



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO *IN SILICO* DE LOS LÍMITES TEÓRICOS DE LA ESPECTROSCOPIA DE FLUCTUACIÓN DE LA FLUORESCENCIA NÚMERO Y BRILLO Y SU APLICACIÓN EN DETECTORES sCMOS

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

IBT. ALEJANDRO IRÁN LINARES CASTAÑEDA

TUTOR:

DR. ADÁN OSWALDO GUERRERO CÁRDENAS
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

COTUTORES:

DR. GABRIEL ISAAC CORKIDI BLANCO
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA-CONDE
[Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM](#)

Cuernavaca, Morelos. Marzo de 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CGEP/PMDCB/1719/2021
Asunto: Jurado de examen

Alejandro Irán Linares Castañeda
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 06 de octubre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestría en Ciencias**, con la réplica de la tesis “ **Estudio in silico de los límites teóricos de la espectroscopía de fluctuación de la fluorescencia Número & Brillo y su aplicación en detectores sCMOS**”, dirigida por el Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE: Dr. Luis Alfoso Vaca Domínguez
Vocal : Dr. Agustín Guerrero Hernández
Vocal : Dr. Jorge Peón Peralta
Vocal : Dr. León David Islas Suárez
Secretario : Dr. Arturo Pimentel Cabrera

MIEMBROS DEL JURADO:

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana. Tome en cuenta que usted tiene 20 días hábiles para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias..

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuernavaca, Morelos, a 06 de octubre de 2021
COORDINADORA DEL SUBCOMITÉ CAMPUS MORELOS



Dra. Marcela Ayala Aceves

Contacto: mdcba@posgrado.unam.mx Tel. 55-5623-7006

AGRADECIMIENTOS

A Adán Guerrero, por su constante guía desde mi llegada al laboratorio y por ser un excelente profesor y amigo

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Gabriel Corkidi y el Dr. Ramón González, por su valiosa retroalimentación sobre mi proyecto

A los Dres. Luis Vaca, Agustín Guerrero, Jorge Peón, León Islas y Arturo Pimentel por su labor como miembros del jurado de esta tesis

A Martina Jabłoński, por realizar los experimentos en células vivas usados en este trabajo y su asistencia en otros aspectos técnicos

A mis amigos y familiares, por su apoyo incondicional y presencia en mi vida

A mis padres, cuyo amor y disciplina me han hecho quien soy hoy. ¡Este logro es también de ustedes!

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, No. Becario 900085).

Se agradece al Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM por el apoyo económico otorgado para asistir al congreso internacional de biofísica.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. ESPECTROSCOPÍA DE FLUCTUACIÓN DE LA FLUORESCENCIA	5
1.2. ESPECTROSCOPÍA DE CORRELACIÓN DE IMÁGENES	7
1.2.1. Espectroscopía de Correlación Espacio-Temporal de Imágenes	7
1.2.2. Análisis de Número y Brillo: abundancia y estado estequiométrico	7
2. ANTECEDENTES	10
2.1. CÁMARAS DIGITALES EN LA MICROSCOPÍA ÓPTICA	10
2.2. ALGORITMOS DE CORRECCIÓN DE RUIDO EN IMÁGENES sCMOS	12
2.2.1. Algoritmo de corrección de ruido sCMOS basado en la función de transferencia óptica	13
2.2.2 Algoritmo de corrección automática de ruido sCMOS basado en filtrado escaso por capas	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS	15
5.1 OBJETIVO GENERAL	15
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
6. MATERIALES Y EQUIPO	16
6.1 REACTIVOS	16
6.2 MICROSCOPÍA	16
6.3 SOFTWARE	16
7. METODOLOGÍA	17
7.1 ESTIMACIÓN DE LAS PROPIEDADES ELECTRÓNICAS DE LOS DETECTORES	17
7.1.1 Detector EMCCD Andor iXon Ultra 897	17
7.1.2 Detector sCMOS ORCA-Flash 4.0 v2	18
7.2 SIMULACIONES	20
7.2.1 Difusión de partículas en un sistema ideal	20
7.2.2 Simulación de imágenes limitadas por difracción	22
7.2.3 Simulación de imágenes EMCCD	25
7.2.4 Simulación de imágenes sCMOS	26
7.2.5 Evaluación de los algoritmos de simulación y análisis de Número y Brillo	27

7.3 EXPERIMENTO EN CÉLULAS VIVAS	28
7.4 PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES sCMOS MEDIANTE ACsN	28
8. RESULTADOS	29
8.1 EXPLORACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN TEÓRICOS DEL ANÁLISIS DE NÚMERO Y BRILLO	29
8.1.1 La cantidad de imágenes, su tamaño y tasa de adquisición introducen sesgos en la cuantificación de la abundancia y el estado de oligomerización de partículas en solución mediante el análisis N&B	29
8.1.2 La abundancia y estequiometría de las partículas poseen límites de detección	34
8.1.2.1 La velocidad de las partículas gobierna la estadística de los experimentos	34
8.1.2.2 Es necesaria una cantidad mínima de partículas por píxel para cuantificar correctamente su abundancia	36
8.1.3 La pérdida de resolución deteriora el análisis de Número y Brillo	37
8.1.3.1 La varianza de la señal se subestima cuando la resolución espacial disminuye	39
8.1.4 El ruido de fondo EMCCD introduce sesgos al análisis cuando las partículas son escasas	40
8.1.4.1 El contraste entre la señal y el fondo no afecta el análisis	42
8.1.5 La distribución espacial del ruido sCMOS introduce sesgos al análisis	44
8.1.5.1 La variación local del ruido sCMOS introduce sesgos al análisis a nivel de píxel	46
8.2 LA MITIGACIÓN DE RUIDO MEJORA EL ANÁLISIS A NIVEL DE PÍXEL DE NÚMERO Y BRILLO EN IMÁGENES sCMOS	48
8.2.1 La corrección de ruido elimina la variación local y preserva la información de las fluctuaciones asociada a la dinámica molecular en las simulaciones	48
8.2.2 Evaluación del desempeño de ACsN en imágenes de un experimento in vitro	51
8.2.2.1 ACsN incrementa el contraste y SNR de las imágenes	51
8.2.2.2 La corrección de ruido aumenta la resolución del Brillo y permite hacer análisis espacio-temporal	53
9. DISCUSIÓN	56
10. CONCLUSIONES	61
11. PERSPECTIVAS	61
ANEXOS	62
A. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA	62
a. Movimiento Browniano	62
b. Fundamentos del Número y Brillo en sistemas digitales de adquisición de imágenes	64
c. Modelo de las propiedades electrónicas de una cámara EMCCD	66
d. Modelo de las propiedades electrónicas de una cámara sCMOS	71
e. La Función de Punto Extendido de un sistema limitado por difracción	72

B.	INTERACCIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES Y SU EFECTO SOBRE EL NÚMERO Y BRILLO	75
a.	Cantidad total de imágenes	75
b.	Tasa de adquisición	77
c.	Tamaño de las imágenes	78
C.	ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL NÚMERO Y BRILLO EN FUNCIÓN DE LA REGIÓN DEL SENSOR sCMOS	80
a.	Estudio cualitativo	80
b.	Estudio cuantitativo	82
D.	CÓDIGOS DE R	84
a.	Simulación de movimiento Browniano	84
b.	Simulación de la PSF	86
c.	Simulación de ruido EMCCD	87
d.	Simulación de ruido sCMOS	88
e.	Aproximación para estimar el offset, varianza y ganancia de una cámara sCMOS	89
f.	Análisis de Número & Brillo	90
E.	ESTIMACIÓN DE LOS MAPAS DE CALIBRACIÓN DEL DETECTOR sCMOS ORCA FLASH 4.0 v2	92
F.	PUBLICACIONES	94
a.	FCslib: an open-source tool for fluorescence fluctuation spectroscopy analysis for mobility, number and molecular brightness in R (https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa876)	94
b.	Nanosopic resolution within a single imaging frame (en revisión) (pre-print en bioRxiv, doi: https://doi.org/10.1101/2021.10.17.464398)	95
G.	PARTICIPACIÓN EN CURSOS, SIMPOSIOS Y CONGRESOS	96
a.	Taller de molécula única: Aplicaciones en el estudio de Proteínas - Red de Estructura, Función y Evolución de Proteínas (REFEP), IBT, UNAM	96
b.	Curso de Microscopía Básica - Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, IBT, UNAM.	96
c.	Curso teórico-práctico sobre Aprendizaje Profundo Aplicado al Análisis de Imágenes de Microscopía Óptica - Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, IBT, UNAM.	97
d.	XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería 2019, León, Guanajuato – Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería	97
e.	V Simposio de Verano - IBT, UNAM	98
f.	65th Biophysical Society Annual Meeting – The Biophysical Society	99
g.	3rd Annual Workshop in Advanced Microscopy and Biophotonics – Institut Pasteur de Montevideo	101
	Referencias	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general del funcionamiento de FFS.	5
Figura 2. Algunas aplicaciones fundamentales de la FFS.	6
Figura 3. El método de Número y Brillo discrimina entre distintas especies oligoméricas con base en la varianza de las fluctuaciones de la fluorescencia.	9
Figura 4. Sincronía entre el observador y la velocidad de un proceso dinámico.	10
Figura 5. Diferencias en el mecanismo de funcionamiento entre las cámaras CCD y CMOS.	12
Figura 6. Esquema general del funcionamiento de NCS.	13
Figura 7. Esquema general del funcionamiento de ACsN.	14
Figura 8. Esquema general de la obtención de datos a partir de simulaciones de Número y Brillo.	22
Figura 9. Esquema del efecto de los parámetros del sistema óptico sobre el tamaño del píxel de la imagen y la distribución de la intensidad de la señal.	23
Figura 10. Rango de valores de apertura numérica y magnificación en objetivos convencionales, según el medio de inmersión y el tipo de corrección de aberración óptica.	24
Figura 11. Esquema general de la obtención de datos a partir de simulaciones de N&B en un sistema limitado por difracción.	25
Figura 12. Esquema general de la obtención de datos a partir de simulaciones de Número y Brillo en un sistema contaminado con ruido digital de un detector EMCCD.	25
Figura 13. Esquema general de la obtención de datos a partir de simulaciones de Número y Brillo en un sistema contaminado con ruido digital de un detector sCMOS.	26
Figura 14. Algoritmo de análisis de N&B.	27
Figura 15. Efecto del tamaño de la imagen, el número total de imágenes y la tasa de adquisición sobre el Número y el Brillo.	31
Figura 16. Evaluación del efecto del coeficiente de difusión sobre el Número y el Brillo.	35
Figura 17. Evaluación del efecto de la abundancia de partículas y su estado estequiométrico sobre el Número y el Brillo.	36
Figura 18. Evaluación del efecto de la longitud de onda, tamaño de píxel y apertura numérica sobre el Número y el Brillo.	38
Figura 19. Efecto de la disminución de la resolución sobre la varianza de la señal.	39
Figura 20. Evaluación del efecto de la presencia de ruido digital de un detector EMCCD sobre la cuantificación del Número y el Brillo.	41
Figura 21. Evaluación del efecto de distintos valores de relación señal-ruido (de EMCCD) sobre la cuantificación del Número y el Brillo.	43
Figura 22. Efecto de la región de ruido de fondo sCMOS sobre la cuantificación del Número y el Brillo.	45
Figura 23. Efecto de la presencia de <i>hotspots</i> sobre la cuantificación del Número y el Brillo.	47

Figura 24. Efecto de ACsN sobre la cuantificación del Brillo.	50
Figura 25. Efecto del procesamiento con ACsN en datos experimentales.	52
Figura 26. Análisis cualitativo de la evolución espacio-temporal del Brillo en una porción del flagelo, previo y posterior al procesamiento de las imágenes con ACsN.	53
Figura 27. Análisis de la evolución temporal del perfil de la intensidad de fluorescencia y el Brillo a través de flagelo, previo y posterior al procesamiento con ACsN.	55
Figura A1. Esquema general del proceso de adquisición y conversión de señal en una cámara EMCCD y las distintas fuentes de ruido a lo largo del proceso.	67
Figura A2. La relación matemática entre la Función de Pupila, la Función de Dispersión de Amplitud, la Función de Transferencia Óptica y la Función de Dispersión de Punto de un sistema óptico.	73
Figura A3. La resolución de un microscopio óptico está determinada, en gran parte, por la longitud de onda de registro de la señal y la apertura numérica de las lentes del objetivo.	74
Figura A4. Evaluación del efecto del número total de imágenes sobre el Número.	75
Figura A5. Evaluación del efecto del número total de imágenes sobre el Brillo.	76
Figura A6. Evaluación de la tasa de adquisición sobre el Número y el Brillo.	77
Figura A7. Evaluación del efecto del tamaño de la imagen sobre el Número.	78
Figura A8. Evaluación del efecto del tamaño de la imagen sobre el Brillo.	79
Figura A9. Análisis cualitativo del efecto de la distribución espacial de los parámetros electrónicos del sensor sCMOS sobre la cuantificación del Número y el Brillo.	81
Figura A10. Análisis comparativo de las distribuciones del Número esperado y observado a partir de simulaciones multiparamétricas con ruido CMOS.	82
Figura A11. Análisis comparativo de las distribuciones del Brillo esperado y observado a partir de simulaciones multiparamétricas con ruido CMOS.	83
Figura A12. Mapa y distribución del Offset de una subregión de 684 x 428 píxeles del detector sCMOS ORCA Flash 4.0 v2 del LNMA.	92
Figura A13. Mapa y distribución de la Varianza de una subregión de 684 x 428 píxeles del detector sCMOS ORCA Flash 4.0 v2 del LNMA.	93
Figura A14. Mapa y distribución de la Ganancia de una subregión de 684 x 428 píxeles del detector sCMOS ORCA Flash 4.0 v2 del LNMA.	93

ABREVIATURAS

ACsN	Automatic Correction of sCMOS-related Noise
ADU	Analog/Digital Conversion Unit
CLSM	Confocal Laser-Scanning Microscopy
cps	Cuadros por segundo
D	Coeficiente de difusión
EMCCD	Electron-Multiplied Charge-Coupled Device
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FDP	Función de densidad de probabilidad
FFS	Fluorescence Fluctuation Spectroscopy
ICS	Image Correlation Spectroscopy
iMSD	Image Mean Squared Displacement
LNMA	Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada
M	Masa molecular
N&B	Número y Brillo
NA	Numerical Aperture
NCS	Noise Correction for sCMOS
nm	Nanómetros (distancia)
nM	Nanomolar (concentración)
OTF	Optical Transfer Function
PMT	Photomultiplier Tube
PSF	Point-Spread Function
sCMOS	Scientific-grade Complementary Metal-Oxide Semiconductor
SNR	Signal-to-Noise Ratio
STICS	Spatio-Temporal Image Correlation Spectroscopy
TICS	Temporal Image Correlation Spectroscopy
TYH	Toyoda-Yokoyama-Hoshi (medio para fertilización <i>in vitro</i>)
$\mu\text{m}^2/\text{s}$	Micrómetros cuadrados por segundo
2D-pCF	Two-dimensional Pair Correlation Function

RESUMEN

La espectroscopía de fluctuación de la fluorescencia (FFS) es una herramienta para el estudio de la dinámica de partículas fluorescentes, centrada en el análisis estadístico de las fluctuaciones temporales de la fluorescencia. Las cámaras CMOS son dispositivos capaces de alcanzar tasas de decenas de miles de cuadros por segundo, útiles para estudiar procesos en el orden de los microsegundos. La arquitectura CMOS introduce heterogeneidad en el ruido de cada píxel del sensor. Recientemente se han propuesto métodos para la corrección de imágenes CMOS. En este trabajo se evaluó, mediante simulaciones y en un experimento *in vitro*, el efecto del procesamiento con el algoritmo de corrección ACsN de imágenes CMOS sobre el análisis de Número y Brillo (N&B, perteneciente a FFS) y se evaluó su compatibilidad con el uso de estos detectores. Con base en la variación de parámetros asociados a factores experimentales, se analizó el efecto que estos podrían tener sobre el comportamiento de N&B para la cuantificación de abundancia y estequiometría moleculares. Se aplicó el algoritmo ACsN a imágenes de un experimento *in vitro*; los resultados obtenidos sugieren que este procedimiento podría incrementar la precisión del análisis de N&B en datos experimentales. Sin embargo, en el futuro debe comprobarse esta hipótesis de forma cuantitativa para demostrar la aplicabilidad de estos algoritmos en otros sistemas experimentales con cámaras CMOS.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ESPECTROSCOPÍA DE FLUCTUACIÓN DE LA FLUORESCENCIA

La difusión es uno de los mecanismos mediante los cuales ocurre el transporte molecular, y define la escala temporal de la mayoría de los procesos bioquímicos (Milo & Phillips, 2015). Robert Brown contribuyó a mejorar nuestro conocimiento sobre el movimiento molecular. Se le atribuye el concepto de '*movimiento browniano*' debido a sus aportes al entendimiento del comportamiento molecular (Brown, 1828). Brown acuñó el concepto de difusión, que está asociado al conjunto de desplazamientos que una partícula, o una población de partículas, siguen al moverse. Dicho movimiento es impulsado por la energía del sistema y es influenciado por las colisiones entre las moléculas, las propiedades fisicoquímicas del medio donde se encuentran y la interacción entre ambos procesos ([Anexo A-a](#)).

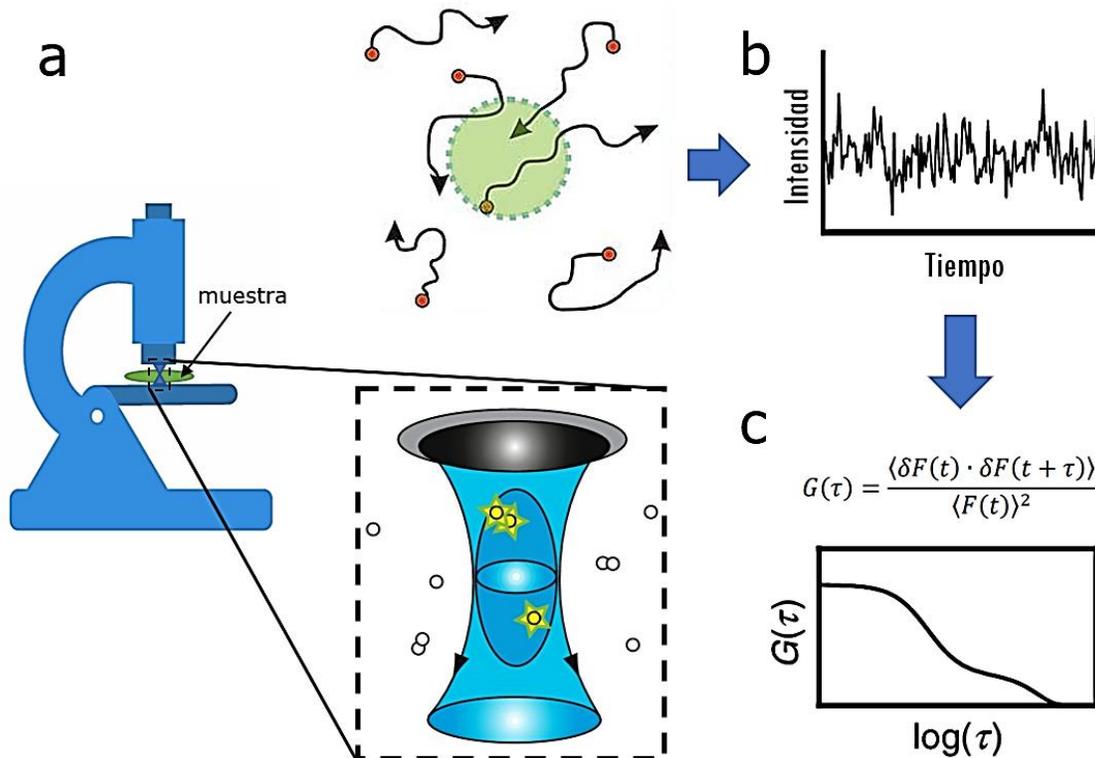


Figura 1. Esquema general del funcionamiento de FFS.

En la microscopía de escaneo confocal, cuando una población de fluoróforos difunde a través del láser de excitación, estos emiten una ráfaga de fotones (a). La entrada y salida de los fluoróforos a través de este espacio genera fluctuaciones en la fluorescencia (b). El análisis estadístico de estas fluctuaciones permite extraer información acerca de la movilidad de las moléculas, su abundancia, estequiometría y otras propiedades fisicoquímicas (c).

La espectroscopía de fluctuación de la fluorescencia (FFS) (Magde *et al*, 1972), comprende una colección de técnicas de análisis para el estudio de la dinámica de moléculas fluorescentes y a baja concentración (figura 2) (Lakowicz, 2006; Digman *et al*, 2008; Digman & Gratton, 2009; Digman & Gratton, 2011; Migueles-Ramirez *et al*, 2017). FFS se basa en el análisis estadístico de las fluctuaciones de la señal de fluorescencia a través del tiempo (figura 1). Estas fluctuaciones son el resultado, en su mayoría, del tráfico molecular en la muestra, dado por la entrada y salida de los fluoróforos a través del volumen de observación e influenciados por procesos termodinámicos y/o biológicos (Digman *et al*, 2005).

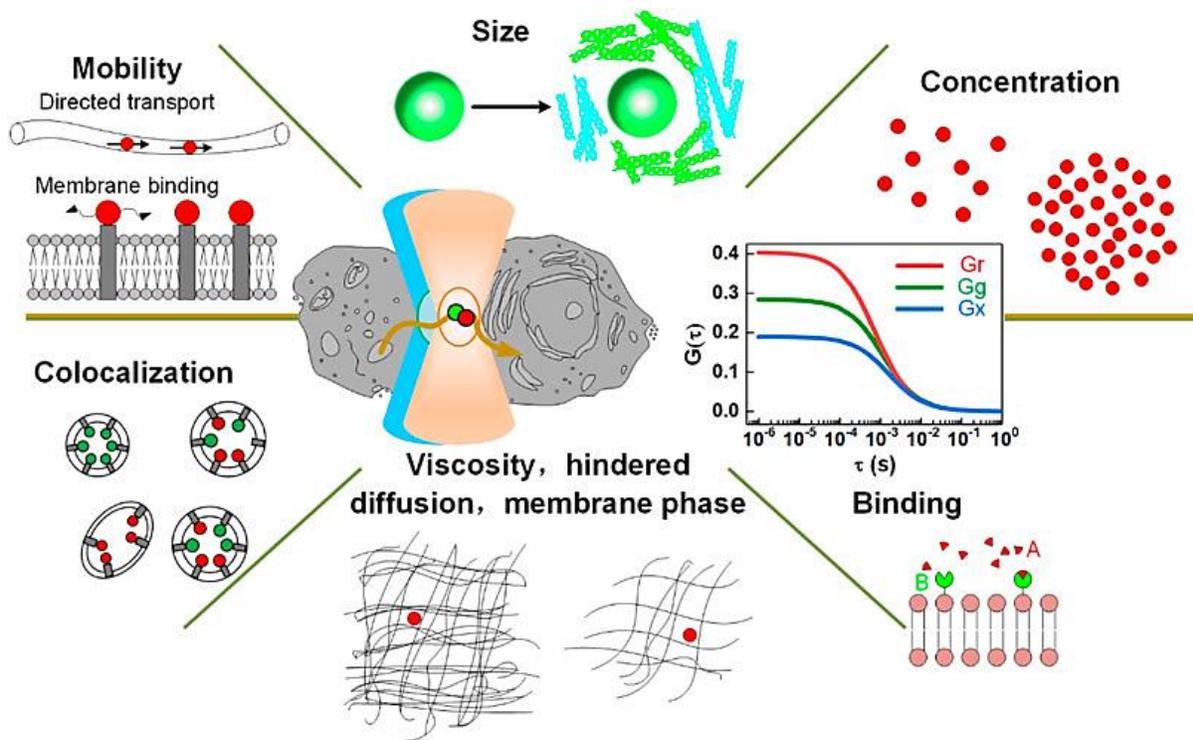


Figura 2. Algunas aplicaciones fundamentales de la FFS.

De manera general, se asume que las fluctuaciones de la fluorescencia son causadas en su mayoría por el tráfico molecular a través del volumen de observación (centro). Fenómenos tales como interacción molecular, difusión anómala o dirigida, transporte y agrupamiento moleculares, abundancia, entre otros, también contribuyen a la variación de la fluorescencia. FFS puede, mediante el procesamiento matemático y estadístico de estas fluctuaciones, obtener información acerca de las moléculas y los procesos bioquímicos que determinan su naturaleza. Adaptado de Yu *et al*, 2021.

1.2. ESPECTROSCOPÍA DE CORRELACIÓN DE IMÁGENES

La espectroscopía de correlación de la fluorescencia (FCS, en inglés) es una subrama de FFS y se basa en el muestreo de la señal de fluorescencia en una región puntual de la muestra. Convencionalmente se ha utilizado la microscopía de escaneo confocal, donde un láser es desplazado rápidamente a través de la muestra mientras se recolecta información de la señal de fluorescencia (Paddock, 1999). La espectroscopía de correlación de imágenes (ICS, en inglés), propuesta por primera vez por Petersen y col. en 1993, es una variante de FCS que escala el análisis de un volumen de observación puntual al estudio de imágenes completas, siguiendo el mismo principio. ICS consiste en el análisis de la correlación espacial de las fluctuaciones de la fluorescencia en un área de observación definida (Hebert *et al*, 2005).

1.2.1. Espectroscopía de Correlación Espacio-Temporal de Imágenes

Existen diversas aplicaciones derivadas del análisis matemático y estadístico de la fluorescencia (figura 2). La información que cada uno de estos métodos proporciona está determinada por la configuración experimental y la manera en que la información es obtenida. ICS es capaz de determinar el grado de agregación de moléculas fluorescentes en una región, pero no proporciona información de su movimiento debido a que sólo analiza las fluctuaciones espaciales en una imagen. La espectroscopía de correlación temporal de imágenes (TICS, en inglés), puede medir difusión y velocidad de flujo molecular a partir de una serie de imágenes, sin embargo, sólo puede medir la magnitud, más no la dirección del flujo (Kolin & Wiseman, 2007). La temporalidad de los procesos que se observan en STICS (ICS espacio-temporal, en inglés) depende de la velocidad de adquisición disponible al capturar imágenes a través del tiempo (típicamente con el uso de cámaras especializadas). STICS fue desarrollada con el fin de calcular la correlación entre imágenes completas separadas temporalmente, abriendo la posibilidad de estudiar el flujo molecular en regiones amplias de la muestra en vez de sitios puntuales (Hebert *et al*, 2005).

