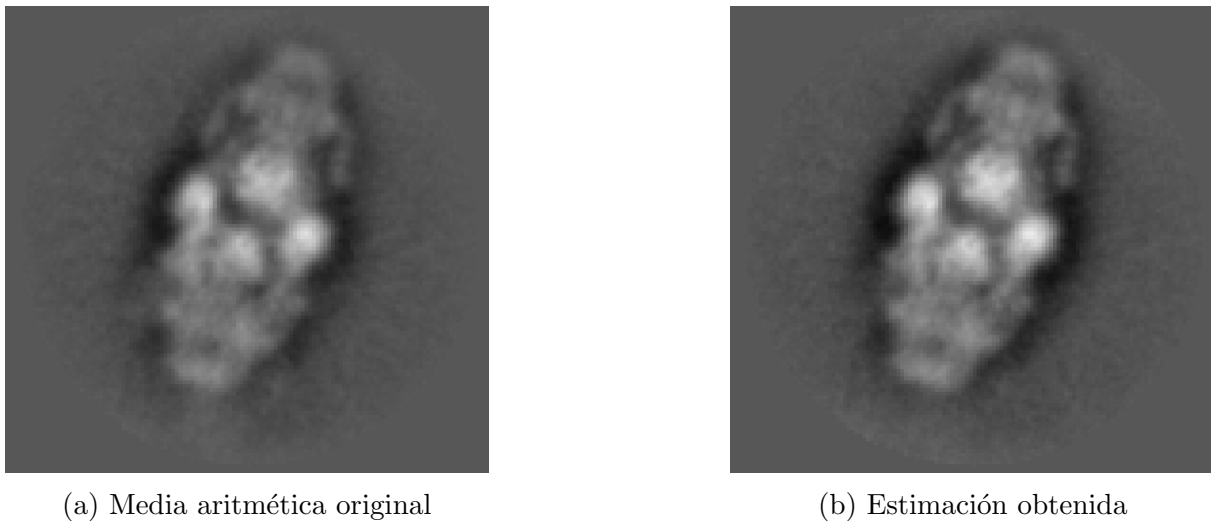
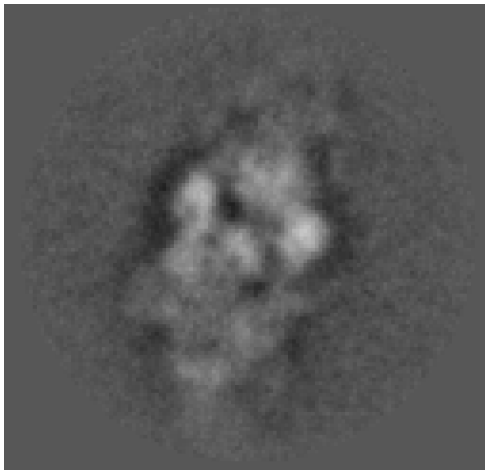


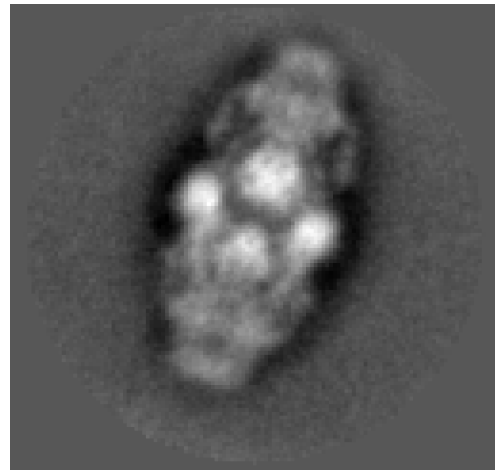
Figura 3.20: Media aritmética y estimación obtenida con el método de pesos globales y reponderación GMM para el dataset experimental utilizado

el método utilizado, que naturalmente muestra la misma estructura, pero con una señal aparentemente más definida.