1.2.2. Análisis de Número y Brillo: abundancia y estado estequiométrico

El método de Número y Brillo (N&B), perteneciente a FFS, es una herramienta para discernir entre distintas especies oligoméricas difundiendo en el mismo medio. Además, es posible usar N&B para conocer la concentración relativa de los fluoróforos en la muestra (Digman *et al*, 2008). Propuesto originalmente por Qian y Elson en 1990, N&B fue desarrollado con el fin caracterizar la distribución de agregados moleculares de distintos tamaños en sistemas en equilibrio (Qian & Elson, 1990). N&B se basa en el análisis de los momentos estadísticos de las fluctuaciones de la fluorescencia. El resultado son mapas de estado de oligomerización (Brillo) y concentración molecular (Número) (figura 3).

Si se considera k_i como la cantidad de fotones detectados en cada píxel i del sensor durante un intervalo de tiempo dt , registrados como la intensidad de ese píxel, la esperanza de la señal (valor medio) para cada píxel está dado por:

$$\langle k \rangle = \frac{\sum_i k_i}{K} \quad [1]$$

donde K es el número total de imágenes analizadas. El valor medio de la señal de fluorescencia aumenta proporcionalmente al número de partículas en el medio cuando este es homogéneo. Por otro lado, la amplitud de las fluctuaciones alrededor del valor medio está determinada por el grado estequiométrico de las partículas que causan dichas fluctuaciones. La varianza de la señal de fluorescencia en cada píxel está definida por:

$$\sigma_i^2 = \frac{\sum_i (k_i - \langle k \rangle)^2}{K} \quad [2]$$

La concentración de partículas en el medio es proporcional al promedio de la señal (ecuación 3). El tamaño de las partículas (o estado de agregación) es proporcional a la varianza (ecuación 4) (figura 3). El Número (N) y Brillo (B) aparentes se definen de la siguiente manera:

$$N = \frac{\langle k \rangle^2}{\sigma^2} \quad B = \frac{\sigma^2}{\langle k \rangle} \quad [3, 4]$$

Las ecuaciones 3 y 4 describen la abundancia y estado estequiométrico de entidades moleculares, respectivamente. En un sistema digital de adquisición de imágenes, es necesario caracterizar la función de respuesta del detector, es decir, el comportamiento del ruido y amplificación de la señal en función de la cantidad de fotones que inciden en el sensor. El ruido fluctúa de manera no aleatoria; es necesario eliminar las contribuciones de este del análisis de N&B para obtener mediciones más precisas. La teoría detrás de esta calibración se detalla en el [Anexo A-b](#).

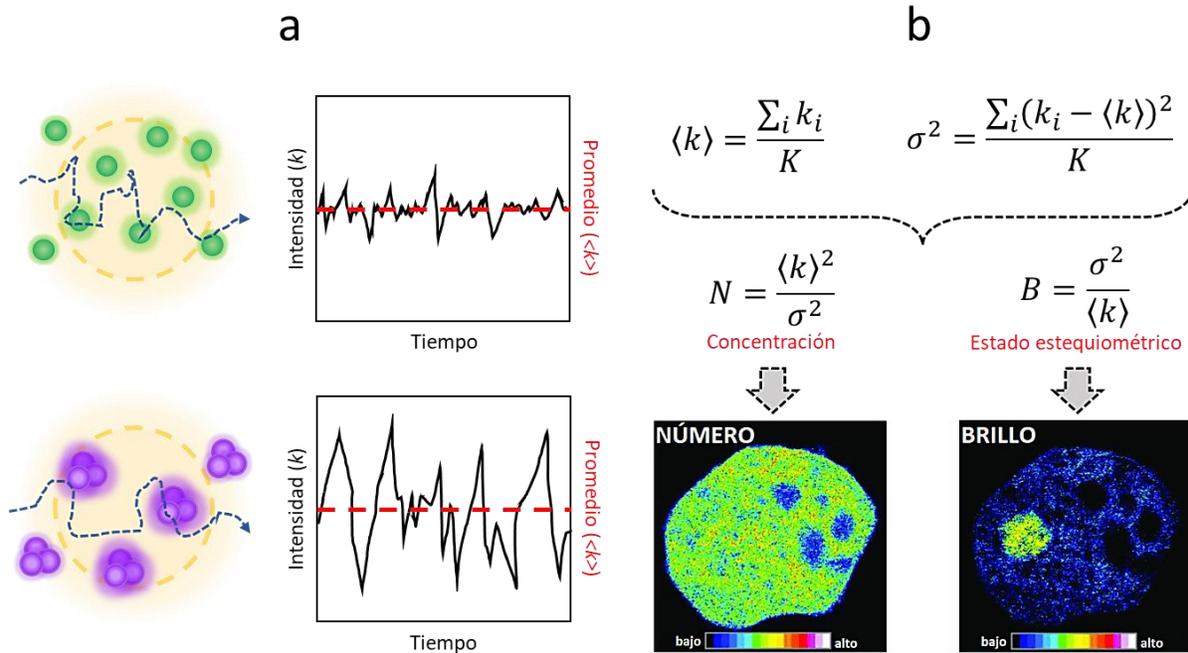


Figura 3. El método de Número y Brillo discrimina entre distintas especies oligoméricas con base en la varianza de las fluctuaciones de la fluorescencia.

Supóngase un escenario donde se tienen monómeros y trímeros de una proteína fluorescente difundiendo en el mismo medio (**a**). Si se tienen dos series de fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia (k) con un mismo promedio, entre más grande sea la varianza, menor será el número de moléculas (o fluoróforos) que contribuyan al promedio. El estado de oligomerización de las moléculas (B) es directamente proporcional a la varianza, mientras que la concentración (N) es inversamente proporcional a esta (**b**). N&B proporciona dos mapas: abundancia (N) y estado de agregación molecular (B), con una resolución espacial dada por el tamaño de píxel. En este método, el tiempo de correlación entre las fluctuaciones no juega un papel crucial en el análisis, pero proporciona un medio para excluir las fluctuaciones causadas por el ruido de lectura (Qian & Elson, 1990). Mapas de Número y Brillo del panel (**b**) adaptados de Kitamura & Kinjo, 2018.

2. ANTECEDENTES

2.1. CÁMARAS DIGITALES EN LA MICROSCOPIA ÓPTICA

Para describir procesos dinámicos, es necesario contar con herramientas capaces de aproximarse lo suficiente a las escalas espacio-temporales a las que dichos procesos ocurren (figura 4). Adicionalmente, se necesita de dispositivos con buen desempeño en escenarios con poca disponibilidad de luz, que permitan disminuir los efectos de fototoxicidad y fotoblanqueo.

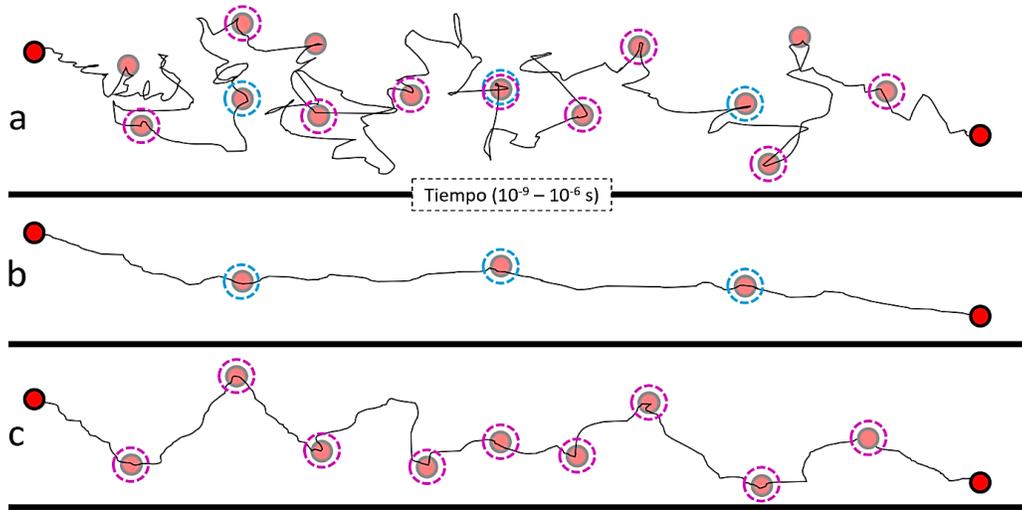


Figura 4. Sincronía entre el observador y la velocidad de un proceso dinámico.

Cuando la velocidad a la que el observador es capaz de percibir un determinado proceso no es lo suficientemente rápida, se pierde información que lleva a una interpretación distinta a la realidad. Supóngase que se desea cuantificar el movimiento de una partícula difundiéndose libremente (a). Si la velocidad del muestreo de la posición de la partícula es más lenta que la partícula misma, se podría llegar a la conclusión de que su trayectoria describe una línea casi recta y que la velocidad a la que se mueve es más lenta de lo que realmente es (b). Por otro lado, conforme la velocidad del observador se acerca a la temporalidad del fenómeno, es posible obtener más detalles acerca de éste y aproximarse a escenarios similares a la realidad (c). Los círculos punteados azules indican una percepción del movimiento relativamente más lenta que los círculos punteados rosados.

Durante muchos años, el 'estándar de oro' para imagenología fueron los Dispositivos de Carga Acoplada Electro-Multiplicativos (EMCCD, por sus siglas en inglés) debido a su buen desempeño en experimentos con pocos fotones (menos de 25 por píxel por intervalo de registro), como la microscopía de fluorescencia (Robbins & Hadwen, 2003; von Diezmann *et al*, 2017; Coates *et al*, 2004). Esta tecnología ha demostrado ofrecer resultados confiables y consistentes en diversas aplicaciones de imagenología cualitativa y cuantitativa.

Las cámaras EMCCD se han usado, entre otras aplicaciones, para la cuantificación de concentración y estado de oligomerización de proteínas marcadas fluorescentemente (Chen et al, 2002; Unruh & Gratton, 2008; Ross *et al*, 2011). Sin embargo, la velocidad de captura de estas cámaras, de decenas de cuadros por segundo, está limitada por su mecanismo de procesamiento de la señal. Existen alternativas para resolver dicha limitante, tales como la microscopía confocal de escaneo láser (CLSM, en inglés), cuyo mecanismo de operación permite recolectar rápidamente la señal de fluorescencia de la muestra (Davidovits & Egger, 1969). La adquisición de datos mediante CLSM está limitada a un escaneo secuencial punto a punto de la muestra, lo que ocasiona un desfase temporal entre cada porción de las imágenes generadas y vuelve esta estrategia una opción poco viable si se desean correlacionar campos de visión completos a través del tiempo. Debido a las limitaciones temporales de la tecnología utilizada convencionalmente para FFS, su uso se ha mantenido al margen del estudio de fenómenos relativamente lentos (desde segundos hasta horas), mientras que otros autores han tenido que recurrir a técnicas de análisis más robustas, tales como *iMSD* y *2D-pCF* (Di Rienzo *et al*, 2013; Malacrida *et al*, 2018).

Las cámaras de Semiconductor Complementario de Óxido Metálico de grado científico (sCMOS, en inglés) han ganado popularidad en la última década; son una opción atractiva en la comunidad científica por poseer diversas ventajas que las distinguen de las EMCCD; entre ellas, una velocidad de captura superior que va de la mano con campos de visión más amplios (Coates, 2011). Esta velocidad de captura elevada de las sCMOS se debe a que el procesamiento de la señal ocurre de manera local y separada en cada píxel de la cámara, lo que elimina el cuello de botella temporal que caracteriza a las EMCCD al momento de transferir la señal desde los fotodiodos hasta el dispositivo (figura 5).

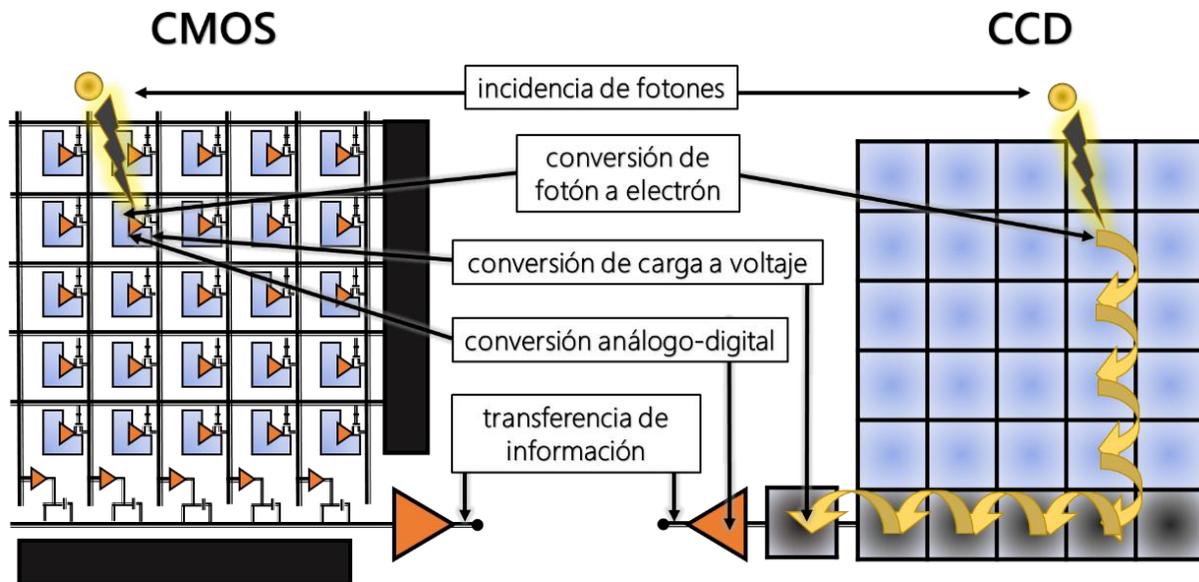


Figura 5. Diferencias en el mecanismo de funcionamiento entre las cámaras CCD y CMOS.

Cuando la luz (fotones) incide en los fotodiodos del chip de la cámara, esta es convertida en una señal eléctrica, que a su vez es traducida en una diferencia de potencial (voltaje). El voltaje atraviesa un módulo de amplificación y posteriormente se convierte en una señal análoga que finalmente se digitaliza en la información que da lugar a la imagen. En el caso de las sCMOS, este proceso ocurre de forma simultánea en cada píxel del sensor mientras que, en las EMCCD, la información de cada píxel es recopilada y procesada de manera secuencial. Adaptado de Litwiller, 2005.

El funcionamiento de FFS se basa en el análisis estadístico de la información de cada píxel de la imagen. Debido a la arquitectura de las sCMOS, el ruido de lectura es heterogéneo, lo que puede introducir sesgos al realizar un análisis cuantitativo a nivel de píxel único. Hasta la fecha, hacer experimentos de FFS (u otros métodos de microscopía cuantitativa) en imágenes obtenidas con cámaras sCMOS aún representa un reto.

2.2. ALGORITMOS DE CORRECCIÓN DE RUIDO EN IMÁGENES sCMOS

Si bien las cámaras sCMOS superan a las EMCCD en aspectos como velocidad de captura, sensibilidad y el tamaño del campo de visión, el ruido en la imagen es heterogéneo, lo que aun impide su total aplicación en el campo de la microscopía cuantitativa. El *offset*, *ganancia* y *varianza* de la señal del detector pueden ser utilizados para corregir las imágenes en aplicaciones de imagenología cuantitativa con el fin de evitar la generación de artefactos y sesgos en los análisis (Huang *et al*, 2013).

2.2.1. Algoritmo de corrección de ruido sCMOS basado en la función de transferencia óptica

Recientemente, Liu y colaboradores desarrollaron un algoritmo de corrección de ruido en imágenes sCMOS llamado NCS (*Noise Correction for sCMOS*) (figura 6). NCS estima la contribución independiente de cada una de dos variables a nivel de píxel unitario: el ruido de lectura y la señal de los fotoelectrones, con distribuciones estadísticas Gaussiana y de Poisson, respectivamente ([Anexo A-d](#)). Cada imagen se corrige con los mapas de calibración del sensor (*offset*, *varianza* y *ganancia*), los cuales pueden ser obtenidos según los métodos descritos por Huang y col. en 2013 (ver [Sección 7.1.2](#), [Anexo D-e](#) y [Anexo E](#)). NCS modela la información presente en la imagen mediante un proceso iterativo que minimiza una función de costo, que incluye a las contribuciones del ruido y de los fotoelectrones. La imagen corregida es el resultado de la minimización de las contribuciones del ruido en todos los píxeles de la imagen.

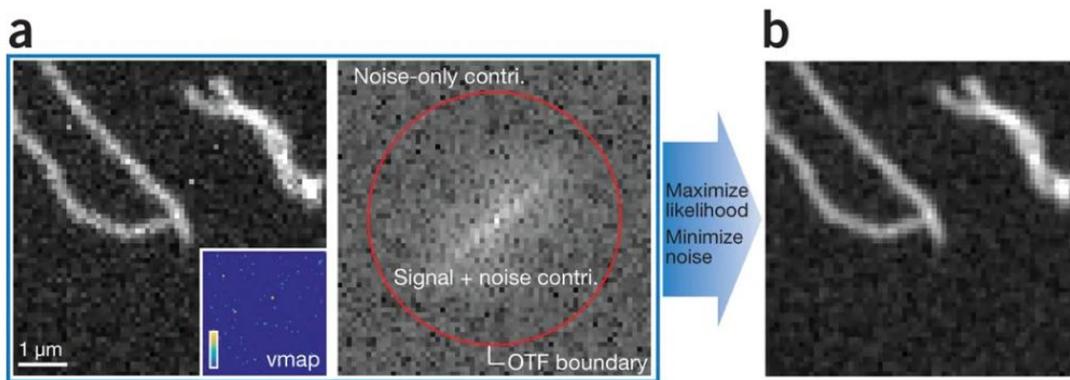


Figura 6. Esquema general del funcionamiento de NCS.

En este ejemplo, NSC corrige el ruido en una imagen sintética de microtúbulos con propiedades características de un sensor sCMOS. Los componentes de esta imagen en el espacio de Fourier son filtrados utilizando máscaras de frecuencias, con base en la Función de Transferencia Óptica (OTF). La OTF depende de la apertura numérica del microscopio y la longitud de onda de detección, y delimita el rango de frecuencias espaciales a las que es sensible el sistema óptico ([Anexo A-e](#), [figura A2](#)), por lo que frecuencias fuera de este límite corresponden, en teoría, al ruido (**a**). Imagen sCMOS corregida (**b**). Tomado de Liu *et al*, 2017.

2.2.2 Algoritmo de corrección automática de ruido sCMOS basado en filtrado escaso por capas

En 2020, Mandracchia y col. propusieron un algoritmo adaptativo para la corrección automática de ruido sCMOS (*Automatic Correction of sCMOS-related Noise, ACsN*, en inglés) para microscopía de fluorescencia (figura 7). ACsN aprovecha el conocimiento previo sobre las propiedades del detector ([Anexo A-d](#) y [Anexo E](#)) y el filtrado escaso por capas (*sparse filtering*, en inglés) (Ngiam *et al*, 2011) para mitigar el efecto de las fuentes más relevantes de ruido en un dispositivo sCMOS. De manera similar a NCS, ACsN estima la OTF del sistema óptico para establecer un filtro de frecuencias, discriminando entre aquellas asociadas al ruido y las asociadas a la señal. ACsN se basa en un modelo teórico que realiza una estimación conjunta de la varianza asociada al ruido y a la información, a través del análisis de frecuencias. Posteriormente, mediante el filtrado escaso por capas se evalúa la semejanza de las imágenes consigo mismas en el tiempo y el espacio, incrementando la precisión de la corrección y preservando la información cuantitativa del experimento.

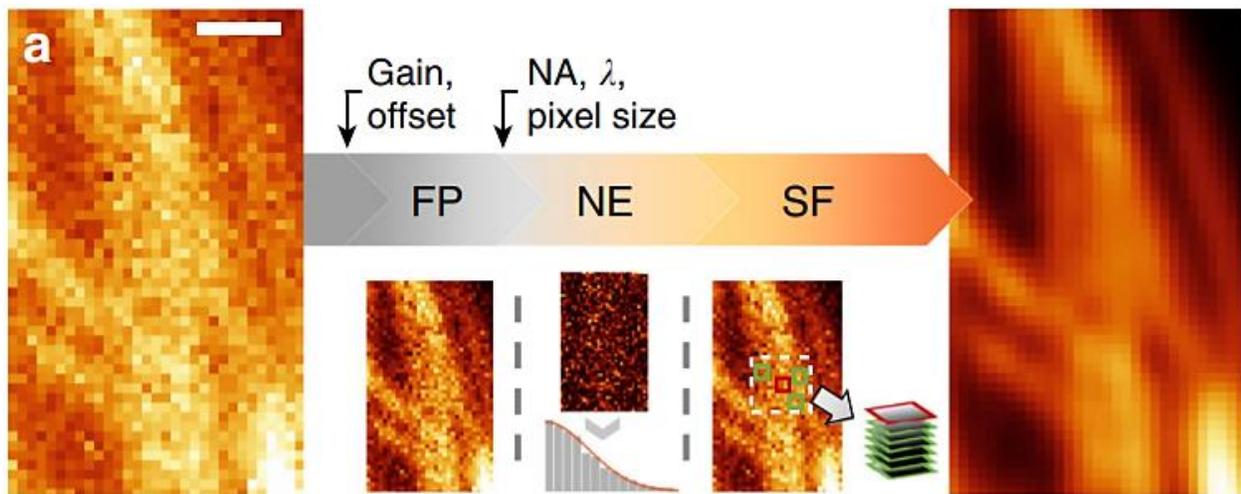


Figura 7. Esquema general del funcionamiento de ACsN.

(a) Los mapas del *offset* y ganancia del detector son utilizados para un preprocesamiento de la imagen con el fin de remover el ruido asociado a patrones fijos del chip. Después, con base en los parámetros ópticos (apertura numérica, longitud de onda y tamaño de píxel) se estima la función de transferencia óptica (OTF) del sistema ([Anexo A-e](#), [figura A2](#)), con la finalidad de filtrar las frecuencias asociadas al ruido y separarlas de la señal de interés. Finalmente, se emplea un filtrado escaso por capas para generar la imagen corregida. Barra de escala: 500 nm. Tomado de Mandracchia *et al*, 2020.

3. JUSTIFICACIÓN

Las cámaras sCMOS son una alternativa atractiva a las cámaras EMCCD, principalmente por su capacidad de capturar imágenes a una velocidad superior. La manera en que la información es procesada en las cámaras sCMOS permite alcanzar dichas tasas de adquisición, sin embargo, introduce heterogeneidad en el ruido de la imagen, que resulta relevante en el contexto de técnicas de análisis cuantitativas asociadas a FFS. Al respecto, se han implementado estrategias experimentales para cuantificar y corregir este efecto inducido por los detectores sCMOS ([Sección 2.2](#)).

4. HIPÓTESIS

La variación asociada a parámetros experimentales, tales como las propiedades de las partículas, del sistema óptico y el ruido digital, introducen sesgos en el análisis de Número y Brillo que afectan la cuantificación de abundancia y estequiometría moleculares en simulaciones computacionales.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar, mediante simulaciones de partículas en difusión libre bidimensional, el efecto de la variación asociada a diversos factores experimentales sobre el comportamiento de la técnica de Número & Brillo.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar e implementar modelos de movimiento Browniano, objetos limitados por difracción y de ruido digital EMCCD/sCMOS para simular partículas móviles en solución observadas a través de un sistema óptico.
- Explorar el espacio de parámetros experimentales donde las simulaciones de partículas en difusión libre son lo suficientemente sensibles para estudios cuantitativos de N&B.
- Evaluar el efecto del algoritmo ACsN en simulaciones de partículas en difusión libre sobre el análisis de N&B.

6. MATERIALES Y EQUIPO

6.1 REACTIVOS

- Medio no capacitante (*NC*, modificación del medio para fertilización in vitro TYH):
 - NaCl 119.3 mM.
 - KCl 4.7 mM.
 - CaCl₂•2H₂O 1.71 mM.
 - KH₂PO₄ 1.2 mM.
 - MgSO₄•7H₂O 1.2 mM.
 - Piruvato de Sodio 0.51 mM.
 - Glucosa 5.56 mM.
 - HEPES 20 mM.
 - Gentamicina 10 µg/ml.
- Medio capacitante (*CAP*), igual que *NC* adicionado con:
 - NaHCO₃ 15 mM.
 - BSA 5 mg/ml.
- SiR-actin 100nM (Spirochrome – No.Cat. SC001) (Lukinavičius *et al*, 2014).
- Progesterona 100 µM.

6.2 MICROSCOPIA

- Microscopio invertido Nanoimager, ONI (Oxford University).
 - Láser de excitación de 640 nm (SiR-actin).
 - Detector sCMOS ORCA-Flash 4.0 v2 (Hamatsu).
 - Objetivo de inmersión en aceite, NA 1.49 de magnificación 100X.
 - Cubreobjetos recubiertos con concavalina-A.
 - Aceite de inmersión, $n = 1.515$

6.3 SOFTWARE

- **R** v4.0.2. Entorno y lenguaje de programación para análisis estadístico y generación de gráficos (<https://r-project.org>)(Ihaka & Gentleman, 1996).
- **RStudio** v1.4.110. Suite de interfaz de usuario gráfica para R (<https://rstudio.com>)(Allaire, 2012).
- **Fiji (ImageJ)** v1.53c. Visualización y análisis de imágenes (<http://fiji.sc>)(Abràmoff *et al*, 2004).
- **Matlab** vR2020b. Plataforma de programación basado en matrices orientado a las matemáticas computacionales (<https://mathworks.com>).
- **ACsN**. Algoritmo de corrección automática de ruido sCMOS, desarrollado para Matlab por Mandracchia y col. en 2020 (<https://github.com/ShuJiaLab/ACsN>)(Mandracchia *et al*, 2020).

7. METODOLOGÍA

7.1 ESTIMACIÓN DE LAS PROPIEDADES ELECTRÓNICAS DE LOS DETECTORES

Para este trabajo, se simularon numéricamente imágenes de partículas en difusión libre. Para incluir las contribuciones a la señal asociadas al ruido intrínseco de los detectores, se utilizaron datos preliminares de sus propiedades electrónicas, que fueron obtenidos siguiendo de forma aproximada la metodología propuesta por (Huang *et al*, 2013) y (Hirsch *et al*, 2018). No se siguió un procedimiento formal para realizar la caracterización del ruido de los detectores; se colocó una muestra fluorescente arbitraria y se manipularon los parámetros asociados al láser y su potencia en la interfaz gráfica del software. Aunque este procedimiento carece de la debida reproducibilidad, la intención central fue tener un conjunto de datos preliminares que pudiesen utilizarse en las siguientes etapas de este trabajo. En el futuro, deben realizarse estos procedimientos de manera formal para asegurar la correcta descripción y la reproducibilidad de la metodología utilizada en la caracterización del ruido de los sensores. A continuación, se reportan los pasos seguidos para la obtención de los datos preliminares de las cámaras EMCCD y sCMOS utilizadas.

7.1.1 Detector EMCCD Andor iXon Ultra 897

Para simular el ruido de una cámara EMCCD (Andor, Oxford Instruments) utilizando el modelo descrito en el [Anexo A-c](#), se utilizó la metodología propuesta por (Hirsch *et al*, 2018) como una aproximación para estimar los siguientes parámetros electrónicos del detector:

Offset (o) – se recolectó una serie de 10,000 imágenes oscuras, es decir, sin exposición del chip de la cámara a ninguna fuente de luz y, posteriormente, se obtuvo el promedio de todos los píxeles para cada una de las imágenes adquiridas.

Factor de proporcionalidad análogo digital (f) – se aplicó la prueba de varianza-promedio (Mullikin *et al*, 1994) a series de 10,000 imágenes adquiridas con la cámara EMCCD expuesta a diferentes niveles de iluminación, al excitar una muestra fluorescente arbitraria. Para asegurarse de que la probabilidad de detección de los fotones estuviera gobernada por estadística de Poisson, se configuró la ganancia al mínimo posible. El factor de proporcionalidad análogo digital está dado por:

$$\hat{\mathbf{f}} = \bar{n}_{ic} / \sigma_{n_{ic}}^2 \quad [5]$$

Donde \bar{n}_{ic} es la cantidad de conteos promedio y $\sigma_{n_{ic}}^2$ es la varianza. Al graficar la relación entre el cambio en la varianza en función de la cantidad de fotones promedio, para cada una de las series de

imágenes adquiridas con distintos niveles de iluminación, \mathbf{f} se calculó como la inversa del gradiente de mínimos cuadrados al ajustar una línea recta.

Ganancia electrónica (\mathbf{g}) – La varianza de los electrones que salen del módulo multiplicación electrónica está dada por $\sigma_{n_{oe}}^2 = 2\mathbf{g}^2\lambda$, donde λ es un parámetro de la distribución de Poisson. Una vez calculado el factor de proporcionalidad análogo digital, se estimó la ganancia de multiplicación electrónica siguiendo la ecuación

$$\hat{\mathbf{g}} = \mathbf{f} \frac{\sigma_{n_{ic}}^2}{2n_{ic}} \quad [6]$$

y utilizando las mismas imágenes adquiridas para la calibración de \mathbf{f} .

Tasa de emisión de corriente oscura y ruido de lectura (\mathbf{c} & \mathbf{r}) – Al igual que el offset, los parámetros \mathbf{c} & \mathbf{r} fueron calculados mediante una serie de 10,000 imágenes oscuras. La distribución de probabilidad de una imagen oscura con parámetros $\Theta = (\mathbf{c}, \mathbf{g}, \mathbf{r}, \mathbf{f})$ está dada por:

$$p(n_{ic}; \Theta) = ((P(\mathbf{c}) \cdot G(\mathbf{g})) * N(\mathbf{r}))(\mathbf{f}n_{ic}) \quad [7]$$

Se generó el histograma de niveles digitales de gris a partir de la serie de imágenes oscuras, y se estimó el ruido de lectura y la tasa de emisión de carga oscura mediante el máximo de probabilidad logarítmica:

$$l(\Theta) = \sum_{j=1}^N f_j \log(p(n_{ic|j}, \Theta)) \quad [8]$$

Se utilizaron los parámetros \mathbf{g} & \mathbf{f} , calculados a partir de las series de imágenes con distintos niveles de iluminación para calcular los parámetros restantes. Para estimar \mathbf{c} & \mathbf{r} se resuelve:

$$(\hat{\mathbf{c}}, \hat{\mathbf{r}}) = \operatorname{argmax} l(\mathbf{c}, \mathbf{g} = \hat{\mathbf{g}}, \mathbf{r}, \mathbf{f} = \hat{\mathbf{f}}) \quad [9]$$

Eficiencia cuántica (\mathbf{f}) – Este parámetro se tomó directamente de las especificaciones del fabricante.

7.1.2 Detector sCMOS ORCA-Flash 4.0 v2

Para simular el ruido de una cámara sCMOS (C11440-22CU, Hamamatsu) utilizando el modelo descrito en el [Anexo A-d](#), se utilizó la metodología propuesta por (Huang *et al*, 2013) como una aproximación para estimar los parámetros electrónicos del detector. Se utilizó un microscopio Nanoimager-S (Oxford Nanoimaging) equipado con un objetivo de magnificación 100X, 1.49 NA de inmersión en aceite (Olympus). La muestra fue excitada mediante iluminación LED a una longitud de onda de 405 nm utilizando un espejo dicróico de excitación 405/473/561/635. La fluorescencia fue recolectada con el filtro de emisión 1 525/50 y utilizando un espejo dicróico separador de canales 561/LP. La tasa de

adquisición fue de 30 imágenes por segundo, con un tamaño de pixel efectivo en el plano de la muestra de 117 nm.

Para el cálculo del *offset* y la varianza, se recolectó una serie de 60,000 imágenes oscuras, es decir, sin exposición del chip de la cámara a ninguna fuente de luz. El *offset* es un valor constante de niveles digitales de gris inherente al procesamiento de la señal, cuyo propósito es evitar valores negativos en la imagen ocasionados por el ruido de lectura (dado que este último es descrito por una distribución Gaussiana con media igual a cero). El *offset* o_i del píxel i se obtuvo al calcular el promedio temporal de su valor S_i^m para cada imagen m a lo largo de M imágenes totales (60,000 en este caso):

$$o_i = \frac{1}{M} \sum_{m=1}^M S_i^m \quad [10]$$

De manera similar, la varianza σ_i^2 del píxel i se obtuvo al calcular

$$\sigma_i^2 = \frac{1}{M} \sum_{m=1}^M (S_i^m)^2 - o_i^2 \quad [11]$$

La ganancia, responsable de la amplificación de la señal, puede variar significativamente para cada píxel i del chip de una cámara sCMOS. Para determinar este valor, se iluminó el detector al excitar con un láser de 405 nm el contenido de un marcatextos amarillo común, exprimido en un tubo de ensayo con agua destilada. Utilizando el software del microscopio, la potencia del láser fue modulada para generar distintos niveles de iluminación con el fin de obtener un estimado de la respuesta del detector en función de la señal detectada. No se llevó a cabo una caracterización de la potencia del láser utilizada para cada condición ni de la muestra fluorescente, por lo que la reproducibilidad de este análisis es parcial y solamente tiene como objetivo ilustrar un ejercicio preliminar para obtener datos relacionados a las propiedades del detector. En total, se capturaron siete series de 10,000 imágenes cada una, a una tasa de 30 imágenes por segundo. Dado que la distribución de Poisson puede aproximarse mediante una Gaussiana cuando se cuenta con un número de fotones (intensidad de iluminación) por píxel suficiente (modulable a través de la intensidad del láser de excitación y/o el tiempo de exposición) (Cheng, 1949), la varianza en el píxel i de la imagen con una intensidad de iluminación específica es igual a la suma de la varianza inducida por el ruido de Poisson y el ruido Gaussiano específico de cada píxel, σ_i^2 . La ganancia para el píxel i puede ser calculada, entonces, mediante

$$\hat{g}_i = \operatorname{argmin} \sum_{k=1}^K \left((v_i^k - \sigma_i^2) - g_i (\overline{D}_i^k - o_i) \right)^2 \quad [12]$$

donde K es la cantidad de niveles de iluminación empleados para la caracterización, k es la k^{th} serie temporal, \overline{D}_i^k y v_i^k son las unidades de conversión análogo-digital (ADU) media obtenida del promediado temporal de todas las imágenes y la varianza temporal de las ADU's, respectivamente para la secuencia k en el píxel i . La ecuación A43 puede resolverse mediante mínimos cuadrados y su matriz equivalente puede escribirse como

$$\hat{g}_i = \operatorname{argmin} \|A_i^T - B_i^T g_i\|^2 \quad [13]$$

donde

$$A_i = \{(v_i^1 - \sigma_i^2), \dots, (v_i^k - \sigma_i^2), \dots, (v_i^K - \sigma_i^2)\} \quad [14]$$

$$B_i = \{(\overline{D}_i^1 - \sigma_i^2), \dots, (\overline{D}_i^k - \sigma_i^2), \dots, (\overline{D}_i^K - \sigma_i^2)\} \quad [15]$$

y $k = \{1, 2, \dots, K\}$. Finalmente, utilizando de la función pseudo-inversa de Moore-Penrose, la ganancia se estimó mediante

$$\hat{g}_i = (B_i B_i^T)^{-1} B_i^T A_i \quad [16]$$

La ganancia posee unidades de ADU/e⁻. Los mapas del *offset*, varianza y ganancia resultantes de este análisis, realizado por Adán Guerrero y Damián Martínez, están disponibles en el [Anexo E](#). El código escrito en R utilizado se encuentra disponible en el [Anexo D-e](#).

7.2 SIMULACIONES

7.2.1 Difusión de partículas en un sistema ideal

Con base en la teoría detrás del movimiento Browniano ([Anexo A-a](#)), se escribió en R un código para la simulación de caminatas aleatorias de múltiples partículas difundiéndose en dos dimensiones. Las variables controladas durante las simulaciones fueron: número de partículas, coeficiente de difusión, cuentas por segundo por molécula (fotones), tasa de adquisición de las imágenes simuladas, tamaño de las imágenes y la cantidad total de estas (código disponible en el [Anexo D-a](#)). Se evaluó el efecto de estas variables sobre la cuantificación de la concentración (N) y estado estequiométrico (B) al compararlo con los valores simulados, mediante el análisis de Número y Brillo. Las cotas inferiores y superiores de cada uno de los parámetros manipulados fueron establecidas con base en los respectivos contextos biológicos/moleculares e instrumentales, es decir, lo más cercano posible a escenarios experimentales reales.

Para simular partículas de distinto grado estequiométrico, se ajustó la masa molecular y coeficiente de difusión con base en la relación cúbica (Valencia & González, 2011):

$$\frac{D_n}{D_1} = \sqrt[3]{\frac{M_1}{M_n}} \quad [5]$$

donde D es el coeficiente de difusión, M es la masa molecular y el subíndice n denota el grado estequiométrico.

Para simplificar el análisis de los resultados, se ajustó la concentración de partículas, su masa molecular y su coeficiente de difusión de tal manera que los valores para el N y B esperados fueran 1 para cualquier caso. Esto quiere decir que, para el caso del Número, se espera en promedio una partícula en cada píxel de la imagen. De manera similar, para el caso del Brillo, las partículas simuladas son monómeros. Sin embargo, se incluyen también experimentos donde los valores de N y B exceden la unidad, con el fin de evaluar la sensibilidad del análisis ante distintas concentraciones y/o estados estequiométricos en simulaciones.

Cada recuadro de los mapas de calor (*heatmaps*) mostrados en la sección de [Resultados](#) corresponde a la evaluación de un conjunto de valores de los parámetros específicos. La escala de color refleja qué tan alejada está la medición del valor teórico (figura 8).

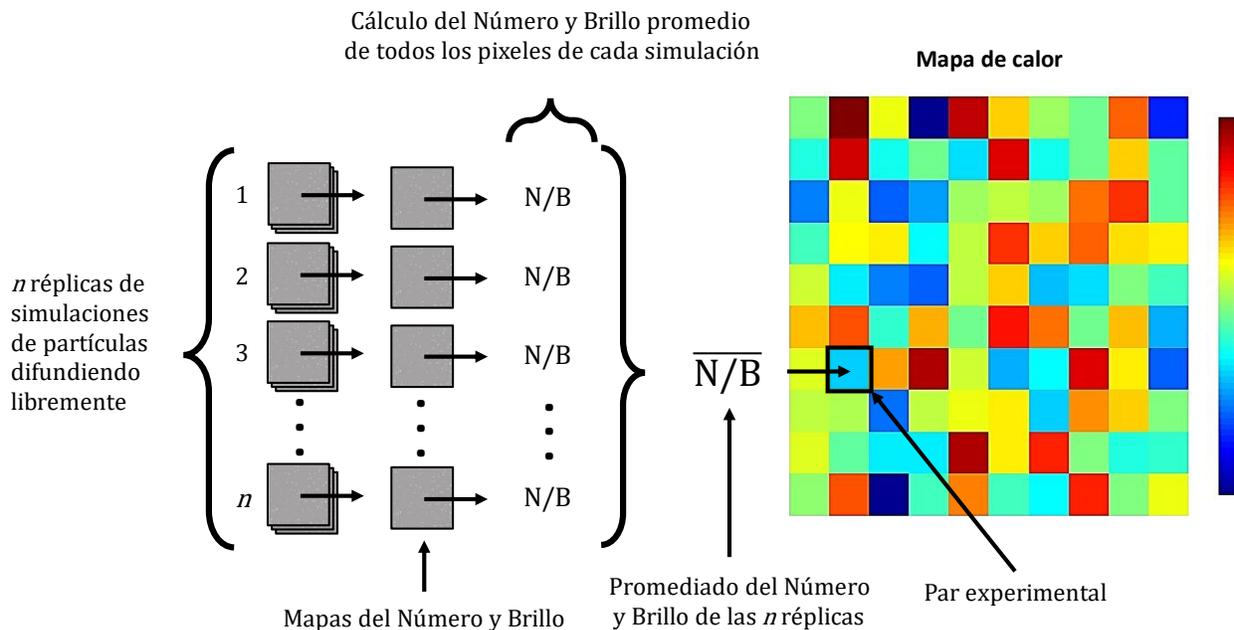


Figura 8. Esquema general de la obtención de datos a partir de simulaciones de Número y Brillo.

Primero se realizan n réplicas de una simulación de moléculas en difusión libre bidimensional, con parámetros experimentales específicos. Para cada réplica, se calcula el mapa del Número y del Brillo de todo el experimento. Posteriormente, se obtiene el promedio de todos los píxeles (no se simulan píxeles correspondientes a “fondo”). Finalmente, se promedia el valor obtenido de todas las réplicas y este es plasmado en cada recuadro del mapa de calor (*heatmap*).

7.2.2 Simulación de imágenes limitadas por difracción

En la microscopía óptica, el tamaño de un fluoróforo o un emisor de luz puntual en la imagen final varía en función de la resolución disponible dada una configuración óptica específica. Cuando la luz atraviesa el objetivo del microscopio, la información asociada al paso de fotones por la lente se convoluciona con la Función de Punto Extendido (PSF, por sus siglas en inglés). La geometría de la PSF y, por ende, la resolución del sistema óptico, dependen de la apertura numérica del objetivo y de la longitud de onda de emisión de los fluoróforos ([Anexo A-d](#)).

Con base en (Liu *et al*, 2017), se escribió un código en R para generar una representación de la PSF en el plano de una imagen (disponible en el [Anexo D-b](#)), la cual se convolucionó con las imágenes de las trayectorias de las partículas (figura 11). Esto con el propósito de generar imágenes de partículas fluorescentes en movimiento observadas a través de un microscopio. Las variables ópticas manipuladas fueron: la apertura numérica y magnificación de la lente del objetivo, la longitud de onda de la luz y el tamaño del píxel de las imágenes simuladas (figura 9).

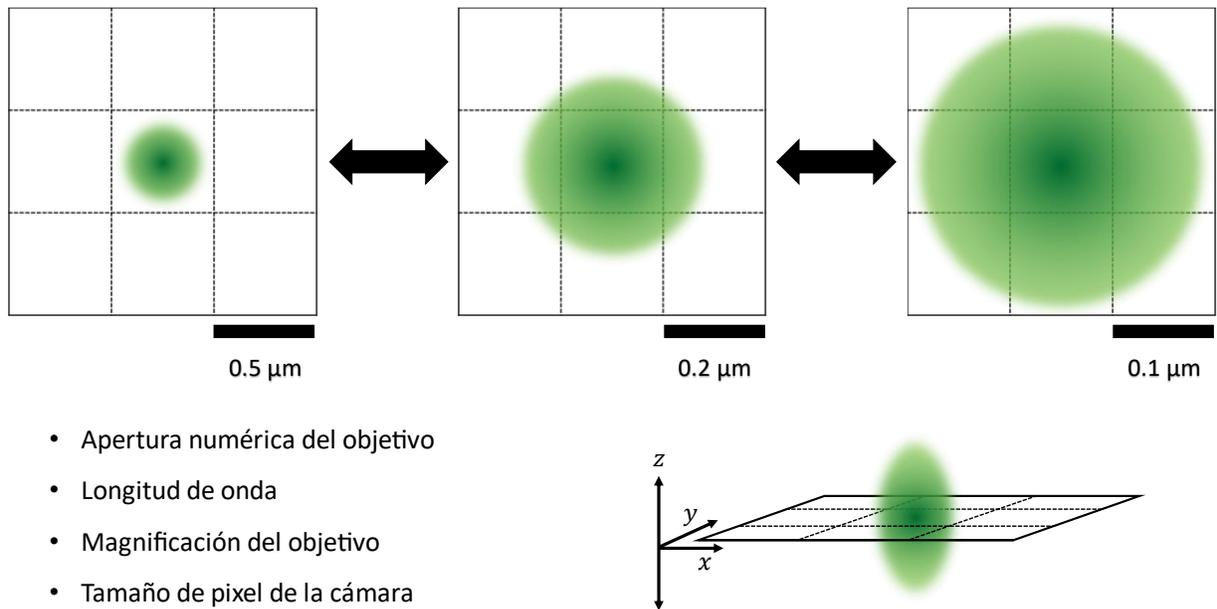


Figura 9. Esquema del efecto de los parámetros del sistema óptico sobre el tamaño del píxel de la imagen y la distribución de la intensidad de la señal.

Las propiedades ópticas del objetivo del microscopio, así como la longitud de onda de emisión del fluoróforo (i.e. la luz emitida por la muestra) determinan el tamaño y la geometría de la PSF (esquematizado como un óvalo verde difuso) y su proyección en una imagen bidimensional. Adicionalmente, la magnificación del objetivo y el tamaño de píxel del detector determinan el tamaño físico del píxel en la imagen y su resolución final.

Las cotas inferiores y superiores de los parámetros ópticos modelados fueron establecidas con base en las características de los objetivos utilizados convencionalmente (figura 10). Se evaluaron longitudes de onda desde 400 hasta 700 nm, apertura numérica desde 0.9 hasta 1.5. Se modelaron escenarios considerando el uso de lentes objetivos con magnificaciones de 40X a 100X. Adicionalmente, se simularon escenarios de colección de imágenes con EMCCD o sCMOS ([Secciones 8.1.4](#) y [8.1.5](#), respectivamente), considerando la dimensión física de los pozos de colección de fotones característicos de cada arquitectura (6.5 micras para sCMOS o 12-16 micras para EMCCD).

Al observar una muestra a través del microscopio óptico, lo que se aprecia es en realidad una distorsión de los objetos, debido a la difracción de la luz. Se evaluó el efecto del tamaño del píxel de la imagen limitada por difracción sobre la cuantificación de N&B. Las imágenes limitadas por difracción fueron analizadas para obtener los mapas del N&B promedio. Los resultados son reportados en los *heatmaps* de la [sección 8.1.3](#), donde cada recuadro representa la evaluación de los parámetros en un escenario óptico específico (figura 11).

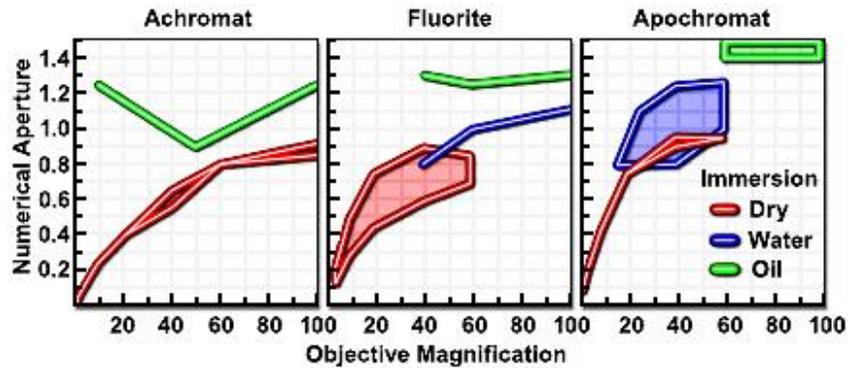


Figura 10. Rango de valores de apertura numérica y magnificación en objetivos convencionales, según el medio de inmersión y el tipo de corrección de aberración óptica.

La apertura numérica de un objetivo es una medida de su capacidad para recolectar la luz y resolver los detalles de un espécimen a una distancia fija. En la práctica, es difícil alcanzar aperturas numéricas superiores a 0.95 sin utilizar un medio de inmersión. Sin embargo, al utilizar agua, glicerina o aceites como medios de inmersión, es posible alcanzar aperturas numéricas superiores al modificar el índice de refracción entre la muestra y la lente. Adicionalmente, los objetivos con la capacidad de corregir aberraciones ópticas poseen una apertura numérica superior, en función de su respectiva magnificación. Imagen tomada de www.microscopyu.com.

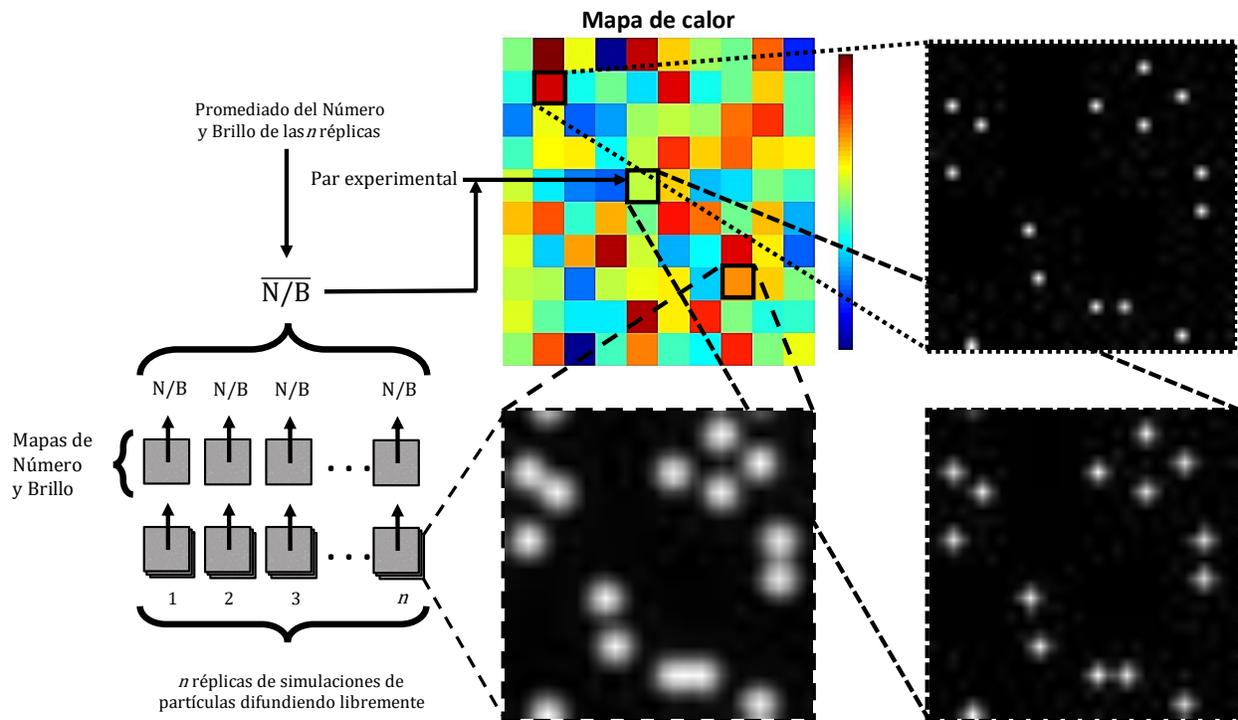


Figura 11. Esquema general de la obtención de datos a partir de simulaciones de N&B en un sistema limitado por difracción.

Cada recuadro del *heatmap* representa el promedio del Número o del Brillo de n réplicas de una simulación de moléculas en libre difusión, con parámetros ópticos específicos. Los paneles de la derecha y central inferior esquematizan la apariencia de las partículas simuladas en función de la PSF generada a partir de cada set de parámetros ópticos.

7.2.3 Simulación de imágenes EMCCD

Una vez generadas las imágenes limitadas por difracción, se simuló ruido de fondo de una cámara EMCCD mediante un código escrito en R (ver [Anexo D-c](#)) basado en el modelo matemático descrito por (Hirsch *et al*, 2013) ([Anexo A-c](#)). Las propiedades electrónicas de la cámara manipuladas para simular el ruido digital fueron: eficiencia cuántica, ganancia, *offset*, factor de proporcionalidad análogo-digital y la corriente espuria del detector (figura 12).

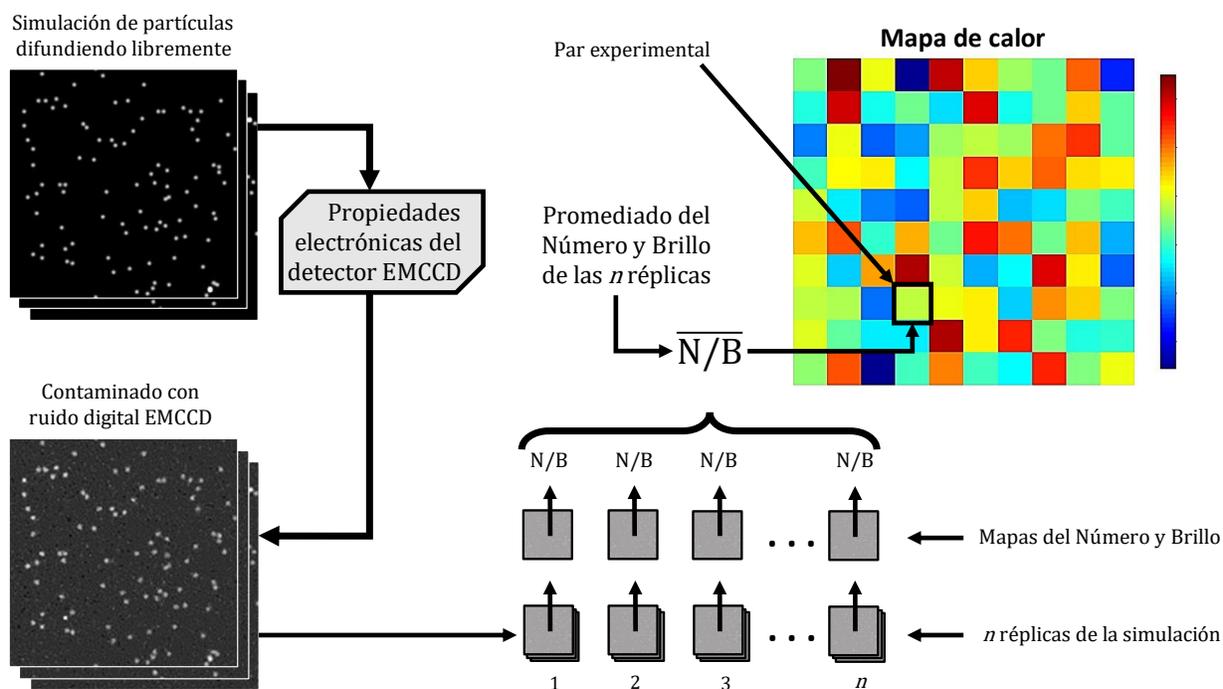


Figura 12. Esquema general de la obtención de datos a partir de simulaciones de Número y Brillo en un sistema contaminado con ruido digital de un detector EMCCD.