Adicionalmente, para evaluar si las imágenes que están siendo descartadas por el método son imágenes genuinas, mostramos en la [figura 3.21](#) la media aritmética del 20% de imágenes con un peso asignado más bajo ([figura 3.21a](#)), así como la media aritmética de las imágenes con un peso asignado más alto ([figura 3.21b](#)). En dichas imágenes se observa que las imágenes con un peso asignado más alto contienen una señal fuerte y clara, coherente con la estructura que mostraba la media aritmética original ([figura 3.20a](#)). En cambio, la media de las imágenes con pesos bajos muestra una imagen mucho menos clara. Si bien parece haber una señal subyacente también coherente con el promedio de clase, dicha señal es mucho más débil, y no puede descartarse que esté parcialmente relacionada con efectos de alineamiento frente al ruido, del tipo conocido como *Einstein from noise* [6].



(a) Media aritmética del 20% de imágenes con un peso asignado más bajo



(b) Media aritmética del 20% de imágenes con un peso asignado más alto

Figura 3.21: Medias aritméticas de los conjuntos de imágenes con menor y mayor peso asignado por el esquema de reponderación con GMM

Capítulo 4

Conclusiones

En este trabajo se ha estudiado la aplicación de técnicas de estimación robusta al problema de la obtención de promedios de clase en cryo-EM. Para ello, se han formulado distintos estimadores basados en esquemas IRLS y funciones de pérdida robustas, tanto en el espacio real como en el espacio de Fourier, así como variantes conjuntas que combinan información de ambos dominios.

Los resultados obtenidos muestran que la introducción de mecanismos de ponderación robusta permite reducir la influencia de observaciones atípicas y mejorar la calidad de los promedios de clase en determinados escenarios de contaminación. Sin embargo, también ponen de manifiesto las limitaciones de trasladar directamente las propiedades teóricas de la estadística robusta a los problemas de procesamiento de imagen en cryo-EM.

Una de las observaciones más relevantes del trabajo es que la capacidad de rechazo de observaciones atípicas de muchos estimadores robustos resulta significativamente menor de lo que cabría esperar a partir de sus propiedades teóricas. Incluso en el caso de estimadores redescendentes, capaces de anular completamente la contribución de observaciones con residuos suficientemente grandes, la separación efectiva entre imágenes genuinas e imágenes contaminadas puede ser limitada. Los experimentos sugieren que esta situación está relacionada con la extremadamente baja relación señal a ruido característica de cryo-EM, donde las fluctuaciones debidas al ruido dominan los residuos observados y dificultan la identificación de discrepancias estructurales entre imágenes.

Los resultados obtenidos indican asimismo que la elección del dominio en el que se construye el estimador robusto tiene una influencia significativa sobre su comportamiento. En particular, los métodos basados en el espacio de Fourier muestran características diferentes a las observadas en el espacio real, lo que confirma que ambos dominios contienen información complementaria sobre la calidad de las observaciones. Esta observación justifica el estudio de formulaciones conjuntas que exploten simultáneamente ambas representaciones.

Otra conclusión importante es que los pesos generados por los estimadores robustos contienen información útil sobre la calidad relativa de las imágenes, incluso cuando dicha información no resulta suficiente para realizar una separación clara entre observaciones genuinas y contaminadas. Este hecho motivó la propuesta de una etapa adicional de reponderación basada en modelos de mezcla gaussianos.

La estrategia de reponderación propuesta constituye una de las contribuciones metodológicas de este trabajo. Aunque se trata de un procedimiento heurístico sin garantías teóricas de convergencia, los experimentos muestran que en determinados casos puede aumentar significativamente la capacidad de discriminación de algunos estimadores al ex-

plotar la estructura global de la distribución de pesos. Este resultado sugiere que una parte importante de la información necesaria para distinguir imágenes genuinas de imágenes contaminadas ya está presente en los pesos producidos por los estimadores robustos, pero requiere mecanismos adicionales para ser utilizada de forma efectiva.

En conjunto, los resultados obtenidos muestran que los métodos robustos constituyen una herramienta prometedora para mejorar la calidad de los promedios de clase en cryo-EM. Al mismo tiempo, evidencian que todavía existen desafíos importantes para trasladar plenamente las ideas clásicas de la estadística robusta a este contexto, especialmente en presencia de niveles extremos de ruido y de formas complejas de contaminación.

4.1. Líneas de desarrollo futuro

Los resultados obtenidos abren diversas líneas de investigación que podrían explorarse en trabajos posteriores.