Cada recuadro del *heatmap* representa el promedio del Número o del Brillo de n réplicas de una simulación de moléculas en libre difusión con ruido del detector EMCCD Andor iXon Ultra 897 del LNMA. Los valores de los parámetros ópticos para generar las imágenes limitadas por difracción fueron: apertura numérica, 1.49; longitud de onda de detección, 480 nm; tamaño de píxel de la imagen, 250 nm.

7.2.4 Simulación de imágenes sCMOS

Una vez obtenidas las imágenes limitadas por difracción, se simuló ruido de fondo de una cámara sCMOS mediante un código escrito en R (ver [Anexo D-d](#)) basado en el modelo matemático descrito por (Liu *et al*, 2017) ([Anexo A-d](#)). Los parámetros electrónicos de la cámara manipulados para simular el ruido fueron: *offset*, ganancia y varianza de cada píxel ([Anexo E](#)). Se seccionaron los mapas de calibración del sensor en zonas localizadas de alta y baja variación relativa con el propósito de evaluar el sesgo introducido al análisis de N&B en función de la posición espacial de los parámetros electrónicos del detector sobre la imagen (figura 13; Secciones [8.1.5](#), [8.1.5.1](#), [8.2](#); [Anexo C](#)).

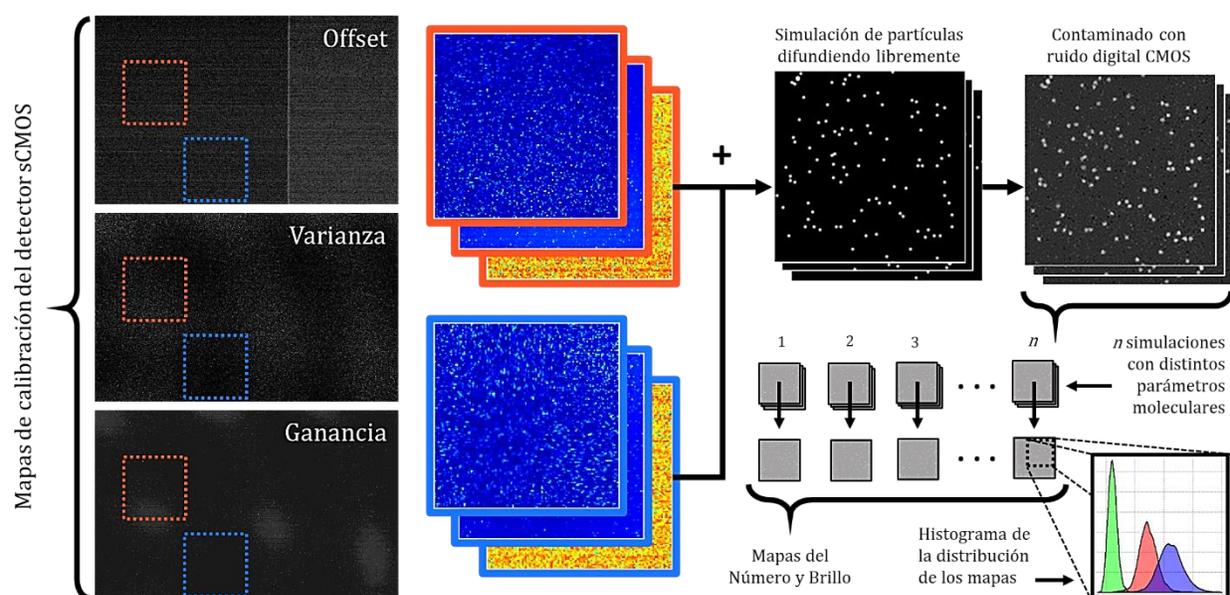


Figura 13. Esquema general de la obtención de datos a partir de simulaciones de Número y Brillo en un sistema contaminado con ruido de un detector sCMOS.

Los recuadros puntuados naranjas y azules corresponden a zonas de alta y baja variabilidad relativa de los parámetros electrónicos del detector sCMOS, respectivamente, para cada uno de los mapas de calibración. Cada una de estas delimitaciones de los mapas fue utilizada para generar dos conjuntos de simulaciones de partículas difundiéndose libremente en presencia de ruido sCMOS. Posteriormente se obtuvieron los mapas del Número y Brillo para cada una de las simulaciones y, finalmente, los resultados fueron reportados como la distribución de los valores de concentración (Número) y estado estequiométrico (Brillo) en función de la posición espacial de los parámetros electrónicos del detector. Los valores de los parámetros ópticos para simular las imágenes limitadas por difracción fueron: apertura numérica, 1.49; longitud de onda de detección, 480 nm; tamaño de píxel de la imagen, 250 nm.

7.2.5 Evaluación de los algoritmos de simulación y análisis de Número y Brillo

A manera de un ejercicio para observar el comportamiento de los algoritmos de simulación y análisis generados en este trabajo, escritos con base en la teoría ([Sección 1.2.2](#); Anexos [A-a](#), [A-b](#), [D-a](#) y [D-f](#)), se simularon tres escenarios distintos:

- (a) Cuatro cuadrantes con la misma concentración de partículas en cada uno de ellos, pero con estado estequiométrico creciente (figura 14-a).
- (b) Cuatro cuadrantes con partículas de la misma estequiometría, pero concentración creciente (figura 14-b).
- (c) Cuatro cuadrantes con dos concentraciones y estados estequiométricos distintos, posicionados de manera cruzada (figura 14-c).

Se inspeccionaron de manera cualitativa los mapas de Número y Brillo resultantes para comprobar que cada región de estos reflejara la abundancia y estequiometría esperados de las partículas simuladas, denotados por el texto blanco en cada cuadrante de la columna de la izquierda en la figura 14.

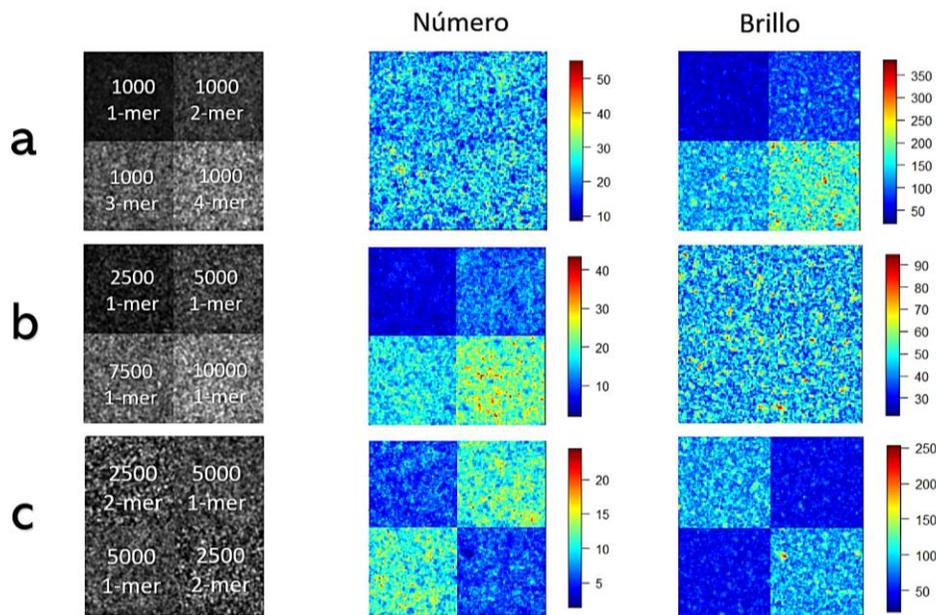


Figura 14. Algoritmo de análisis de N&B.

Simulaciones de partículas en difusión libre con concentración homogénea y estequiometría variable (a), estequiometría homogénea y concentración variable (b) y concentración y estequiometría variables (c). Los mapas del Número y Brillo de cada simulación se muestran en las columnas central y derecha de la figura, respectivamente. Cada simulación consta de 100 imágenes de 64 píxeles por lado no limitadas por difracción y sin ruido digital.

7.3 EXPERIMENTO EN CÉLULAS VIVAS

Se utilizaron ratones CD-1 adultos (entre 10 y 12 semanas de edad), mantenidos a 23 °C en un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas en oscuridad. Los ratones se sacrificaron siguiendo las recomendaciones de (Nagy *et al*, 2006) y posteriormente se recolectó el esperma epididimario. Brevemente, el epidídimo de cada ratón fue suspendido en 500 µl de medio no capacitante (NC) e incubado a 37 °C durante 15 minutos. Los espermatozoides recuperados se pre-incubaron en presencia de SiR-actin 100 nM en medio NC durante 10 minutos a 37 °C. Una vez cargados, los espermatozoides fueron incubados nuevamente durante 60 minutos en medio capacitante (CAP) en presencia de SiR-actin 100 nM y posteriormente fueron inmovilizados en cubreobjetos recubiertos con concavalina-A (1 mg/ml). Para la visualización de los espermatozoides bajo el microscopio, el compartimento de observación fue llenado con medio NC con SiR-actin 100 nM, se colocó la muestra sobre el objetivo y se excitó con un láser de 640 nm. Pasados 2.5 minutos, se indujo la reacción acrosomal con progesterona. Posteriormente, utilizando el microscopio Nanoimager-S (Oxford Nanoimaging), equipado con un objetivo de magnificación 100X, 1.49 NA de inmersión en aceite (Olympus) y una cámara sCMOS (C11440-22CU, Hamamatsu), se adquirieron 4000 imágenes de 684 por 428 píxeles y tamaño de pixel efectivo de 117 nm, con una tasa adquisición de 100 imágenes por segundo en intervalos de 30 segundos durante 20 minutos. La muestra fue excitada mediante iluminación LED a una longitud de onda de 640 nm utilizando un espejo dicróico de excitación 405/473/561/635 y el filtro de emisión 2: banda 2 666-694 para la recolección de la señal de fluorescencia. La porción del chip del sensor sCMOS empleada para adquirir las imágenes fue la misma que se utilizó para caracterizar los parámetros electrónicos de la cámara ([Sección 7.1.2](#), [Anexo E](#)). Los procedimientos experimentales con animales fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Biotecnología, UNAM. Experimentos realizados por Martina Jabłoński.

7.4 PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES SCMOS MEDIANTE ACsN

Las imágenes correspondientes a las simulaciones y el experimento *in vitro* fueron cargadas al entorno de Matlab a través de la interfaz gráfica de ACsN. Posteriormente, se cargaron los mapas del *offset* y de ganancia y se introdujeron los valores de 1.49, 674 nm y 117 nm para los parámetros de apertura numérica, longitud de onda y tamaño de píxel, respectivamente. ACsN procesó las imágenes y éstas fueron almacenadas para su posterior análisis.

8. RESULTADOS

Existen diversas variables que pueden afectar el desempeño y la confiabilidad de un estudio de N&B (Cutrale *et al*, 2019). Cutrale F. y colaboradores (2019) elaboraron una guía para estudiar la oligomerización de proteínas mediante N&B. Esta guía se construyó a partir de diversas evidencias experimentales donde el análisis N&B resultó útil para resolver una problemática específica. En 2008, Digman y col. presentaron un estudio sistemático donde se evaluó el efecto de diversas variables experimentales tales como tipo de detección (analógica o modo de conteo de fotones), corrección de fotoblanqueo, ruido electrónico y concentración de fluoróforos, entre otras, sobre la cuantificación del Número y el Brillo en un microscopio de escaneo confocal. En este trabajo se presentan los resultados de un ejercicio de la evaluación numérica de la variación de algunos de los parámetros experimentales de N&B y su efecto sobre el análisis. Se considera el trabajo de (Digman *et al*, 2008) como un antecedente de este trabajo.

8.1 EXPLORACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN TEÓRICOS DEL ANÁLISIS DE NÚMERO Y BRILLO

8.1.1 La cantidad de imágenes, su tamaño y tasa de adquisición introducen sesgos en la cuantificación de la abundancia y el estado de oligomerización de partículas en solución mediante el análisis N&B

La mayor parte de las aplicaciones de N&B se centran en el muestreo de fenómenos dinámicos que ocurren en escalas espacio-temporales características, en el rango de 10^{-3} – 10^2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (Milo & Phillips, 2015). De acuerdo con el teorema de muestreo de Nyquist-Shannon, la señal original de un sistema puede representarse a partir de valores discretos muestreados a una frecuencia que exceda por al menos un factor de dos a la frecuencia más alta de la señal original (Landau, 1967). Para procesos dinámicos, es importante describirlos con un muestreo temporal superior, de al menos dos veces, a la velocidad con la que ocurren.

La cantidad de imágenes, su tamaño y tasa de adquisición son parámetros para elegir en cualquier sistema de imagenología digital. Estos parámetros están interrelacionados con la cantidad de fotones que van a ser colectados y posteriormente digitalizados (Youker & Teng, 2014). La elección del tiempo de exposición es comúnmente hecha con base en conocimiento previo sobre la temporalidad del fenómeno en estudio, teniendo presente que cada detector posee una eficiencia de colección de fotones característica conocida. La velocidad de movimiento de las proteínas celulares, considerando diferentes tamaños y compartimentos, está en el rango de 10^{-3} – 10^2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Su difusión se puede estudiar colectando imágenes con tiempos de exposición en el rango de segundos a milisegundos (Malacrida *et*

al, 2018). La mayoría de las cámaras digitales actuales son capaces de digitalizar información en las escalas temporales de varios segundos, que normalmente corresponde a las velocidades de difusión de proteínas dentro de las membranas. Si bien la velocidad de adquisición y el tiempo de exposición son conceptos distintos, se requiere de cautela al determinar este último, ya que tiempos de exposición elevados puede resultar en el foto-daño de la muestra. La adquisición de cientos de imágenes por segundo representa un reto, o incluso una limitante, para la mayoría de los sensores EMCCD. Además, cuando se trabaja con especies fluorescentes que difunden rápidamente (10^{-3} – 10^{-2} $\mu\text{m}^2/\text{s}$), debe considerarse que cada fluoróforo tiene un rendimiento cuántico característico; el uso de tiempos de exposición cortos puede significar la adquisición de un número de fotones insuficiente para poder discriminar la señal del fondo.

Aunado a lo anterior, existen otros parámetros que determinan la calidad de una imagen digital. La información colectada en un microscopio óptico se convoluciona durante su paso por las lentes que lo conforman. Fenómenos que surgen cuando la luz interactúa con la materia, tales como difracción, dispersión y esparcimiento, provocan la distorsión de la información proveniente del espécimen, misma que se modifica y entremezcla con el ruido del detector durante el proceso de digitalización para dar lugar a la imagen digital.

Con la finalidad de evaluar el impacto que tiene la cantidad de imágenes, su tamaño y tasa de adquisición sobre la precisión de la cuantificación de abundancia y estequiometría moleculares mediante estudios de N&B, se desarrolló un modelo mínimo de partículas difundiéndose en dos dimensiones ($D = 25 \mu\text{m}^2/\text{s}$) en un sistema libre de efectos de difracción y de presencia de ruido digital. La figura 15 muestra el resultado promedio del análisis de N&B obtenido a partir de diez réplicas de simulaciones, considerando una concentración promedio de 1 partícula por píxel ($N = 1$) en estado monomérico ($B = 1$).

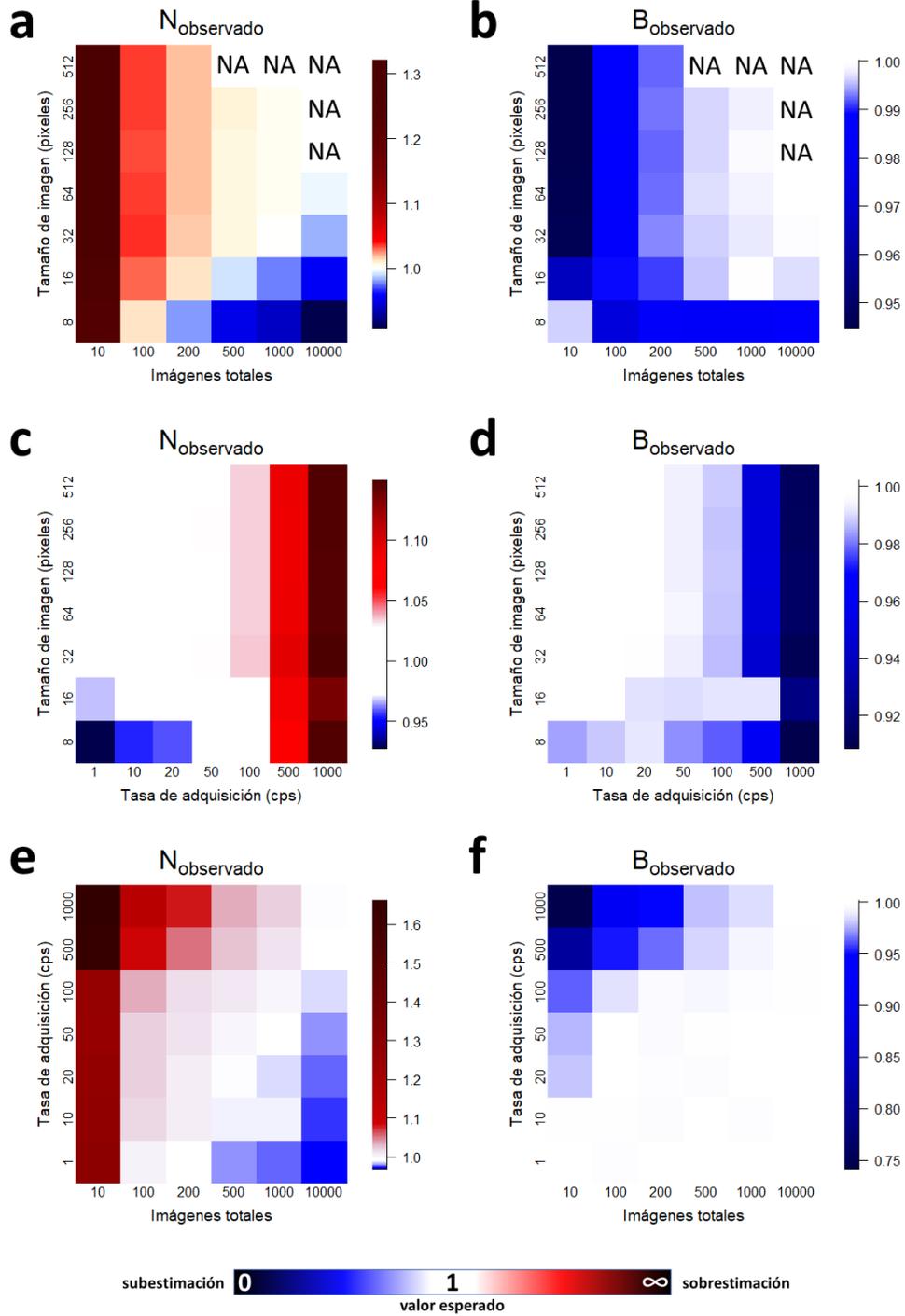


Figura 15. Efecto del tamaño de la imagen, el número total de imágenes y la tasa de adquisición sobre el Número y el Brillo.

Cada recuadro de los *heatmaps* representa el promedio de diez réplicas experimentales. Parámetros de simulación: tasa de adquisición de 100 cuadros por segundo (paneles superiores), 200 imágenes totales (paneles centrales), imágenes de 32 píxeles (paneles inferiores) y coeficiente de difusión de $25 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (todos los paneles). NA: no analizado por limitaciones de hardware.

Partiendo de la definición del Número y del Brillo, la precisión de la cuantificación de estos debería ser proporcional al número de eventos analizados, donde cada evento corresponde a la fluorescencia medida en un píxel de una imagen de la serie temporal. Dicho de otra manera, el número de imágenes colectadas influencia la estadística y, por ende, la estimación de los valores del Número y del Brillo. La figura 15-a muestra una dependencia de la estimación del Número tanto con la cantidad total de imágenes analizadas como con su tamaño (en píxeles). Las dependencias observadas son consistentes con el teorema de muestreo de Nyquist-Shannon debido a que el coeficiente de difusión de las partículas simuladas se mantuvo constante a $D = 25 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Bajo esta condición, se halló que el análisis de menos de 200 imágenes resulta en una sobreestimación del Número, para cualquier tamaño de imagen simulado (de 8 a 512 píxeles cuadrados). Lo anterior se puede explicar por la cadencia de información debido a un muestreo insuficiente de la dinámica de la fluorescencia.

Interesantemente, al analizar 500 imágenes o más, ocurrió una subestimación del valor esperado del Número ($N = 1$) de aproximadamente 3 órdenes de magnitud. Según los hallazgos de Digman y col. en 2008, se esperaría que incrementar el número de eventos (imágenes) analizados impactaría siempre de manera positiva en la estimación del Número y el Brillo, al enriquecer el muestreo estadístico y disminuir el error asociado al cálculo de la varianza. No obstante, los resultados presentados en la figura 15-a señalan que el analizar demasiados eventos puede introducir sesgos. En ambos casos, la estimación del Número y del Brillo dependen de la estimación de la esperanza y la varianza de la información ([Sección 1.2.2](#) y [Anexo A-b](#)). La esperanza es el promedio de un grupo de números, la varianza mide el grado promedio en el que cada número es diferente de la media. El alcance de la estimación de la varianza se correlaciona con el tamaño del rango general de los números, lo que significa que la varianza es mayor cuando hay un rango más amplio de números y es menor cuando hay un rango de números más estrecho. Considerando la dependencia que tiene la varianza con el tamaño de la muestra se puede concluir que la estimación del Número (figura 15-a), y del Brillo (figura 15-b), son ambas dependientes del tamaño de la muestra. Puede concluirse que la precisión del análisis de N&B depende del número de imágenes colectadas. La precisión en la estimación del Número es inversamente proporcional al número de imágenes colectadas mientras que la del Brillo es directamente proporcional. En contraste con los hallazgos de Digman y col., no sólo se requiere un número mínimo de imágenes para obtener una medición precisa, sino que también existe un límite sobre el cuál la cantidad de partículas observadas mediante N&B comienza a subestimarse. Por otro lado, esto no afecta la cuantificación de la estequiometría de las partículas (en imágenes simuladas de por lo menos 16 píxeles cuadrados) (figura 15-b). Ver [Anexo B-a](#) para más detalles de este fenómeno.

Para tamaños de imagen menores de 16 píxeles por lado, la cuantificación del Número y del Brillo se vuelve imprecisa a cualquier tasa de adquisición. Esto último puede deberse a que, dado que en las simulaciones al alcanzar un borde de la imagen las partículas aparecen nuevamente del lado contrario de esta, el espacio de la imagen es tan reducido que se crea la ilusión de que no se mueven. Esto último provoca una subestimación de la varianza de la fluorescencia.

Tasas de adquisición mayores a 100 cuadros por segundo (cps) provocan una sobreestimación y una subestimación del Número y del Brillo, respectivamente, al observar partículas con un coeficiente de difusión de $25 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (figura 15-c,d). Sin embargo, dado que la tasa de adquisición y el coeficiente de difusión (dependiente del tamaño de las partículas) están íntimamente relacionados por la temporalidad del proceso, no es posible concluir aun el efecto de estas dos variables sobre el análisis. Ver [Anexo B-b](#) para más detalles.

Tasas de adquisición elevadas provocan una sobrestimación del Número a menos que se adquieran más de 1000 imágenes por experimento. Sin embargo, demasiadas imágenes provocarán una subestimación si no muestrea lo suficientemente rápido (figura 15-e). Por otro lado, el Brillo sólo será subestimado al adquirir menos de 500 imágenes a más de 500 cps (figura 15-f).

Para el caso de las simulaciones realizadas en este trabajo, tamaños de imágenes por encima de los 16 píxeles son más convenientes para cuantificar correctamente el Número y el Brillo. Ver [Anexo B-c](#) para más detalles.

Con base en los resultados de la figura 15, se concluye que los parámetros experimentales donde la técnica de Número y Brillo posee mayor sensibilidad en simulaciones son:

- i)** Entre 200 y 500 imágenes totales por experimento; más imágenes analizadas incrementan ligeramente la precisión de la cuantificación del Brillo (figura 15-b), pero provocan una subestimación del Número (figura 15-a).
- ii)** Tamaño de imagen de al menos 16 píxeles por lado; tamaños menores introducen sesgos al análisis. No existe límite aparente en el tamaño de la imagen.
- iii)** Una tasa de adquisición de entre 10 y 100 cps resulta óptima para la cuantificación de partículas con coeficiente de difusión en el orden de las decenas de $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Sin embargo, estos dos factores están íntimamente ligados y la elección de la tasa de adquisición debe hacerse con base en la temporalidad del fenómeno molecular que se espera cuantificar.

8.1.2 La abundancia y estequiometría de las partículas poseen límites de detección

8.1.2.1 La velocidad de las partículas gobierna la estadística de los experimentos

En esta sección se presenta el estudio del efecto del coeficiente de difusión de partículas simuladas y cada uno de los parámetros experimentales evaluados en la sección anterior sobre la cuantificación del Número y del Brillo. Cabe remarcar que este último está directamente asociado al peso molecular y, por ende, a la velocidad a la que se mueven las partículas. Si bien se simularon únicamente monómeros, los resultados permiten determinar la sensibilidad de la técnica para la identificación de especies moleculares monoméricas de distinta masa y coeficiente de difusión. Lo reportado a continuación aplica únicamente para el contexto de este trabajo, se necesitan más pruebas que permitan extender los hallazgos a otros sistemas experimentales.

Cuando las partículas se mueven más lentamente, es necesario adquirir una cantidad superior de imágenes por experimento. Esto se debe a que la magnitud del cambio de posición de las partículas en el tiempo es baja y, por lo tanto, entre menos imágenes se adquieran, menos información acerca de su movimiento será recolectada (figura 16-a,b). Sin embargo, cuando las partículas se mueven lo suficientemente rápido (i.e. $10 \mu\text{m}^2/\text{s}$ o más), basta con adquirir más de 100 imágenes para aproximarse al valor esperado.

La concentración y estado estequiométrico de moléculas cuyo coeficiente de difusión es relativamente pequeño (menos de $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$) son más difíciles de cuantificar; este efecto puede ser compensado al ajustar la tasa de adquisición para aproximarse a la temporalidad del fenómeno difusivo.

Para todos los casos, siempre y cuando el tamaño de las imágenes sea de por lo menos 16 píxeles por lado, la cuantificación del Número se ve favorecida mientras más rápido se muevan las partículas (figura 16-e,f). Sin embargo, este aumento en el coeficiente de difusión debe ser compensado por tasas de adquisición elevadas que se aproximen a la temporalidad del fenómeno difusivo. Existe una relación proporcional entre la velocidad a la que se mueven las partículas y la velocidad a la que la señal debe ser muestreada para describir correctamente la información (figura 16-c,d).

En el caso de partículas cuyo movimiento es demasiado lento, el escaso cambio en su posición a través del tiempo provoca que la varianza de la señal se aproxime a cero. Este fenómeno se vuelve un problema especialmente cuando dichas partículas no experimentan movimiento, es decir, existe una población de partículas inmóviles en la muestra. Para mitigar este efecto y evitar la introducción de sesgos en las mediciones, es necesario remover la señal de los objetos estáticos.

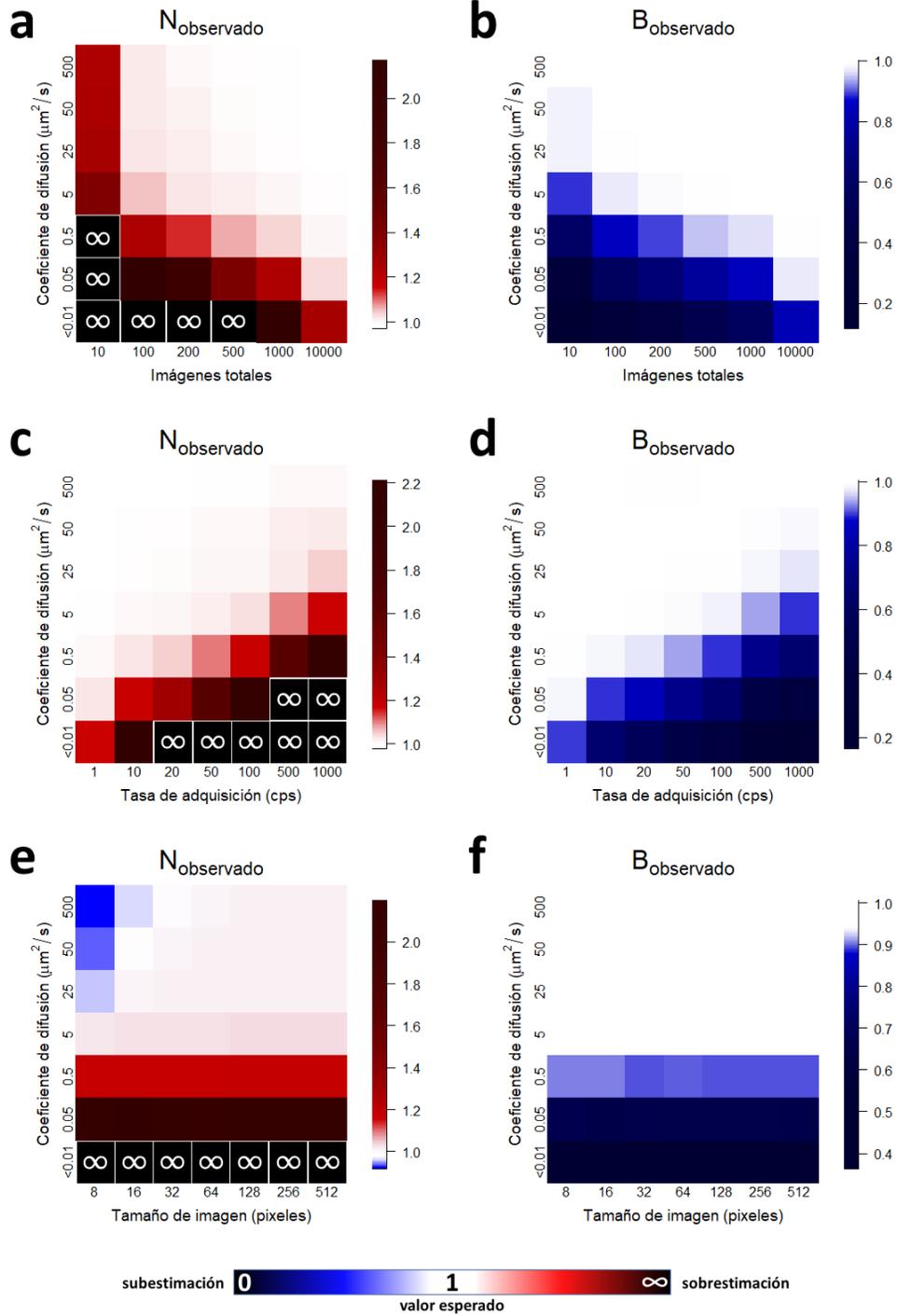


Figura 16. Evaluación del efecto del coeficiente de difusión sobre el Número y el Brillo.

Cada recuadro de los *heatmaps* representa el promedio de diez réplicas experimentales. Parámetros de simulación: tasa de adquisición de 100 cuadros por segundo (a,b-e,f), 200 imágenes totales (c,d,e,f), imágenes de 32 píxeles (a,b,c,d). Los recuadros con un símbolo de infinito ∞ indican que ese par experimental arrojó dicho resultado a partir del análisis.

8.1.2.2 Es necesaria una cantidad mínima de partículas por píxel para cuantificar correctamente su abundancia

En esta sección se evalúa el efecto de la abundancia de partículas y su estado estequiométrico sobre la cuantificación del Número y del Brillo, es decir, cómo afecta la cantidad de partículas y su grado de oligomerización en la cuantificación de estos mismos parámetros. Para ello, se simularon valores del Número desde 0.001 hasta 100 y del Brillo desde monómeros hasta 100-meros (figura 17).

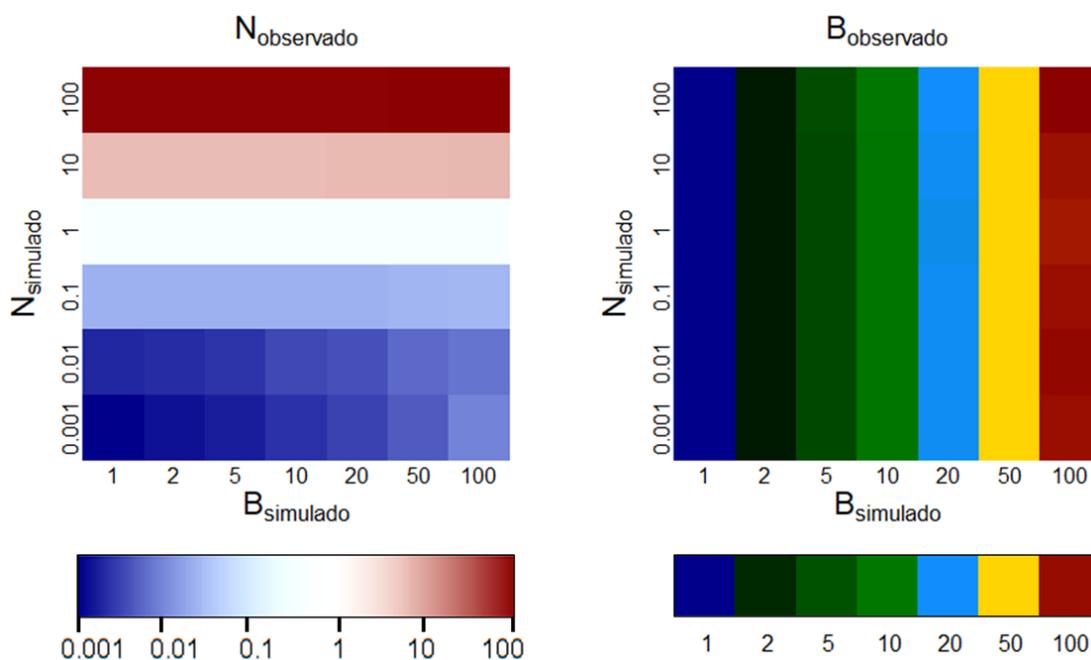


Figura 17. Evaluación del efecto de la abundancia de partículas y su estado estequiométrico sobre el Número y el Brillo.

Cada recuadro de los *heatmaps* representa el promedio de diez réplicas experimentales. Parámetros de simulación: imágenes de 32 píxeles, tasa de adquisición de 100 cps, 200 imágenes totales por análisis. El coeficiente de difusión de cada oligómero se calculó mediante la [ecuación 5](#), considerando un coeficiente de difusión del monómero de $25 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Un valor del Número de 0.001 equivale a una sola partícula difundiendo en toda la imagen a lo largo del experimento, mientras que un valor de 100 equivale a un promedio de 100 partículas por cada píxel en todo momento.

Cuando la cantidad de partículas promedio por píxel es igual o mayor a 0.1, la cuantificación del Número se mantiene constante sin importar el estado estequiométrico. Menos de 0.1 partículas promedio por píxel se ven reflejadas en una sobreestimación del Número en oligómeros de orden mayor. La cuantificación del Brillo no es afectada por la concentración de partículas.

8.1.3 La pérdida de resolución deteriora el análisis de Número y Brillo

En esta sección se evalúa efecto de las propiedades ópticas de un sistema limitado por la difracción de la luz sobre la cuantificación del Número y del Brillo. Los parámetros experimentales para las simulaciones de este estudio fueron elegidos con base en los resultados obtenidos en la [Sección 8.1.1](#).

La medición del Número y el Brillo tiende a sesgarse mientras la longitud de onda empleada es mayor y el tamaño de píxel de la imagen limitada por difracción es más pequeño (figura 18-a,b).

La pérdida de resolución en las imágenes a causa de la difracción de la luz impacta en el muestreo de la información. Cuando la señal de las partículas se transforma en una distribución de intensidad al convolucionarse con la PSF ([Sección 7.2.2](#) y [Anexo A-e](#)), la magnitud de la varianza debida al movimiento de las partículas disminuye cuando estas entran en proximidad. En otras palabras, cuando una partícula difunde demasiado cerca de otra (i.e. a una distancia menor a la resolución mínima del sistema), la varianza de la señal se comparte entre píxeles y la información asociada al movimiento molecular se deteriora. Si bien el valor medio se mantiene constante dado que el número de partículas en la imagen no cambia a través del tiempo, el decremento en la varianza ocasiona una sobreestimación del Número y una subestimación del Brillo, respectivamente.

Es necesario que el tamaño de píxel sea más grande que la dimensión radial de la PSF (w), que es directamente proporcional a la longitud de onda (λ) e inversamente proporcional a la apertura numérica (NA) de la lente, según la relación $w = 0.61\lambda/NA$. Si consideramos una longitud de onda de 500 nm y apertura numérica de 1.49, la distancia radial de la PSF se aproxima a $w = 0.61 * 500/1.49 = 196$ nm; a esta longitud de onda, es necesario un tamaño de píxel de aproximadamente por lo menos 225 nm para resolver la concentración y el estado estequiométrico de las partículas (figura 18-a,b). Además, el tamaño de píxel (producto de la magnificación del objetivo y el tamaño físico de píxel del detector) puede provocar un sobre- o submuestreo de la señal de la fluorescencia si este excede o es menor a las dimensiones de la PSF, respectivamente.

En cualquier caso, mientras mayor sea la apertura numérica, mayor es la resolución del sistema y la capacidad de estimar el Número y el Brillo. Por ello, se recomienda utilizar un objetivo 60X o 100X de inmersión en aceite que permita alcanzar, según el tipo de corrección de aberraciones ópticas, aperturas numéricas lo suficientemente altas para mitigar el efecto de la difracción de la luz.

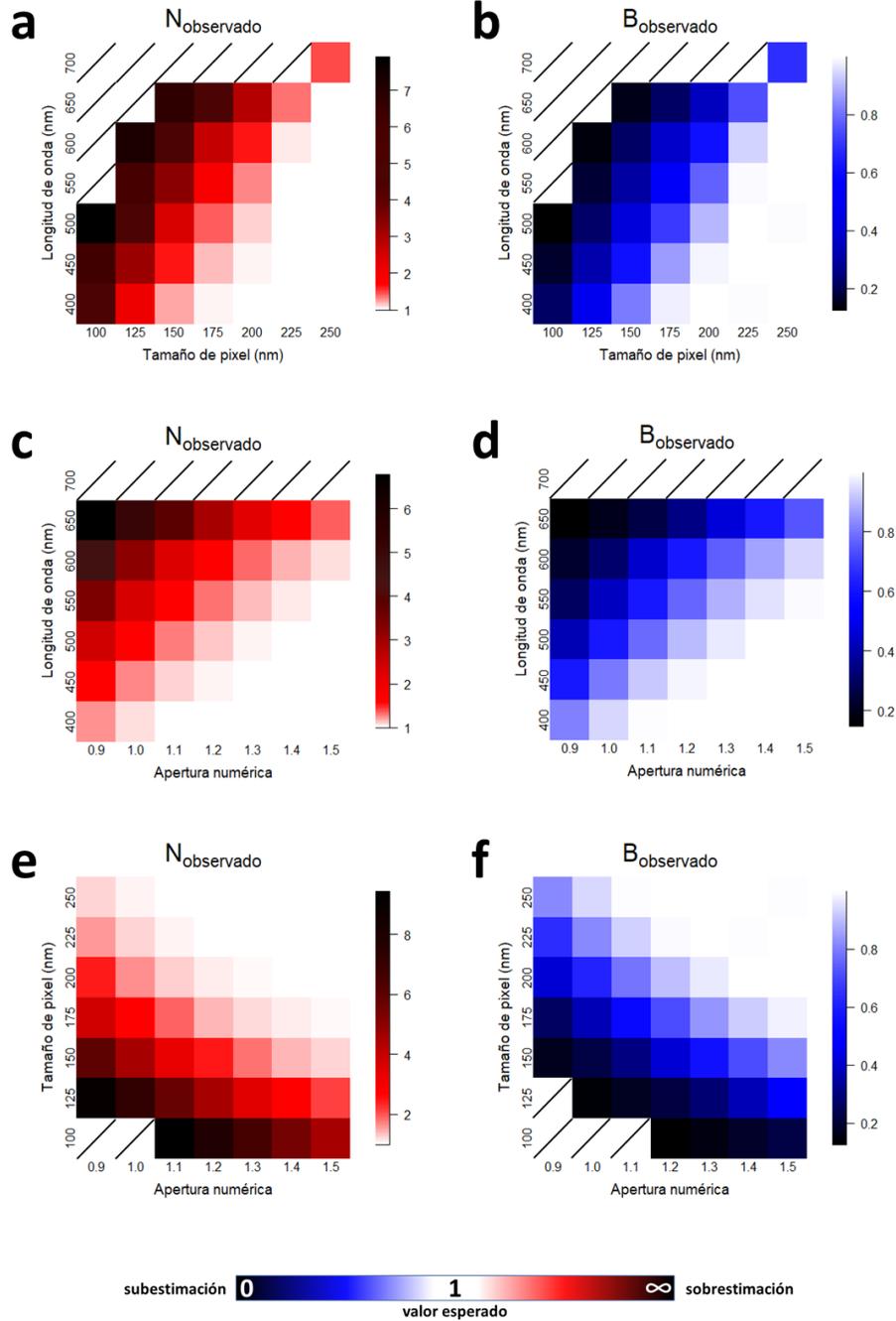


Figura 18. Evaluación del efecto de la longitud de onda, tamaño de píxel y apertura numérica sobre el Número y el Brillo.

Cada recuadro de los *heatmaps* representa el promedio de diez réplicas experimentales. Parámetros de simulación: 500 imágenes de 64 píxeles a 100 cps y coeficiente de difusión de $25 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Paneles superiores a inferiores: apertura numérica de 1.49, tamaño de píxel de 250 nm y longitud de onda de 500 nm, respectivamente. Los recuadros con líneas negras diagonales representan mediciones mayores a 10 o menores a 0.1 unidades (para el Número y el Brillo, respectivamente) y, por ello, fueron excluidas del *heatmap* donde, para cualquier caso, el valor esperado es de 1.

8.1.3.1 La varianza de la señal se subestima cuando la resolución espacial disminuye

La entropía de una imagen está dada por fenómenos dinámicos como el parpadeo de los fluoróforos o su movimiento en el plano espacial. La cuantificación de esta entropía, a través del análisis de los momentos estadísticos de las fluctuaciones de la fluorescencia (Número y Brillo), es la que permite derivar información relacionada con la abundancia y estequiometría de las partículas.

En la figura 19 se muestra un esquema del efecto que ejerce la pérdida de la resolución en una imagen limitada por difracción sobre la capacidad de medir la entropía de las partículas, que es directamente proporcional a la distancia entre estas y a la resolución espacial. La varianza originada por el tráfico molecular es proporcional a la intensidad máxima de los emisores, es decir, su magnitud depende directamente de la cantidad de fotones emitidos en un intervalo determinado. Por otro lado, el límite de la varianza en un sistema limitado por difracción tiende a cero cuando la resolución disminuye. Cuando el ancho de la distribución de intensidad de las partículas es mayor al muestreo espacial o, en su defecto, a la magnitud del desplazamiento de estas, la varianza se subestima ya que el cambio en la intensidad para una posición dada de un momento a otro, es menor. La varianza obtenida describe fielmente el proceso difusivo cuando la señal no comparte información de otros emisores.

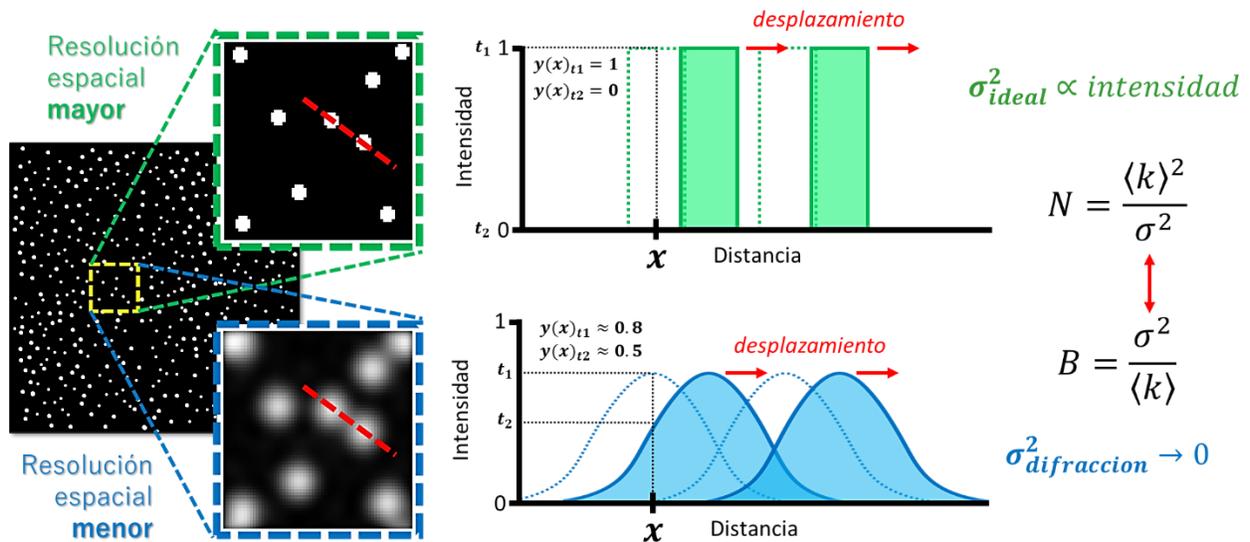


Figura 19. Efecto de la disminución de la resolución sobre la varianza de la señal.

Las gráficas de la derecha corresponden al perfil de intensidad descrito por las líneas rojas punteadas en las imágenes de la izquierda.

8.1.4 El ruido de fondo EMCCD introduce sesgos al análisis cuando las partículas son escasas

En esta sección se explora el espacio de parámetros moleculares a los que Número y Brillo es sensible en un sistema limitado por difracción y con presencia de ruido de fondo de una cámara EMCCD simulado.

La cuantificación tanto del Número como del Brillo se compromete al introducir ruido simulado cuando la cantidad de partículas presentes en la imagen a lo largo del experimento es de menor a 1 partícula por píxel (figura 20); esta es la cantidad de partículas promedio mínima necesaria para poder cuantificar la concentración de los fluoróforos y su estado estequiométrico.

Por debajo de este límite, la cantidad de partículas tiende a sobrestimarse debido a que la escasez de tráfico molecular provoca un colapso en la varianza de la señal, reduciendo la capacidad de describir el fenómeno difusivo a causa de un submuestreo estadístico del movimiento de las partículas. Los mapas de desviación estándar de la figura 20 indican una variación mayor en las regiones de este espacio de parámetros, que se traduce en una mayor incertidumbre con respecto a la precisión de las mediciones en estos regímenes moleculares; este efecto aumenta mientras mayor sea el estado estequiométrico, debido a que partículas más grandes y lentas, contribuyen en una proporción menor a la correcta descripción estadística del fenómeno difusivo.

Estos resultados están sustentados por la teoría de la espectroscopía de correlación de fluorescencia, donde se establece que la concentración mínima óptima para la precisa interpretación de la información a partir de las fluctuaciones de la fluorescencia se encuentra entre 0.1 y 10 nM (Elson, 2011), que se traduce en unas cuantas partículas presentes al mismo tiempo en un volumen de observación confocal, que comúnmente se aproxima a una micra cúbica.

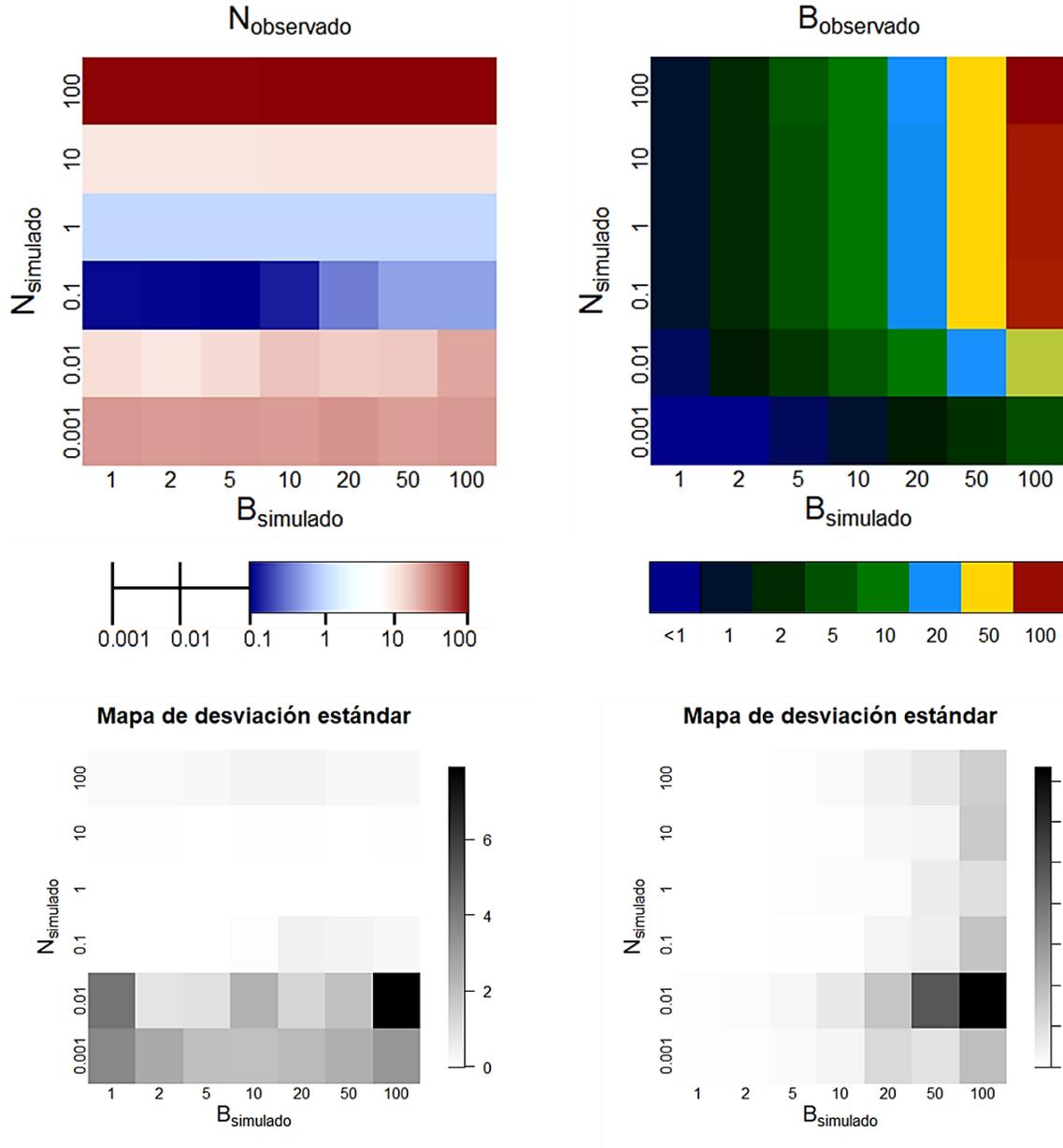


Figura 20. Evaluación del efecto de la presencia de ruido digital de un detector EMCCD sobre la cuantificación del Número y el Brillo.

Cada recuadro de los *heatmaps* de los paneles superiores representa el promedio del Número (izquierda) o del Brillo (derecha) de 10 réplicas de una simulación de moléculas en libre difusión, con parámetros ópticos específicos y con ruido EMCCD simulado. Los *heatmaps* de los paneles inferiores corresponden a los mapas de desviación estándar de las 10 réplicas de cada set de simulaciones. Parámetros de simulación: 500 imágenes de 64 píxeles a 100 cps. Los valores de los parámetros electrónicos elegidos para simular el ruido fueron: eficiencia cuántica, 90%; ganancia, 27.73; *offset*, 350; factor de proporcionalidad análogo-digital, 1.167; tasa de emisión de carga espuria, 15.96. Ver [Anexo A-c](#) para una descripción detallada de cada uno de estos parámetros.

8.1.4.1 El contraste entre la señal y el fondo no afecta el análisis

Los valores del Número y el Brillo elegidos para las simulaciones de la figura 20 fueron desde 0.001 hasta 100 partículas por píxel y desde monómeros hasta 100-meros, respectivamente, con un brillo molecular tal que se alcanzó una relación señal-ruido de 3.5 (i.e. los niveles digitales de gris correspondientes a una partícula eran 3.5 veces el promedio de los niveles digitales del fondo de la imagen).

El Número está asociado solamente a la cantidad de partículas totales en la imagen y el valor medio de la intensidad permanece constante sin importar la magnitud de su brillo molecular. Por otro lado, el Brillo está asociado directamente a la cantidad de fotones que las partículas emiten, en función de su estado estequiométrico y la potencia del láser que las excita. Por lo tanto, el brillo molecular está estrechamente relacionado con la relación señal-ruido de las imágenes resultantes.

En esta sección se investigó el efecto de distintas relaciones señal-ruido de las imágenes sobre la cuantificación del estado estequiométrico (figura 21). El Número simulado se fijó en un valor de 1 que, con base en los resultados anteriores, se sabe que es suficiente para poder muestrear correctamente el fenómeno difusivo en simulaciones.