En primer lugar, sería interesante profundizar en los métodos de estimación robusta estudiados y en los mecanismos mediante los que generan pesos para las observaciones. Los resultados sobre datos simulados sugieren que los pesos locales por píxel o por frecuencia contienen información relevante para distinguir imágenes genuinas de imágenes contaminadas, a pesar de que los valores asignados a los pesos no separen suficientemente ambos tipos de imágenes. Sin embargo, la agregación de dicha información en una única puntuación global constituye todavía un problema. El desarrollo de estrategias de agregación más sofisticadas podría permitir explotar mejor la estructura espacial o espectral de los residuos y mejorar la capacidad de discriminación de los estimadores.

En segundo lugar, la estrategia de reponderación basada en modelos de mezcla gaussianos podría extenderse mediante otros esquemas de clasificación o detección de anomalías. El uso de modelos de mezcla más flexibles, técnicas de agrupamiento no supervisado o métodos modernos de detección de anomalías podría proporcionar mecanismos más robustos para la toma de decisiones sobre la calidad de las imágenes.

Asimismo, sería deseable realizar una validación más extensa sobre datos experimentales reales. Aunque los experimentos sintéticos permiten controlar de forma precisa los niveles de ruido y contaminación, los conjuntos de datos reales presentan fuentes adicionales de variabilidad que podrían afectar al comportamiento de los métodos estudiados.

Por último, muchas otras etapas del procesamiento de datos cryo-EM podrían beneficiarse de un enfoque robusto. Si bien la estimación de representantes de clase constituye una etapa importante dentro del flujo de procesamiento, otras fases pueden tener un impacto aún mayor sobre la calidad de la reconstrucción tridimensional final. En particular, los algoritmos de reconstrucción más utilizados, como los propuestos en [17] y [14], se basan en formulaciones de máxima verosimilitud bajo hipótesis de ruido gaussiano. La incorporación de funciones de pérdida robustas o modelos de contaminación explícitos en dichas etapas podría constituir una vía prometedora para aumentar la robustez global de los procedimientos de reconstrucción en cryo-EM.

Bibliografía

- [1] J. Dubochet, M. Adrian, J.-J. Chang et al., «Cryo-Electron Microscopy of Vitrified Specimens,» *Quarterly reviews of biophysics*, vol. 21, págs. 129-228, jun. de 1988. DOI: [10.1017/S0033583500004297](https://doi.org/10.1017/S0033583500004297).
- [2] J. Frank, *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies: Visualization of Biological Molecules in Their Native State*. Oxford University Press, mar. de 2006. DOI: [10.1093/acprof:oso/9780195182187.001.0001](https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195182187.001.0001).
- [3] H. Kohl y L. Reimer, *Transmission Electron Microscopy*. ene. de 2008, vol. 36. DOI: [10.1007/978-0-387-40093-8](https://doi.org/10.1007/978-0-387-40093-8).
- [4] S. H. Scheres, «RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination,» *Journal of Structural Biology*, vol. 180, n.º 3, págs. 519-530, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.09.006>.
- [5] J. Schwab, D. Kimanius, A. Burt, T. Dendooven y S. Scheres, «DynaMight: estimating molecular motions with improved reconstruction from cryo-EM images,» *Nature Methods*, vol. 21, págs. 1855-1862, ago. de 2024. DOI: [10.1038/s41592-024-02377-5](https://doi.org/10.1038/s41592-024-02377-5).
- [6] S. Xu, A. Balanov, A. Singer y T. Bendory, *Bayesian Perspective for Orientation Determination in Cryo-EM with Application to Structural Heterogeneity Analysis*, 2026. arXiv: [2412.03723](https://arxiv.org/abs/2412.03723) [stat.AP].
- [7] J. L. Vilas, J. M. Carazo y C. O. S. Sorzano, «Emerging Themes in CryoEM—Single Particle Analysis Image Processing,» *Chemical Reviews*, vol. 122, págs. 13 915-13 951, 2022.
- [8] F. J. Sigworth, «Principles of cryo-EM single-particle image processing.,» *Microscopy*, vol. 65 1, págs. 57-67, 2016.
- [9] I. Greenberg e Y. Shkolnisky, «Common lines modeling for reference free Ab-initio reconstruction in cryo-EM,» *Journal of Structural Biology*, vol. 200, n.º 2, págs. 106-117, nov. de 2017. DOI: [10.1016/j.jsb.2017.09.007](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2017.09.007).
- [10] C. O. S. Sorzano, A. Jiménez-Moreno, D. Maluenda et al., «On bias, variance, overfitting, gold standard and consensus in single-particle analysis by cryo-electron microscopy,» *Acta Crystallographica Section D*, vol. 78, n.º 4, págs. 410-423, abr. de 2022. DOI: [10.1107/S2059798322001978](https://doi.org/10.1107/S2059798322001978).
- [11] F. Sigworth, P. Doerschuk, J.-M. Carazo y S. Scheres, «An Introduction to Maximum-Likelihood Methods in Cryo-EM,» *Methods in enzymology*, vol. 482, págs. 263-94, dic. de 2010. DOI: [10.1016/S0076-6879\(10\)82011-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)82011-7).
- [12] C. Huang y H. D. Tagare, «Robust w-Estimators for Cryo-EM Class Means,» *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 25, n.º 2, págs. 893-906, 2016. DOI: [10.1109/TIP.2015.2512384](https://doi.org/10.1109/TIP.2015.2512384).