La cuantificación del Brillo no es afectada por el nivel de contraste entre el la señal y el fondo por lo que es posible utilizar esta técnica aun en condiciones de poca disponibilidad de fotones o, en su defecto, niveles altos de ruido digital. Además, nótese que la variación entre cada recuadro del *heatmap* superior de la figura 21 es de escasas centésimas de unidad para todos los casos, lo que indica que la cuantificación de la concentración no se ve afectada por la relación señal-ruido ni la magnitud del brillo molecular.

El procesamiento de la señal en una cámara EMCCD es llevada a cabo por los mismos componentes electrónicos para todos los píxeles del sensor, lo que resulta en ruido de lectura que es homogéneo en toda la imagen, con una mínima (o nula) variación entre píxeles a causa de factores aleatorios. El análisis de Número y Brillo en estas imágenes es afectado por la interacción de la señal con el ruido del fondo. A continuación, se evalúa el efecto del contraste entre estos últimos sobre el análisis.

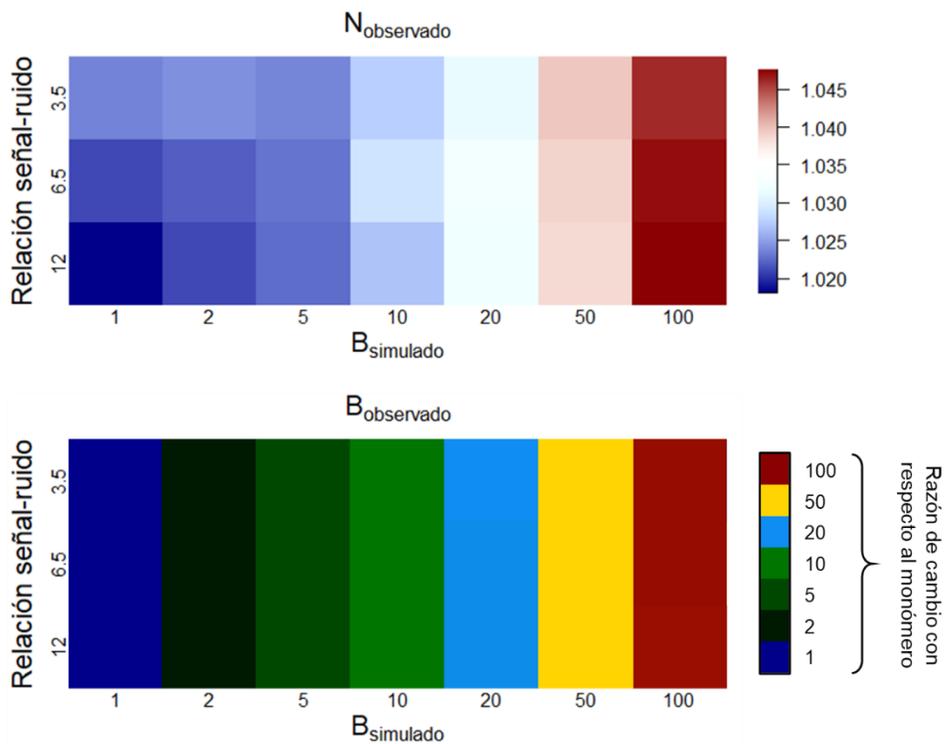


Figura 21. Evaluación del efecto de distintos valores de relación señal-ruído (de EMCCD) sobre la cuantificación del Número y el Brillo.

Cada recuadro de los *heatmaps* representa el promedio del Número (superior) o del Brillo (inferior) de 10 réplicas de una simulación de moléculas en libre difusión, con parámetros ópticos y digitales específicos y tres diferentes valores de relación señal-ruído distintos. El Número simulado para todo el panel superior fue fijado en 1. La escala de color del *heatmap* inferior refleja el factor de proporcionalidad de cada oligómero con respecto al valor del monómero cuantificado y no el valor absoluto obtenido a partir del análisis, dado que este varía según el brillo molecular elegido y, por ende, la relación señal-ruído establecida.

8.1.5 La distribución espacial del ruido sCMOS introduce sesgos al análisis

En esta sección se presenta una evaluación el efecto de la distribución espacial del ruido de fondo sCMOS sobre la cuantificación del número de partículas y su estado estequiométrico. Los mapas de calibración poseen patrones marcados en sus diferentes regiones ([Anexo E](#)). El experimentalista puede seleccionar la zona del chip que desea utilizar para el experimento al costo de sacrificar resolución y el tamaño de las imágenes. Existen regiones del chip donde la dispersión del ruido es más amplia que en otras, provocando que convenga más realizar el experimento utilizando una determinada región del chip por encima de otra (figura 22-a). Las propiedades de cada píxel, así como de cada dispositivo, varían como resultado del proceso de su proceso de manufactura.

Cuando el Número y el Brillo se analizan como un promedio general de la información de todos los píxeles de la imagen (mapa de N&B), es posible recuperar valores cercanos a los simulados. De manera similar a la [sección anterior](#), es posible obtener un buen estimado tanto del número de partículas presentes en la imagen como de su estado estequiométrico cuando la abundancia de estas oscila entre, por lo menos, 0.1 a 1 partículas en promedio por píxel, independientemente de la presencia de ruido de fondo (figura 22-b,c).

Al igual que con los datos con ruido EMCCD, al momento de calcular el Número y el Brillo a partir de las simulaciones, se introdujo una compensación del *offset* y la varianza con el propósito de obtener el Número y Brillo reales ([Anexo A-b](#)). Este es un proceso rutinario para mitigar el efecto del *offset* de la cámara (introducido de forma automática y uniforme para evitar valores negativos en la imagen) y a la variación de la señal en función de los fotones incidentes con el chip. En la siguiente sección se discute el efecto de estas diferencias en el sensor sobre el análisis local de las imágenes.

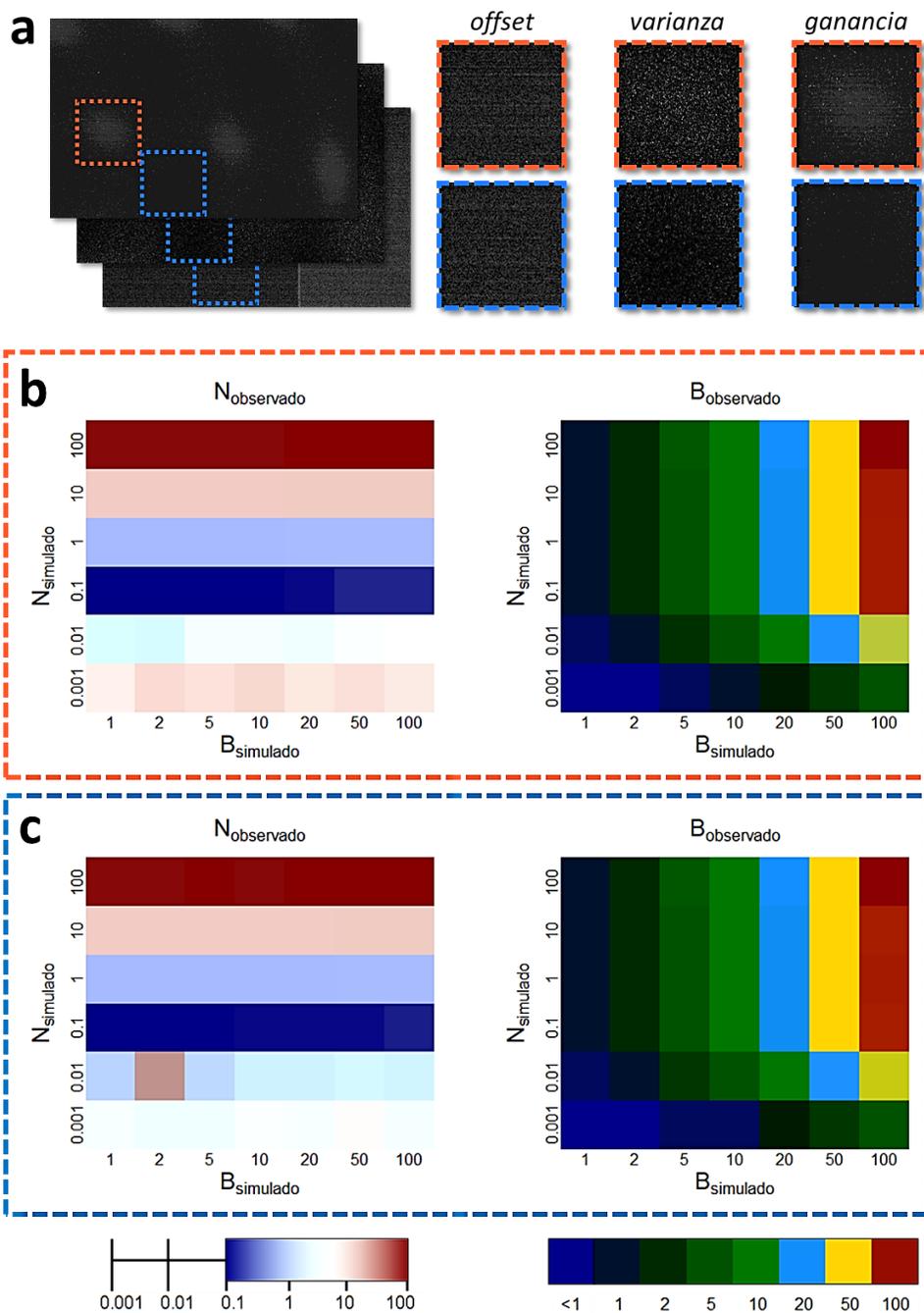


Figura 22. Efecto de la región de ruido de fondo sCMOS sobre la cuantificación del Número y el Brillo.

(a) Mapas de calibración del detector sCMOS con zonas de alta (anaranjado) y baja (azul) variación relativa encerradas en líneas punteadas. Cada recuadro de los *heatmaps* representa el promedio del Número (izquierda) o del Brillo (derecha) de 10 réplicas de una simulación de moléculas en libre difusión, con parámetros ópticos específicos y con ruido digital correspondiente a una zona de alta (b) o baja (c) variabilidad relativa de los mapas de calibración. Parámetros de simulación: 200 imágenes de 64 píxeles a 100 cps. Ver [Anexo A-d](#) para una descripción detallada de la generación de estas imágenes.

8.1.5.1 La variación local del ruido sCMOS introduce sesgos al análisis a nivel de píxel

Según los resultados mostrados en la figura 22, el efecto del ruido de fondo sobre la cuantificación del Número y el Brillo puede despreciarse cuando: a) se hace una compensación global de *offset* y varianza (Número y Brillo reales), b) estos se calculan por medio de un promediado de todos los píxeles de la imagen y c) la cantidad mínima de partículas promedio por píxel es de entre 0.1 y 1.

Si se asume que los rasgos moleculares son homogéneos en toda la región del experimento y el objetivo no es obtener información espacial sino un estimado global de toda la imagen, basta con obtener el Número y Brillo reales y asegurarse que la densidad de partículas presentes sea suficiente para describir el fenómeno difusivo. Por otro lado, cuando se hace la transición a un análisis local de los mapas del Número y el Brillo, es decir, asumiendo propiedades distintas en función de la zona de la imagen, la variación de píxel a píxel ejerce un efecto más notorio e introduce sesgos que no pueden ser pasados por alto.

En la figura 23 se evidencia la presencia de píxeles cuyas propiedades electrónicas sobresalen (*hotspots*) con respecto a la vecindad, tanto en zonas de alta como baja variabilidad relativa del detector sCMOS (figura 23-a). Para evaluar el efecto de estos píxeles sobre el análisis local de la imagen, se simularon tres estados estequiométricos distintos con concentración constante. Se obtuvo el mapa del Brillo aparente correspondiente a cada simulación y se trazó en cada uno un perfil de 65 píxeles de largo describiendo, para todos los casos, una trayectoria que atravesó cuatro *hotspots* (figura 23-b). Se comparó de manera cuantitativa el perfil de los datos ideales con el perfil de los datos con ruido de la zona de alta variabilidad (figura 23-c). Las flechas negras en el panel **c** indican los *hotspots* señalados por las flechas blancas en el panel **b**. Dichos píxeles difieren notablemente del valor teórico (líneas punteadas), mientras que los píxeles vecinos exhiben valores que, si bien son más uniformes, se encuentran por debajo de lo esperado. En la imagen inferior derecha del panel **b** se muestra un acercamiento que evidencia las diferencias que puede haber entre un píxel y otro donde, en este caso, la diferencia para el Brillo calculado fue desde 3.08 hasta 163; esto inhabilita la capacidad de formular conclusiones a partir de la información local.

La figura 23-d muestra la distribución de los valores del Brillo del mapa correspondiente a 20-meros en imágenes con ruido. En el caso ideal, el valor medio de esta distribución (línea roja punteada) estaría alineado con el valor teórico simulado (flecha negra). La dispersión y geometría de esta distribución evidencian el efecto que ejerce la variación local sobre el análisis.

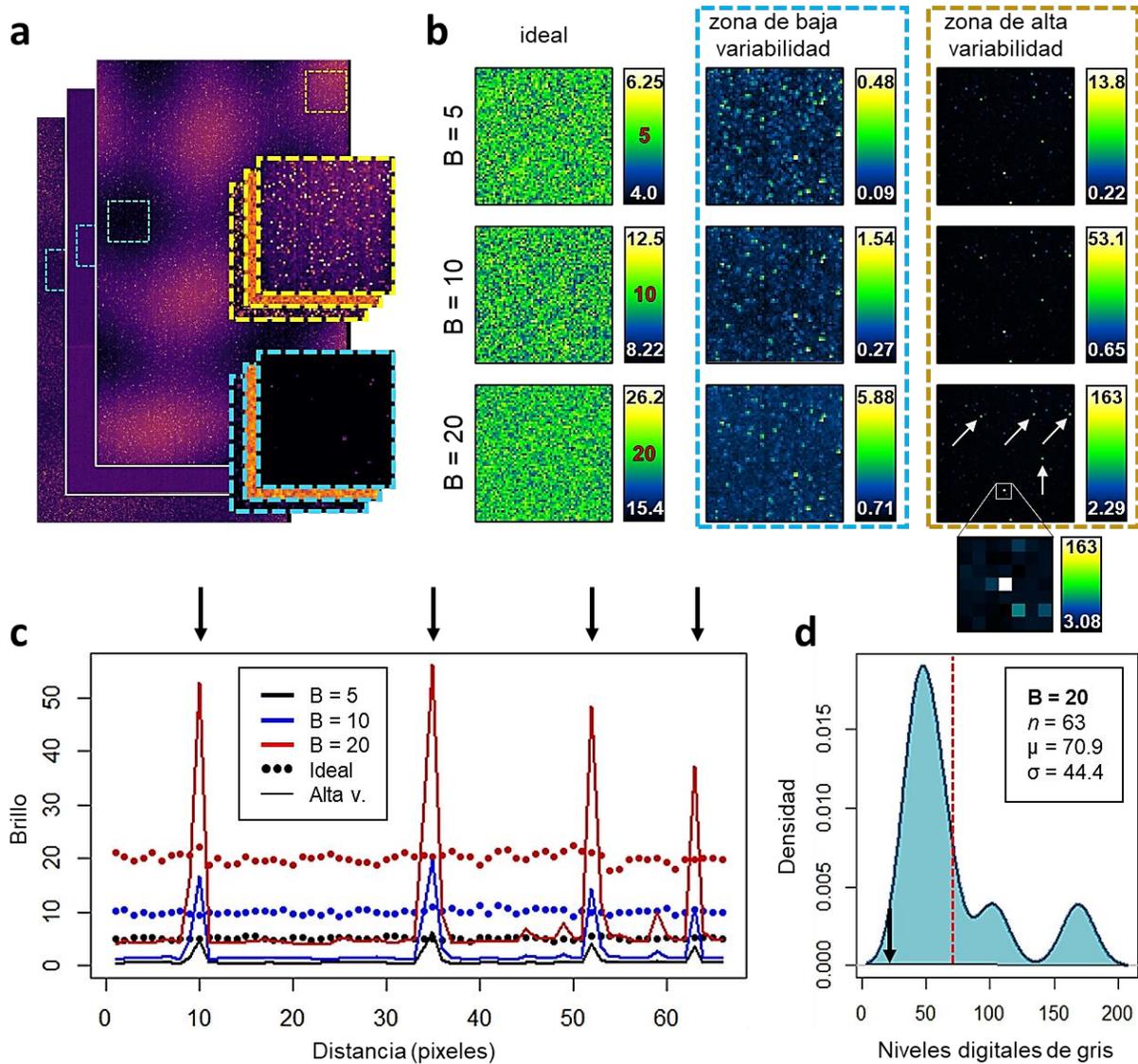


Figura 23. Efecto de la presencia de *hotspots* sobre la cuantificación del Número y el Brillo.

(a) Mapas de calibración del detector sCMOS con zonas de alta (anaranjado) y baja (azul) variación relativa encerradas en líneas punteadas, utilizadas para simular el ruido de fondo. (b) Mapas del Brillo obtenidos a partir de tres simulaciones de pentámeros, decámeros y 20-meros, en un sistema ideal (libre de ruido) y con ruido correspondiente a dos zonas diferentes del sensor (a). Los números dentro de la escala de pseudocolor indican los niveles digitales de gris mínimo y máximo para cada mapa. (c) Perfil de intensidad del Brillo a lo largo de una línea que atraviesa cuatro píxeles de variación alta (indicados por flechas blancas en el mapa de la esquina inferior derecha del panel b) para cada una de las nueve condiciones (b). (d) Distribución de los niveles digitales de gris del mapa del Brillo de la simulación de 20-meros contaminada con ruido correspondiente a una zona de alta variabilidad relativa. El valor promedio esperado y el promedio de la distribución están indicados por la flecha negra y la línea roja punteada, respectivamente). Parámetros de simulaciones: 500 imágenes de 64 píxeles a 100 cps, 4096 partículas simuladas (Número = 1).

8.2 LA MITIGACIÓN DE RUIDO MEJORA EL ANÁLISIS A NIVEL DE PÍXEL DE NÚMERO Y BRILLO EN IMÁGENES sCMOS

Se evaluó el efecto de la mitigación de ruido de fondo sCMOS simulado sobre el análisis de Número y Brillo. Se utilizó ACsN, un algoritmo de corrección de imágenes sCMOS que considera las propiedades de cada píxel y del sistema óptico para eliminar aquellas frecuencias espaciales ajenas a la señal de fluorescencia y mitigar el efecto de la variación local ([Sección 2.2.2](#)).

8.2.1 La corrección de ruido elimina la variación local y preserva la información de las fluctuaciones asociada a la dinámica molecular en las simulaciones

La operación de ACsN radica en el filtrado de las frecuencias espaciales que se encuentran fuera de la función de transferencia óptica del sistema ([Anexo A-e](#)), que se calcula con base en la longitud de onda de la luz que entra al microscopio y la apertura numérica del objetivo. Dado que el estudio de esta sección parte de datos sintéticos, estos fueron simulados en un sistema limitado por difracción y con ruido sCMOS, utilizando las propiedades ópticas del microscopio Nanoimager del LNMA. Para poder operar con la interfaz de ACsN, se simuló una apertura numérica de 1.49, longitud de onda de 500 nm y un tamaño de píxel de la imagen digital de 117 nm. Para simular el ruido sCMOS en las imágenes, se recortaron dos porciones específicas de los mapas de calibración del detector de 64x64 píxeles cada una (esquemáticas en la figura 23-a). Estas mismas regiones fueron introducidas a ACsN para el proceso de corrección del ruido previamente simulado.

En la figura 24-a, se ilustran dos ejemplos de simulaciones de oligómeros en difusión y se comparan sus respectivos mapas de Brillo antes y después de la corrección del ruido (filas central e inferior, respectivamente). Los mapas originados a partir de los experimentos corregidos guardan similitud con los mapas originados de los datos sin ruido de fondo; esto sugiere la capacidad de ACsN de mitigar las variaciones locales (evidenciado por la desaparición de los *hotspots*, indicados con flechas blancas) a través del uso de las mismas propiedades usadas para simular el ruido, con precisión de píxel único. Además, al filtrar las frecuencias espaciales asociadas al fondo y preservar aquellas asociadas a la señal de las partículas (delimitadas por los parámetros ópticos), el algoritmo de corrección mantuvo íntegra la información espacio-temporal (entropía) que da origen a las fluctuaciones que describen el proceso molecular. Esto último es respaldado al analizar el valor medio de todos píxeles de los mapas de Brillo provenientes de los datos ideales (ψ) y los corregidos (*), los cuales son próximos (ilustrados en la figura 24 en las barras de pseudocolor en cada mapa del panel **a**, las líneas rojas horizontales del panel **b** y las líneas punteadas verticales del panel **c**).

El perfil del Brillo, cuya trayectoria atraviesa cuatro *hotspots*, evidencia el efecto que estos poseen sobre la cuantificación; los perfiles de los mapas de Brillo ideales y corregidos (ilustrados con líneas con círculos) exhiben una uniformidad en la información de los píxeles alrededor del valor esperado de los datos ideales (5 y 10) y los datos corregidos (4.7 y 9.4). La ligera subestimación del Brillo posterior a la corrección se debe posiblemente a una disminución en la entropía de las imágenes, dada por la sensibilidad de ACsN a la señal y su capacidad de discernir entre esta y el fondo.

En el panel **c** de la figura 24 se muestran las distribuciones de los niveles digitales de gris de los mapas de Brillo, para cada imagen del panel **a**. Las distribuciones de los datos corregidos (azul) se aproximan a la geometría, proporción y posición de los datos ideales (rojo), señalando la capacidad de cuantificar el Brillo de manera fiel posterior a un procesamiento con ACsN. Por otro lado, las distribuciones de los mapas provenientes de datos con ruido exhiben una porción de píxeles cuyo valor de Brillo es subestimado (próximo a cero) y otra porción de píxeles ubicados en valores muy lejanos a los esperados (no mostrado en las gráficas), correspondientes a los *hotspots*.

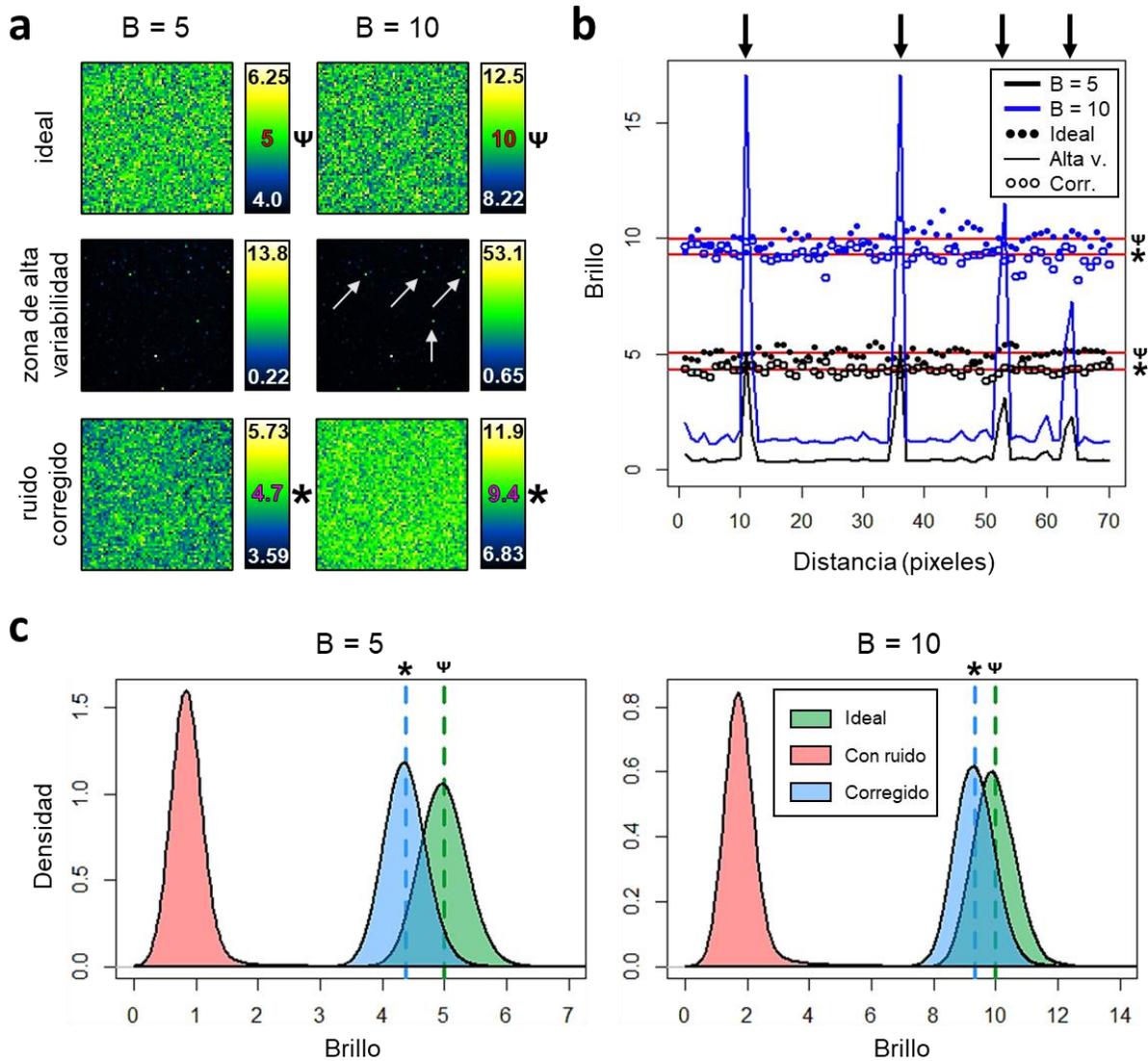


Figura 24. Efecto de ACsN sobre la cuantificación del Brillo.

(a) Mapas del Brillo obtenidos a partir de simulaciones de pentámeros (izquierda) y decámeros (derecha) difundiéndose a concentración constante en un sistema ideal, antes y después del procesamiento con ACsN. Los números dentro de la escala de pseudocolor indican los niveles digitales de gris mínimo y máximo para cada mapa. (b) Perfil de intensidad del Brillo a lo largo de una línea que atraviesa cuatro *hotspots* (indicados por flechas blancas en la imagen central derecha del panel a) para cada una de las seis condiciones. Las líneas horizontales rojas indican el valor medio del perfil trazado en los mapas de Brillo ideales y corregidos. (c) Distribución de los niveles digitales de gris de los mapas del Brillo de las simulaciones de pentámeros y decámeros en condiciones ideales (verde), antes (rojo) y después (azul) de procesar con ACsN. Las líneas verticales punteadas indican el valor medio de las distribuciones. Parámetros de simulaciones: 500 imágenes de 64 píxeles a 100 cps, 4096 partículas simuladas (Número = 1).