- [13] S. H. Scheres, M. Valle, R. Nuñez et al., «Maximum-likelihood Multi-reference Refinement for Electron Microscopy Images,» *Journal of Molecular Biology*, vol. 348, n.º 1, págs. 139-149, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.031>.
- [14] A. Punjani, J. Rubinstein, D. Fleet y M. Brubaker, «cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination,» *Nature Methods*, vol. 14, feb. de 2017. DOI: [10.1038/nmeth.4169](https://doi.org/10.1038/nmeth.4169).
- [15] F. Hampel, E. Ronchetti, P. Rousseeuw y W. Stahel, *Robust Statistics: The Approach Based on Influence Functions*. mar. de 1986. DOI: [10.1002/9781118186435](https://doi.org/10.1002/9781118186435).
- [16] R. A. Maronna, R. D. Martin y V. J. Yohai, *Robust Statistics: Theory and Methods* (Wiley Series in Probability and Statistics), en, 1.ª ed. Wiley, mar. de 2006. DOI: [10.1002/0470010940](https://doi.org/10.1002/0470010940).
- [17] S. H. Scheres, «A Bayesian View on Cryo-EM Structure Determination,» *Journal of Molecular Biology*, vol. 415, n.º 2, págs. 406-418, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.11.010>.
- [18] D. Xu y N. Ando, «Miffi: Improving the accuracy of CNN-based cryo-EM micrograph filtering with fine-tuning and Fourier space information,» dic. de 2023. DOI: [10.1101/2023.12.08.570849](https://doi.org/10.1101/2023.12.08.570849).
- [19] S. Boyd, N. Parikh, E. Chu, B. Peleato y J. Eckstein, «Distributed Optimization and Statistical Learning via the Alternating Direction Method of Multipliers,» *Foundations and Trends® in Machine Learning*, vol. 3, n.º 1, págs. 1-122, 2011. DOI: [10.1561/22000000016](https://doi.org/10.1561/22000000016).
- [20] A. P. Dempster, N. M. Laird y D. B. Rubin, «Maximum Likelihood from Incomplete Data Via the EM Algorithm,» *Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology*, vol. 39, n.º 1, págs. 1-22, 1977. DOI: [10.1111/j.2517-6161.1977.tb01600.x](https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1977.tb01600.x).
- [21] M. Campbell, D. Veesler, A. Cheng, C. Potter y B. Carragher, *2.8 Å resolution reconstruction of the Thermoplasma acidophilum 20S proteasome using cryo-electron microscopy*, dic. de 2017. DOI: [10.2210/pdb6bdf/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb6bdf/pdb).
- [22] J. de la Rosa-Trevín, A. Quintana, L. del Cano et al., «Scipion: A software framework toward integration, reproducibility and validation in 3D electron microscopy,» *Journal of Structural Biology*, vol. 195, n.º 1, págs. 93-99, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.04.010>.
- [23] A. Bartesaghi, A. Merk, S. Banerjee et al., «2.2 Å resolution cryo-EM structure of beta-galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor,» *Science*, vol. 348, n.º 6239, págs. 1147-1151, 2015. DOI: [10.1126/science.aab1576](https://doi.org/10.1126/science.aab1576).