8.2.2 Evaluación del desempeño de ACsN en imágenes de un experimento *in vitro*

Los resultados preliminares reportados hasta este punto sugieren que la mitigación del ruido mediante el algoritmo ACsN elimina el efecto de los *hotspots* mientras preserva la entropía que da lugar a la estadística necesaria para cuantificar la abundancia y el estado estequiométrico. Si bien todos los estudios presentados hasta ahora han sido realizados sobre simulaciones, los resultados sugieren que este procesamiento de las imágenes podría ejercer los mismos efectos positivos en datos experimentales, siempre y cuando se conozcan los parámetros ópticos del microscopio y un estimado de las propiedades electrónicas del detector utilizados para la adquisición de dichas imágenes.

Se utilizaron imágenes de espermatozoides de ratón *ex vivo*, marcados fluorescentemente con la sonda *SiR-actin*, una molécula fluorogénica altamente afín a los monómeros de F-actina, las unidades estructurales de los filamentos de actina y elemento importante del citoesqueleto (Melak *et al*, 2017). En estos experimentos se investigó el efecto de la inducción de la reacción acrosomal, mediante la aplicación de progesterona, sobre la redistribución y reestructuración de los filamentos de actina en el flagelo de células vivas. La polimerización de los filamentos de actina, así como la formación de filamentos intermedios, microtúbulos y otros procesos celulares, involucra la interacción y agrupación de diversas especies moleculares hasta formar polímeros. Este tipo de procesos, que impactan en el brillo molecular, la distribución y movilidad de dichos complejos macromoleculares, pueden ser cuantificados mediante el Número y Brillo.

En esta sección se presenta un ejemplo del procesamiento con ACsN de datos experimentales y su análisis de Número y Brillo.

8.2.2.1 ACsN incrementa el contraste y SNR de las imágenes

En la figura 25 se muestra un experimento representativo de un espermatozoide vivo de ratón, adherido a una placa de cristal con concanavalina-A; las imágenes poseen una dimensión de 684 x 428 píxeles. Los paneles **a** y **b** muestran una de las imágenes antes y después del procesamiento con ACsN, respectivamente. Se realizaron acercamientos de dos regiones donde la célula estaba presente. De manera cualitativa, ruido en los bordes del flagelo y la cabeza fue mitigado, manteniendo la estructura original de la célula y las proporciones de intensidad de la señal en cada región. Además, en los acercamientos posteriores a la corrección, se observa el fondo más homogéneo.

En los paneles **c** y **d** se muestran las distribuciones de intensidad de la célula y el fondo, respectivamente, antes y después del procesamiento. La imagen procesada posee valores de fondo

mínimo y máximo más cercanos uno del otro, a comparación de la no procesada que abarca un rango más amplio, consecuencia directa de la presencia de *hotspots*. ACsN ejerce una aparente reducción y homogeneización del fondo, aumentando así el contraste de las imágenes y la SNR.

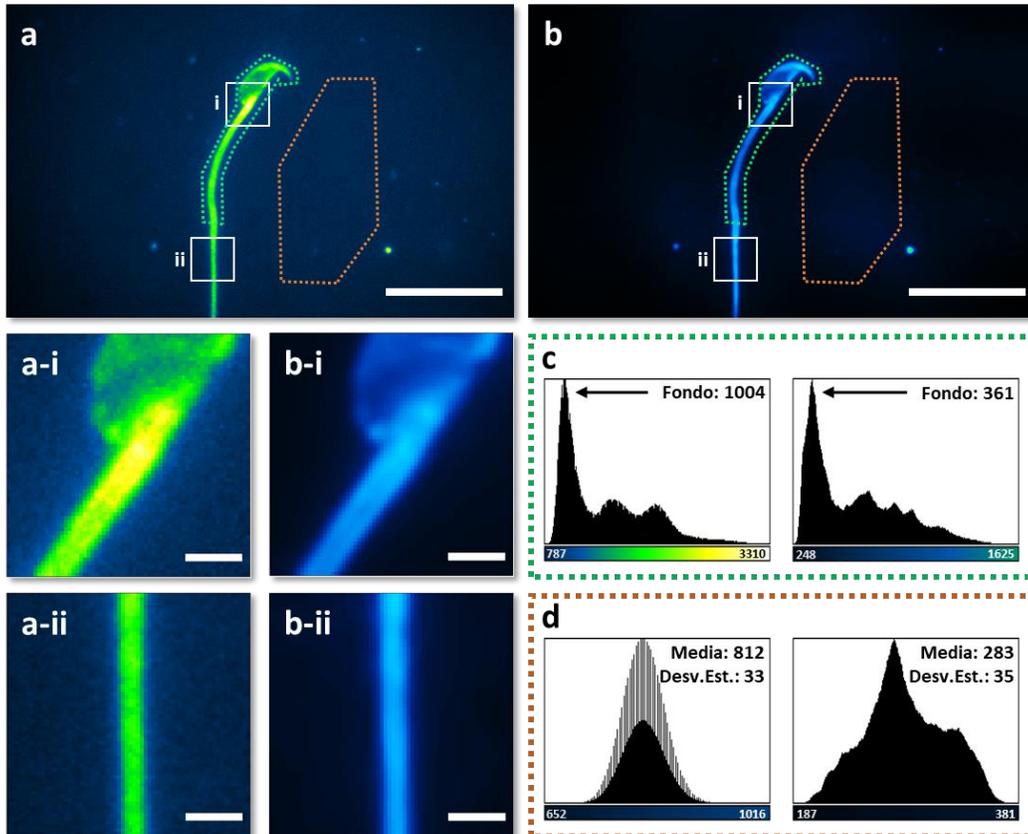


Figura 25. Efecto del procesamiento con ACsN en datos experimentales.

Imagen de un experimento de una célula viva previa (a) y posterior (b) a la corrección de ruido. Los paneles de la esquina inferior izquierda corresponden a los agrandamientos indicados por los recuadros blancos en a y b. Histogramas de la distribución de intensidad en la región correspondiente a un fragmento del flagelo y la cabeza del espermatozoide (c) y una región correspondiente al fondo (d), delimitadas por las líneas verde y anaranjada punteadas, respectivamente, tanto para las imágenes corregidas y sin corregir. Barras de escala de los paneles a y b: 10 μm . Barras de escala de los agrandamientos: 1 μm .

8.2.2.2 La corrección de ruido aumenta la resolución del Brillo y permite hacer análisis espacio-temporal

El experimento mostrado en la figura 26 consiste en la captura de 100 imágenes cada 30 segundos a una tasa de 100 cps, durante 20 minutos (40 videos de 100 cuadros en total), con el fin de observar la evolución de la dinámica de los filamentos de actina en esa escala temporal, antes y después de la inducción de la reacción acrosomal. A partir de esos cuarenta videos se obtuvo un video de cuarenta mapas del Brillo, cada uno separado 30 segundos del otro, con el propósito de detectar cambios en la dinámica de polimerización de la actina a lo largo del experimento. Adicionalmente, siguiendo la misma metodología, se generó un video de la intensidad de fluorescencia promedio para evaluar una posible correlación entre la polimerización de los filamentos y la redistribución de actina.

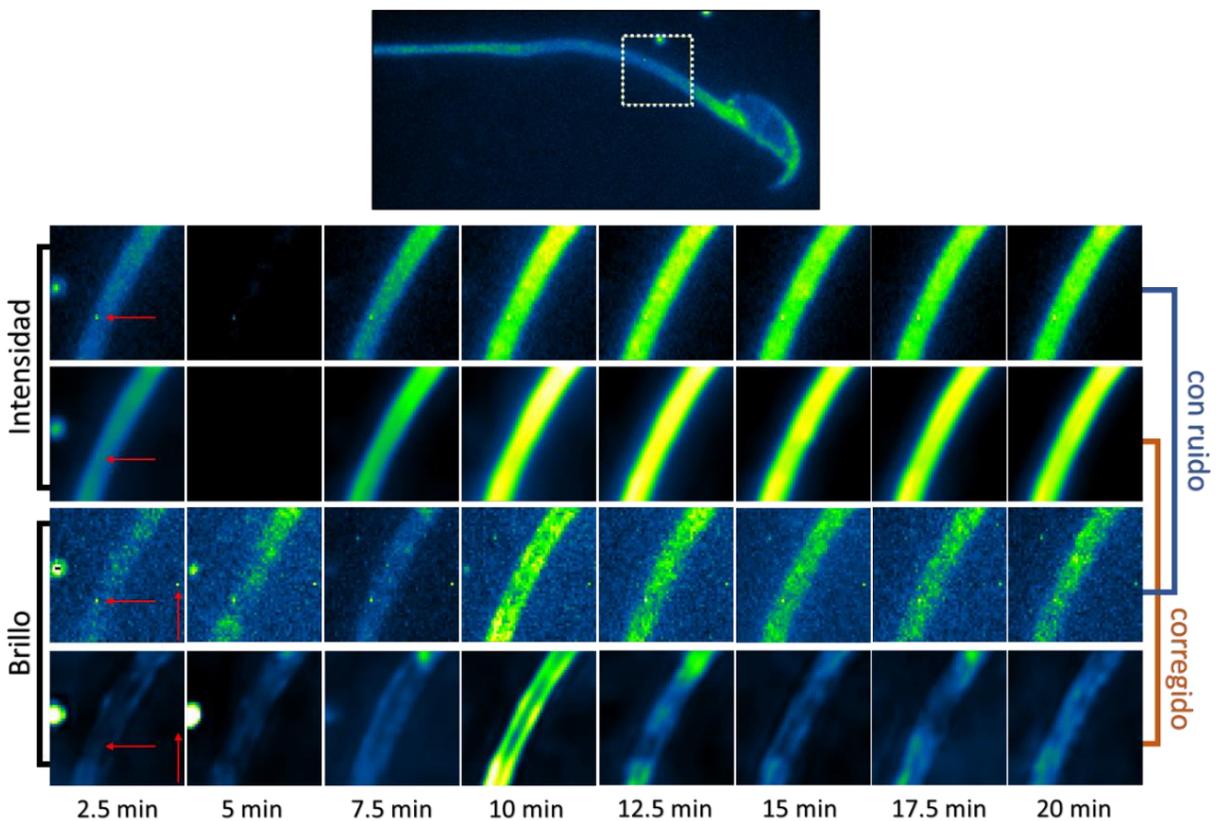


Figura 26. Análisis cualitativo de la evolución espacio-temporal del Brillo en una porción del flagelo, previo y posterior al procesamiento de las imágenes con ACsN.

Agrandamientos de una porción del flagelo de una célula representativa antes y después del procesamiento. Las flechas rojas indican la posición de *hotspots* presentes en las imágenes previas a la corrección. Parámetros de corrección de ruido: apertura numérica 1.49, longitud de onda 674 nm y tamaño de píxel 117 nm.

ACsN eliminó los *hotspots* presentes en las imágenes (indicados por las flechas rojas en la primera columna de la figura 26), uno de los cuales se hallaba dentro del flagelo, que es la región de interés de estudio. El ejemplo mostrado en la figura 26 sugiere que la compensación de los efectos de estos píxeles reduce los posibles sesgos introducidos al analizar regiones específicas de la imagen. Hacen falta más pruebas en sistemas *in vitro* controlados que permitan derivar esta hipótesis a otros sistemas biológicos.

Interesantemente, el aumento de contraste entre la señal y el fondo, así como la homogeneización de este último, provistos por ACsN, tuvieron como consecuencia un aparente incremento en la resolución de los mapas del Brillo (al comparar las imágenes de la tercera y cuarta fila de la figura 26). Este efecto adjunto reveló la estructura helicoidal intrínseca de los filamentos de actina y su posición a las orillas del flagelo (Gervasi *et al*, 2018). Esto podría permitir extender las conclusiones del análisis a contextos espaciales más particulares.

La figura 27 ofrece una comparación cualitativa del efecto del procesamiento con ACsN sobre el análisis del Brillo de los datos. Los paneles **a**, **b** y **c** esquematizan la porción del experimento utilizada para la comparación de los resultados, tanto para los perfiles de intensidad media como para los del Brillo, antes y después del procesamiento. En el panel **d** se ilustra la evolución de los perfiles de intensidad y del Brillo (fila superior e inferior, respectivamente) a través del tiempo del experimento, descritos por las líneas blancas punteadas en los paneles **b** y **c**. La corrección del ruido no ejerció efecto notorio sobre los perfiles de la intensidad promedio a través del tiempo, y preservó la geometría de las distribuciones normalizadas (fila superior del panel **d**), lo que sugiere que la estructura de la información molecular, proveniente de los datos originales, no fue alterada. Por otro lado, los perfiles del Brillo guardan similitud temporal con aquellos obtenidos de los datos originales.

Estas observaciones sugieren que la mitigación del ruido mediante ACsN en datos experimentales incrementa el contraste y la resolución del análisis del Brillo, lo que podría reducir sesgos y mejorar el análisis sin comprometer la integridad de la información de la señal.

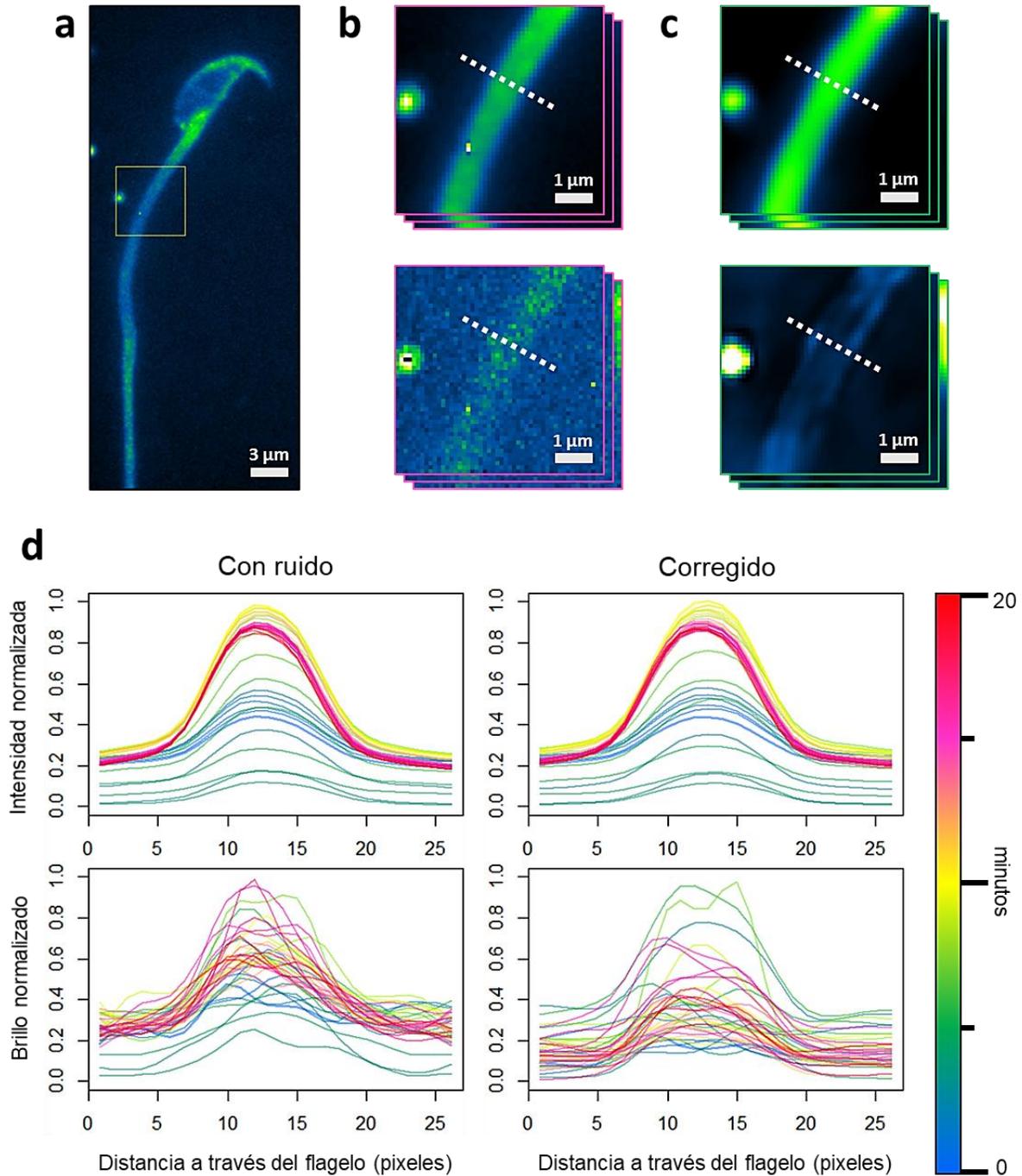


Figura 27. Análisis de la evolución temporal del perfil de la intensidad de fluorescencia y el Brillo a través de flagelo, previo y posterior al procesamiento con ACsN.

(a) Agrandamientos de una porción del flagelo de una célula representativa antes (b) y después (c) del procesamiento. (d) Perfiles de intensidad (superior) y Brillo (inferior) normalizados antes (izquierda) y después (derecha) de la corrección, descritos por las líneas blancas punteadas en b y c. Parámetros de corrección de ruido: apertura numérica 1.49, longitud de onda 674 nm y tamaño de píxel 117 nm.

9. DISCUSIÓN

Desde su introducción, la técnica de Número y Brillo ha abierto la posibilidad de estudiar la dinámica de agregación/desagregación de moléculas fluorescentes, brindando información del estado de oligomerización a nivel de píxel. La capacidad de detectar y cuantificar la interacción entre moléculas y/o proteínas con buena resolución espacial y temporal *in vitro* es crucial en el campo de la biología. Nolan y col. proponen, posiblemente con base en los trabajos (Dalal *et al*, 2008; Digman *et al*, 2008), rangos empíricos de la cantidad total de imágenes óptima para un estudio de Número y Brillo, de entre 20 y 1000 imágenes. Sin embargo, los autores no proveen literatura o evidencia experimental que soporten estas conclusiones. Particularmente, Digman y col. reportan en 2008 que las distribuciones del Número y el Brillo obtenidas a partir de imágenes sintéticas no varían significativamente al analizar desde 10 hasta 400 imágenes, pero los datos que sustentan estas afirmaciones son arbitrarios. Los resultados reportados en las [Secciones 8.1.1](#), [8.1.2](#) y el [Anexo B-a](#) de esta tesis concuerdan con los regímenes experimentales empíricos previamente empleados por otros autores, indicando la relación entre el número de imágenes (y otros parámetros instrumentales) y la precisión de la detección de la abundancia y estado estequiométrico moleculares. Se ha reportado que el error en la determinación del Número y el Brillo disminuye con la raíz cuadrada del número de imágenes y, por lo tanto, entre más imágenes se analicen mayor será la precisión de la cuantificación del Brillo (Digman *et al*, 2008). Sin embargo, en el presente trabajo se halló, adicionalmente, que si bien el Brillo se vuelve más preciso mientras más imágenes se integren al análisis ([figura A5](#)), una cantidad excesiva de estas provoca una subestimación del Número ([figura A4](#)). Esto sugiere la existencia de un rango de imágenes óptimo con cotas definidas; se recomienda cautela. Adicionalmente, Nolan y col. reportan una relación estrecha entre la velocidad de adquisición del sistema óptico, el coeficiente de difusión de las entidades moleculares y el tiempo de permanencia de estas en cada píxel (Nolan *et al*, 2018). Los resultados de la [Sección 8.1.2.1](#) soportan dicha relación.

Al igual que otras ramas de FFS, tal como FCS, la técnica de Número y Brillo es más sensible en regímenes de baja concentración (nM a μ M), ya que su funcionamiento se basa en cuantificar la información asociada a la amplitud de las fluctuaciones de la señal de fluorescencia originadas a partir del movimiento de partículas a través del volumen de observación. La permanencia de éstas en dicho espacio está gobernada por estadística de Poisson, dado que la presencia o ausencia de una entidad molecular en un determinado espacio e intervalo de tiempo es un evento discreto. Cuando las partículas en el medio son demasiadas, dicho fenómeno puede aproximarse mediante una distribución de

probabilidad Normal, donde la varianza es igual al valor medio, mismo que está asociado a la concentración molecular. En otras palabras, cuando la concentración es demasiado elevada, se atenúa la información asociada al movimiento molecular y, por ende, la capacidad de medir abundancia y estequiometría con base en las fluctuaciones. Por el contrario, muy pocas partículas pueden no satisfacer el muestreo estadístico necesario para describirlas, escenario en el cual la varianza asociada a las fluctuaciones tiende a cero. Hasta la fecha, no se ha propuesto un estudio formal que establezca un rango de concentración óptimo al cuál la técnica de N&B es sensible (Kitamura & Kinjo, 2018). Dicho rango cambia en función del coeficiente de difusión de la población de partículas en cuestión, cuya permanencia en el volumen de observación depende directamente de la velocidad a la que se mueven. Esto significa que existe un rango de concentración óptimo, cuantificable mediante N&B, para cada posible coeficiente de difusión. En la [Sección 8.1.2.2](#) se evaluó numéricamente este rango para el caso de una molécula con coeficiente de difusión de $25 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Si bien en la [Sección 8.1.2.1](#) se reporta el efecto de distintos coeficientes de difusión (0.01 hasta $500 \mu\text{m}^2/\text{s}$) sobre la cuantificación del Número y el Brillo, es necesario, adicionalmente, realizar un estudio que determine el rango de concentración apropiado ([figura 17](#)) para cada uno de los coeficientes de difusión evaluados en la [figura 16](#). Esto proveería, por primera vez, un criterio más amplio sobre la sensibilidad de N&B ante la concentración molecular en función de la velocidad a la que las partículas difunden.

Recientemente se ha mostrado mayor interés por examinar la evolución del estado estequiométrico no sólo en el espacio, sino también en el tiempo (Nolan *et al*, 2017; Nolan *et al*, 2018; Cutrale *et al*, 2019; Pinto-Cámara *et al*, 2021). En 2019, Cutrale y col. propusieron un método que denominaron *Enhanced Number and Brightness* (eN&B), enfocado en cuantificar la presencia de múltiples especies estequiométricas distribuidas de manera heterogénea en el tiempo y en el espacio; una aproximación similar había sido reportada por (Hinde *et al*, 2017) e implementada en R en (Pinto-Cámara *et al*, 2021). Basado en el análisis consecutivo de subconjuntos de imágenes de un experimento global, eN&B está intrínsecamente limitado por la resolución temporal del detector. La capacidad de utilizar detectores sCMOS como herramienta de imagenología para este tipo de análisis, promete la posibilidad de describir eventos dinámicos en el orden de microsegundos. Además, el uso de detectores sCMOS de última generación, cuya eficiencia cuántica puede alcanzar hasta el 95% (ejemplos: <https://andor.oxinst.com/products/scmos-camera-series/sona-scmos>; <https://www.photometrics.com/products/prime-family/prime95b>), permitiría disminuir los tiempos de exposición y potencia del láser de excitación necesarios para adquirir imágenes con un buen presupuesto de fotones, reduciendo drásticamente los efectos de fotoblanqueo y fototoxicidad. Se han reportado herramientas para mitigar estos y otros efectos (Nolan

et al, 2017; Pinto-Cámara *et al*, 2021). Con base en los resultados de la [Sección 8.2](#) de esta tesis, se sugiere una mejoría en estudios de Número y Brillo en imágenes sCMOS corregidas, permitiendo extender la definición del método a estudios espaciotemporales (eN&B) e incluso estudios multiparamétricos en las escalas nanoscópicas (Sankaran *et al*, 2021).

Adicionalmente, Cutrale y col. elaboraron una guía detallada de cómo llevar a cabo, paso a paso, un experimento típico de microscopía de fluorescencia, con el propósito de generar imágenes con calidad excepcional para experimentos de Número y Brillo espacio-temporales. Los autores exponen con lujo de detalle todas las precauciones experimentales a considerar, desde la calibración del sistema óptico y la preparación de la muestra biológica, hasta la configuración instrumental y el análisis de los datos. Una guía de naturaleza similar, enfocada a la FFS en general, había sido publicada por (Youker & Teng, 2014). Como premisa para los ejemplos sintéticos utilizados como prueba de concepto de eN&B, argumentan que no existe un reporte formal del rango óptimo de oligómeros con su método (o el método de N&B *per se*). Trabajos previos sugieren un rango óptimo de detección desde el monómero hasta el 40-mero, con estimaciones matemáticas que sugieren una extensión hasta los 100-meros (Ojosnegros *et al*, 2017). Si bien hace falta un cuidadoso estudio que establezca este rango *in vitro*, los resultados preliminares reportados en las [Secciones 8.1.2.2](#), [8.1.4](#) y [8.1.5](#) de esta tesis sugieren que no existe un límite de detección del grado oligomérico, siempre y cuando la cantidad de entidades moleculares en la imagen provea la suficiente descripción estadística del fenómeno difusivo.

La guía experimental propuesta por Cutrale y col. representa un excelente avance hacia el profundo entendimiento e integración del conocimiento de la microscopía de fluorescencia; sin duda, su publicación beneficiará enormemente a la comunidad de la imagenología biológica y la academia. Por otro lado, el aporte de estos autores surge a partir de sistemas de escaneo láser y/o sistemas digitales basados en detectores EMCCD únicamente, lo que limita los alcances de sus contribuciones a la arquitectura de estas tecnologías. En este contexto, el presente trabajo sirve como una aproximación numérica para explorar la tendencia del comportamiento de la técnica de Número y Brillo con y sin presencia de ruido en las imágenes similar al de un detector digital.

Con la llegada de algoritmos de corrección automática de ruido sCMOS, tales como NCS y ACsN, se amplió la gama de aplicaciones de microscopía de fluorescencia compatibles con el uso de estos detectores. Se ha establecido la capacidad de estos algoritmos de corregir el ruido con el fin de mejorar la calidad de reconstrucciones de microscopía de súper-resolución y de experimentos de rastreo de molécula única (Lin *et al*, 2017; Mandracchia *et al*, 2020). Múltiples esfuerzos para caracterizar

completamente las cámaras sCMOS y corregir de manera eficaz el ruido independiente entre píxeles que estos dispositivos introducen a las imágenes han sido realizados (Luisier *et al*, 2010; Huang *et al*, 2013; Liu *et al*, 2017; Lin *et al*, 2017; Mandracchia *et al*, 2020; Zhang *et al*, 2021; Diekmann *et al*, 2021 - *preprint*). Originalmente, Luisier y col. propusieron una metodología general para corregir imágenes contaminadas por ruido de Poisson-Gauss. Más recientemente, Zhang y col. analizaron y caracterizaron de manera sistemática los distintos tipos de ruido y evaluaron el desempeño de tres algoritmos de corrección para la mejoría de imágenes de microscopía convencional y de microscopía de localización de molécula única. Dichas contribuciones nos acercan a un entendimiento cada vez más profundo de la naturaleza, gracias al uso de estos dispositivos y de las metodologías emergentes.

Interesantemente, el procesamiento con ACsN y posterior aplicación del análisis de varianza (Brillo) en datos experimentales de espermatozoides de ratón ([Sección 8.2.2.2](#)) introdujeron un incremento aparente en la resolución espacial de las imágenes, revelando la estructura intrínseca de los filamentos de actina en la pieza media del flagelo (Gervasi *et al*, 2018). Esto sugiere una posible aproximación para alcanzar super-resolución basada en (i) el filtrado de las frecuencias espaciales y artefactos asociados al ruido digital y (ii) un posterior análisis del coeficiente de variación de cada píxel, resaltando los componentes estructurales con base la entropía (varianza) de los emisores fluorescentes.

En 2021, Sankaran y col. propusieron una nueva estrategia metodológica para eliminar la mutua exclusividad entre la microscopía de super-resolución y la espectroscopía de fluctuación de la fluorescencia. Su método, denominado *Super-resolución Espacio-temporal y Microscopía de Fluorescencia Multi-paramétrica Simultáneas* propone la introducción de un análisis correlativo dinámica-estructura, con el propósito de incrementar la fidelidad de las reconstrucciones a partir de la información provista por el análisis de FCS y FFS (tal como coeficiente de difusión, estequiometría, densidad molecular, etc. a nivel de píxel único). En su trabajo, Sankaran y col. recurrieron aun al uso de un detector EMCCD para experimentos de FCS y FFS dado su buen desempeño en condiciones de poca disponibilidad de fotones y mayor consistencia estadística en general, mientras que reservaron los estudios de super-resolución para el detector sCMOS. En el mismo año, Paul y col. introdujeron también un nuevo método derivado de la teoría de Número y Brillo, *Número y Brillo Dependiente de Concentración* (cdN&B) (Paul *et al*, 2021). Implementado en un sistema de escaneo confocal, cdN&B propone la descripción de la termodinámica de proteínas de la membrana en asociación con sus componentes, utilizando la transfección transitoria como medio para medir el tamaño del oligómero en función de la concentración de su receptor.

Desde el origen del Número y Brillo en 2008 (o de la FFS misma) hasta la fecha actual, los detectores sCMOS han sido considerados como una alternativa atractiva para dar el salto hacia una nueva era de imagenología de alta resolución, superando el desempeño de las cámaras EMCCD e incluso de los sistemas de escaneo confocal. El desarrollo de nuevas metodologías basadas en la teoría original del histograma del conteo de fotones (Chen *et al*, 1999) y FCS no se detiene ante las limitantes tecnológicas, lo que incrementa el contraste entre la era de detectores actuales y la llegada de una nueva generación de cámaras digitales de grado científico. La barrera que impide aún la total difusión de la tecnología sCMOS a todas las áreas y rincones de la microscopía óptica, es cada vez más difusa gracias a los múltiples esfuerzos acumulados a lo largo de la última década. Sin embargo, existen aún retos metodológicos, tecnológicos y teóricos por superar antes de la llegada del día en que estos dispositivos desplacen a las cámaras EMCCD y se conviertan en el nuevo “estándar de oro” de la microscopía de óptica y la imagenología biológica.

10. CONCLUSIONES

- ✓ Se propuso un espacio de parámetros experimentales dentro del cual la técnica de Número y Brillo es más sensible y permite cuantificaciones más confiables, con base en la estadística de las partículas analizadas y la definición misma de N&B. La resolución espacial de las imágenes analizadas juega un papel importante en la precisión del análisis.
- ✓ La mitigación del ruido en imágenes sCMOS simuladas sugiere que es posible realizar estudios de N&B con estas cámaras. El algoritmo ACsN mitiga las variaciones locales del ruido y permite un análisis más preciso y a nivel de píxel, sin embargo, aún faltan pruebas que confirmen estas observaciones en sistemas experimentales *in vitro*.
- ✓ Es posible cuantificar, mediante Número y Brillo, abundancia y estequiometría moleculares en imágenes con ruido de fondo (EMCCD y sCMOS) siempre y cuando la cantidad de partículas sean suficientes y se deriven conclusiones globales, no locales (en el contexto de una imagen digital).

11. PERSPECTIVAS

Diseñar e implementar un sistema biológico experimental donde pueda inducirse un cambio en la distribución y estequiometría de proteínas fluorescentes en células vivas, con el fin de cuantificarlo mediante Número y Brillo y validar este análisis con el uso de cámaras sCMOS. Al tratarse de un modelo biológico, podrá establecerse la capacidad de la FFS de cuantificar estos procesos *in vitro*.

Implementar el análisis del Número y Brillo, en conjunto con el uso de detectores sCMOS, para el estudio de la evolución espacio-temporal de la dinámica de polimerización de eventos celulares rápidos (i.e. con resolución de milisegundos). En 2019, Cutrale y col. propusieron una aproximación para visualizar los cambios en la estequiometría de oligómeros en función del tiempo, limitada únicamente por la resolución temporal de las imágenes adquiridas (Cutrale *et al*, 2019). La implementación de N&B en sCMOS permitirá estudiar, mediante esta aproximación, dinámicas de oligomerización con resoluciones temporales más altas.

Otras técnicas de análisis derivadas de la FFS, cuyo desempeño también se ve beneficiado por el aumento en la resolución temporal, son aquellas que correlacionan la señal en el tiempo, tales como *iMSD* y *STICS* ([Sección 1.2.1](#)). Describir el comportamiento y límites teóricos de estos métodos y comprobar su aplicabilidad en detectores sCMOS supondría la posibilidad de describir fenómenos biofísicos más allá de la abundancia y la estequiometría, tales como interacción y flujo molecular, difusión anómala, microscopía correlativa en 3D, entre otros.

ANEXOS

A. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA

a. *Movimiento Browniano*

El movimiento Browniano es un proceso estocástico que describe las trayectorias aleatorias del movimiento de partículas suspendidas en un medio, como consecuencia de las interacciones termodinámicas entre las partículas y su medio, las colisiones entre estas e impulsado por fluctuaciones térmicas en el sistema (Karatzas & Shreve, 1998).

Descrito por primera vez por el botánico escocés Robert Brown (Brown, 1828), el movimiento Browniano sigue la naturaleza de un proceso de Wiener, ya que está compuesto por valores reales de incrementos independientes y es continuo en el tiempo (Van Kampen, 1982).

Para modelar las caminatas aleatorias, características del movimiento Browniano, partamos de la ecuación de calor:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = \alpha \left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \right) \quad [A1]$$

que describe la tasa de cambio de la temperatura en un material sólido homogéneo en 3 dimensiones (x, y & z). Utilizando el operador de Laplace ∇^2 , que generaliza la segunda derivada, la ecuación A1 puede ser reescrita como:

$$\dot{u} = \alpha \nabla^2 u \quad [A2]$$

Donde u es la temperatura en función del espacio y el tiempo, $\nabla^2 u$ es su segunda derivada y \dot{u} es la derivada de u con respecto al tiempo. El coeficiente α es la difusividad térmica, una propiedad específica que depende de la conductividad térmica, la densidad másica y la capacidad calorífica específica del material a través del cuál de va a propagarse el calor.

Desarrollada y escrita originalmente por Joseph Fourier en 1822 (baron Fourier, 1822), la ecuación diferencial A2 describe, de manera general, cómo la distribución de energía o de alguna sustancia evoluciona en el tiempo a través de un determinado medio. Dicho cambio en la distribución es generalmente impulsado por un gradiente, como temperatura, concentración o voltaje (i.e. un gradiente de potencial).

En teoría probabilística, la ecuación de calor está conectada con el estudio de las caminatas aleatorias a través de la ecuación de Fokker-Planck, que es una ecuación diferencial que describe la evolución de una

función de densidad de probabilidad de la velocidad de una partícula bajo la influencia de fuerzas de arrastre y fuerzas aleatorias, tal como ocurre en el movimiento Browniano (Bonder, 2015). El resultado de esta relación es la ecuación de difusión:

$$\frac{\partial \varphi}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2} \quad [\text{A3}]$$

Descrita originalmente por Adolf Fick en 1855 (Fick, 1855), esta última ecuación corresponde a la 2ª Ley de Fick, que predice cómo el proceso difusivo impacta en el cambio de concentración con respecto al tiempo en una dimensión. Para el caso de la difusión en dos o más dimensiones, debe utilizarse el operador de Laplace ∇^2 y la ecuación A3 puede ser reescrita como:

$$\dot{\varphi} = D \nabla^2 \varphi \quad [\text{A4}]$$

que es idéntica a la ecuación A2, pero cambiando temperatura y difusividad térmica por concentración y el coeficiente de difusión, respectivamente. En la ecuación A4, φ es la concentración de una sustancia con respecto al espacio y el tiempo, $\dot{\varphi}$ describe la tasa de cambio de la concentración en función del tiempo y $\nabla^2 \varphi$ es la segunda derivada. En este caso D es el coeficiente de difusión, cuyo valor es constante e indica la magnitud del desplazamiento de las partículas por unidad de tiempo.

La solución fundamental de la 2ª Ley de Fick es la misma que la de la ecuación de calor, y es igual al kernel de calor K :

$$K(x, y, t) = \frac{1}{(4\pi t)^{d/2}} e^{-|x-y|^2/4t} \quad [\text{A5}]$$

Que es el kernel correspondiente al espacio euclidiano \mathbb{R}^d para d dimensiones espaciales y una dimensión temporal t . Así mismo, el kernel de calor posee la misma forma que la función de Green para la difusión:

$$\theta(t) = \left(\frac{1}{4\pi kt}\right)^{d/2} e^{-x^2/4kt} \quad [\text{A6}]$$

Al sustituir la función de Green en términos de la posición de las partículas y su coeficiente de difusión, se obtiene una distribución de probabilidad normal de la forma

$$\varphi(x, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right) \quad [\text{A7}]$$

Esta distribución está centrada en un valor medio $\mu = 0$ (no mostrada en la ecuación), lo que significa que las partículas tienen la misma probabilidad de desplazarse a la izquierda o a la derecha en

cualquiera de las dimensiones espaciales, y la magnitud de dicho desplazamiento está dictado por la varianza $\sigma^2 = 2Dt$. Esta ecuación describe la probabilidad $\varphi(x, t)$ de hallar una partícula a una distancia x y tiempo t determinados a partir de una posición inicial desde un punto inicial ($x=0, t=0$), mientras difunde con un coeficiente de difusión D dado.

Siguiendo este modelo, el desplazamiento cuadrado medio (MSD) de las partículas igual a la varianza de la distribución que describe su movimiento en cada paso, tal que

$$MSD = \sigma^2 = 2dDt \quad [A8]$$

Este es el principio fundamental detrás del análisis de iMSD, a partir del cual se puede obtener el coeficiente de difusión de una población de partículas con base en la evolución de la varianza de la distribución de probabilidad que describe su movimiento.

Con base en la teoría descrita en esta sección, se escribió un código en R útil para la simulación de caminatas aleatorias y con la capacidad de controlar a voluntad las diversas variables físicas y experimentales involucradas en el proceso ([Anexo D-a](#)).

b. Fundamentos del Número y Brillo en sistemas digitales de adquisición de imágenes

La idea detrás del enfoque del análisis de Número y Brillo es que, cuanto mayor sea el número de partículas presentes en la muestra, mayor será la intensidad media de la señal de fluorescencia a lo largo del tiempo. Además, cuanto más brillantes sean estas partículas, mayor será la magnitud de las fluctuaciones de fluorescencia alrededor del valor medio. Bajo este contexto, el número de moléculas es proporcional a la intensidad media, mientras que su brillo (a menudo traducido como estado de oligomerización) es proporcional a la varianza. Formalmente, el Número aparente (N) y el Brillo aparente (B) se definen como

$$N = \frac{\langle k \rangle^2}{\sigma^2} \quad B = \frac{\sigma^2}{\langle k \rangle} \quad [A9, A10]$$

Si bien la velocidad de adquisición de los datos no juega un papel crucial en esta técnica, si es lo suficientemente rápida, es posible estudiar la dinámica de agregación; también proporciona un medio para excluir el ruido de disparo. A pesar de que la resolución de diferentes especies oligoméricas dentro del mismo píxel está limitada por la resolución espacial del sistema óptico, se calcula el número de partículas promedio y el brillo para cada área del tamaño de píxel en la muestra.

Hasta ahora, se ha asumido que el único factor que contribuye a $\langle k_i \rangle$ y σ^2 es el tráfico molecular (es decir, las moléculas que entran y salen del volumen de observación). No obstante, se deben considerar otros factores instrumentales antes de proceder a un análisis cuantitativo (Digman *et al*, 2008). En teoría, la intensidad de la señal debería ser cero cuando no hay fotones presentes, sin embargo, este no suele ser el caso. El *offset*, que es una cantidad constante que depende de la configuración del detector, corresponde a la intensidad de señal promedio en todos los píxeles cuando la cámara no está expuesta a ninguna fuente de luz. Para obtener el valor medio real de la señal de intensidad de fluorescencia $\langle K \rangle$, es necesario restar el *offset* de los datos.

$$\langle K \rangle = \langle k \rangle - offset \quad [A11]$$

Además, se debe calcular el factor de proporcionalidad S , definido como relación entre el número de fotones recibidos y el número de electrones (señal) reportados por el detector (Dalal *et al*, 2008). El valor medio real de la intensidad de fluorescencia $\langle K \rangle$ es entonces el producto del número real de fluoróforos dentro del volumen de observación (n) y su brillo molecular real (ε), ambos ponderados por el factor de proporcionalidad S en

$$\langle K \rangle = S\varepsilon n \quad [A12]$$

Si combinamos las ecuaciones A11 y A12, obtenemos

$$\langle k \rangle = S\varepsilon n + offset \quad [A13]$$

Además, la varianza aparente σ^2 es el resultado de la suma de la varianza debida a las fluctuaciones de fluorescencia (σ_n^2) y la varianza debida al ruido del detector (σ_d^2), como en

$$\sigma^2 = \sigma_n^2 + \sigma_d^2 \quad [A14]$$

Mientras σ_n^2 depende del factor de proporcionalidad S , el número real (n) y el brillo real (ε) de las moléculas, σ_n^2 depende adicionalmente del ruido de lectura (σ_0^2) del detector

$$\sigma_n^2 = S^2 \varepsilon^2 n \quad [A15]$$

$$\sigma_d^2 = S^2 \varepsilon n + \sigma_0^2 \quad [A16]$$

Que, en términos de la varianza aparente σ^2 , puede expresarse como

$$\sigma^2 = S^2 \varepsilon^2 n + S^2 \varepsilon n + \sigma_0^2 \quad [A17]$$

Es entonces necesario conocer σ_0^2 , que puede obtenerse al calcular la varianza de la intensidad de la señal cuando el detector no está expuesto a ninguna fuente de luz. En conjunto, considerando estos ajustes instrumentales, las ecuaciones de Número y Brillo se pueden reescribir como

$$N = \frac{S\varepsilon n}{S\varepsilon + n} \quad B = S\varepsilon + S \quad [\text{A18, A19}]$$

$$N = \frac{\varepsilon n}{\varepsilon + 1} \quad B = S(\varepsilon + 1) \quad [\text{A20, A21}]$$

Nótese que, mientras n depende de ε , ε no depende de n . Después de las sustituciones correspondientes, las ecuaciones del Número y Brillo reales pueden expresarse en términos de los factores S , *offset* y σ_0^2 :

$$n = \frac{(\langle k \rangle - \text{offset})^2}{\sigma^2 - \sigma_0^2 - S(\langle k \rangle - \text{offset})} \quad \varepsilon = \frac{\sigma^2 - \sigma_0^2 - S(\langle k \rangle - \text{offset})}{S(\langle k \rangle - \text{offset})} \quad [\text{A22, A23}]$$

Para calcular el factor S , se puede medir la varianza del detector en ausencia de fluctuaciones de señal (es decir, adquiriendo una serie de tiempo mientras se expone el detector a una fuente de luz de intensidad constante). Considerando que $B = S(\varepsilon + 1)$, y que, en ausencia de fluoróforos, el brillo real ε es cero, el brillo aparente B se reduce al factor S :

$$B = S = \frac{\sigma^2 - \sigma_0^2}{\langle k \rangle - \text{offset}} \quad [\text{A24}]$$

Al aislar σ^2 , obtenemos una ecuación de la forma $y = mx + b$, donde la pendiente es el factor S y la intersección es σ_0^2 :

$$\sigma^2 = S(\langle k \rangle - \text{offset}) + \sigma_0^2 \quad [\text{A25}]$$

Ver el [Anexo D-f](#) para hallar la implementación del código utilizado para llevar a cabo los análisis de N&B.

c. Modelo de las propiedades electrónicas de una cámara EMCCD

Las cámaras CCD son dispositivos ampliamente utilizados en campos como la microscopía óptica, astronomía, espectroscopía e imagenología biomédica; también se encuentran presentes en muchos dispositivos de uso convencional como celulares y cámaras fotográficas. Por sus cualidades, tales como una alta relación señal-ruido (SNR) y buen desempeño en escenarios de baja luminosidad, por varias décadas han sido el estándar de oro en la academia.

Al adquirir imágenes, la escasez de luz ocasiona que la señal se vuelva cada vez más difícil de diferenciar del ruido del detector. Las cámaras EMCCD mitigan este problema al amplificar la señal de fotones mediante la aplicación de voltaje, sin embargo, a cambio de introducir fuentes adicionales de ruido a las imágenes.

Hirsch y col. desarrollaron en 2013 un modelo para entender a profundidad las propiedades del ruido en el proceso de adquisición de imágenes de una cámara EMCCD. Este modelo se basa en el principio de máxima verosimilitud, es decir, una estimación de la probabilidad de medir un valor particular para cada píxel de la imagen a partir de un determinado número de fotones que inciden en el detector. Para el desarrollo de este modelo, se consideró el trayecto que sigue la luz desde la entrada hasta la salida del dispositivo, haciendo un análisis minucioso del ruido presente en cada etapa (figura A1).

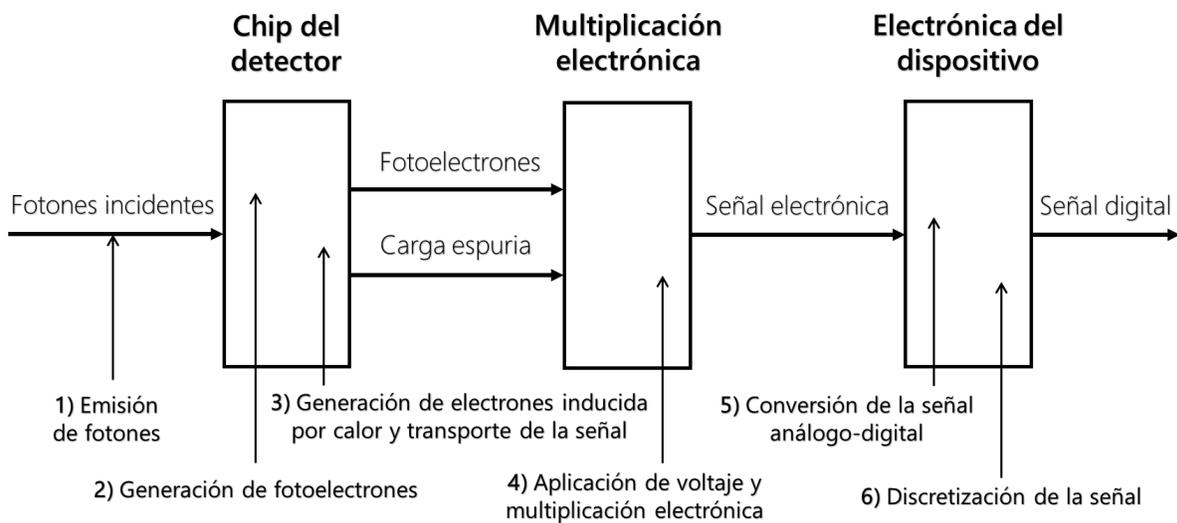


Figura A1. Esquema general del proceso de adquisición y conversión de señal en una cámara EMCCD y las distintas fuentes de ruido a lo largo del proceso.

Adaptado de Hirsch et al, 2013.

Además del ruido originado a partir del procesamiento de la señal, existen contribuciones sistemáticas del detector que introducen un sesgo adicional a la información de la imagen. Cuando se adquieren imágenes en oscuridad total (i.e., sin exposición del chip a ninguna fuente de luz), estas solo muestran la carga espuria y el ruido del dispositivo y no son del todo homogéneas. Adicionalmente, existe un valor

constante que es sumado electrónicamente a todos los píxeles de la imagen para evitar valores negativos en el resultado final. Este último es conocido como el *offset* del detector.

Si el número de fotones incidentes en un píxel del detector es \mathbf{i} , el número de cuentas medido en dicho píxel de la imagen es n_{ic} y Θ es el conjunto específico de parámetros del detector, esta función de densidad de probabilidad es

$$P(n_{ic}; \mathbf{i}, \Theta) \quad [\text{A26}]$$

Que es la función de máxima verosimilitud utilizada para el desarrollo del modelo, y cuyo objetivo es conocer la probabilidad de obtener n_{ic} conteos en cada píxel de la imagen final cuando luz de cierta intensidad incide en ellos. Para ello, se integrarán, a continuación, todas las fuentes de ruido presentes en el proceso de adquisición de la señal paso por paso.

Durante el proceso de adquisición de imágenes en una cámara EMCCD, existen diversas fuentes de ruido cuyo efecto se ve reflejado en el resultado final. La emisión de fotones de la muestra es descrita por una distribución de Poisson. Cuando la disponibilidad de fotones en un experimento es limitada, las variaciones de intensidad entre cada píxel son más evidentes y la incertidumbre de la detección de la luz aumenta; este es el ruido de Poisson. Mientras más fotones incidan en el detector, la magnitud de estas variaciones será cada vez menor. Es por esto por lo que, en la microscopía de fluorescencia, donde la luz proveniente de la muestra es limitada, el efecto de este ruido sobre las imágenes suele ser importante y debe tomarse en consideración. La probabilidad de que n_{ph} fotones incidan en el detector, descrita por una distribución de Poisson $P(\lambda)$ con media \mathbf{i} es

$$p(n_{ph}; \mathbf{i}) = P(n_{ph}; \lambda = \mathbf{i}) \quad [\text{A27}]$$

Cuando un fotón incide en el chip, es posible que este genere o no un fotoelectrón. Esta es la primera fuente de ruido y la probabilidad de tal evento es la eficiencia cuántica \mathbf{q} del detector, la cual depende de los materiales del dispositivo y de la longitud de onda de la luz. La probabilidad de obtener n_{pe} fotoelectrones a partir de n_{ph} fotones incidentes está dada por la distribución binomial

$$B(n_{pe}; n_{ph}, \mathbf{q}) \quad [\text{A28}]$$

y, por lo tanto, la probabilidad de obtener n_{pe} fotoelectrones a partir de una fuente de luz está dada por la combinación de los eventos mutuamente exclusivos de las probabilidades de las distribuciones A26 y A28, donde la media es el producto de la intensidad de la luz y la eficiencia cuántica.

$$p(n_{pe}; \mathbf{i}, \mathbf{q}) = \sum_{n_{ph}=0}^{\infty} P(n_{ph}; \mathbf{i}) B(n_{pe}; n_{ph}, \mathbf{q}) = P(n_{pe}; \mathbf{i}\mathbf{q}) \quad [\text{A29}]$$

Una vez generados los fotoelectrones, estos son transferidos a través del sistema mediante la aplicación y modulación de voltaje en los electrodos. Durante este proceso es posible que, debido a la corriente eléctrica, se generen electrones no deseados. Este fenómeno es conocido como carga espuria y es la segunda fuente de ruido. La carga espuria depende principalmente de dos factores importantes: a) la velocidad a la que la información de cada píxel es transferida hacia el registro de lectura (íntimamente relacionado con la velocidad de adquisición de la cámara y el tiempo de exposición) y b) el número de procesos de registro (i.e. la cantidad y de píxeles a procesar y, por lo tanto, el tamaño de las imágenes adquiridas). Adicionalmente, las fluctuaciones térmicas del sistema pueden generar también electrones no deseados; este efecto es conocido como corriente oscura. Sin embargo, estas fluctuaciones son normalmente mitigadas por la refrigeración del dispositivo, cuyo efecto puede, entonces, considerarse despreciable a temperaturas lo suficientemente bajas.

La emisión de la carga espuria es también gobernada por una distribución de Poisson, con una tasa de emisión \mathbf{c} . Un electrón que entra al registro de electro-multiplicación (EM) puede ser un fotoelectrón o puede provenir de la carga espuria. Por lo tanto, el número de electrones de entrada n_{ie} del registro EM puede ser descrito como la convolución de dos distribuciones de Poisson para los fotoelectrones y la carga espuria, respectivamente:

$$p(n_{ie}; \mathbf{i}, \mathbf{q}, \mathbf{c}) = \sum_{m=0}^{n_{ie}} P(m; \mathbf{i}\mathbf{q}) P(n_{ie} - m; \mathbf{c}) = P(n_{ie}; \mathbf{i}\mathbf{q} + \mathbf{c}) \quad [\text{A30}]$$

En la ecuación A30, el número esperado de fotones de entrada es el parámetro de la distribución de Poisson: $E[n_{ie}] = \lambda = \mathbf{i}\mathbf{q} + \mathbf{c}$.

Durante la amplificación de la señal en el registro EM, los electrones son transferidos con un voltaje mayor que en el chip y el registro de lectura para amplificar la señal mediante la creación de electrones por medio de ionización por impacto. Este fenómeno es también un proceso estocástico y representa la tercera fuente de ruido. La probabilidad de que n_{oe} electrones de salida abandonen el registro EM con ganancia \mathbf{g} , si luz con intensidad media \mathbf{i} incide en el detector es:

$$p(n_{oe}; \mathbf{i}, \mathbf{q}, \mathbf{c}, \mathbf{g}) = \sum_{n_{ie}=1}^{n_{oe}} P(n_{ie}; \mathbf{i}\mathbf{q} + \mathbf{c}) \gamma(n_{oe}; n_{ie}, \mathbf{g}) = (P(\mathbf{i}\mathbf{q} + \mathbf{c}) * \gamma(\mathbf{g}))(n_{oe}) \quad [\text{A31}]$$

Que es la combinación de una distribución Gamma y una distribución de Poisson.

El objetivo de este modelo es el de formular una función de densidad de probabilidad que tome en cuenta todos los posibles escenarios del proceso. Por ello, debe considerarse la posibilidad de que ningún electrón entre al registro EM. La aproximación dada por las ecuaciones A30 y A31 no admite este escenario. Entonces, es necesario expandir el modelo del registro EM tal que

$$p(n_{oe}; n_{ie}, \mathbf{g}) = G(n_{oe}; n_{ie}, \mathbf{g}) = \begin{cases} \gamma(n_{oe}; n_{ie}, \mathbf{g}) & n_{oe} \geq n_{ie} \geq 0 \\ 1 & n_{oe} = n_{ie} = 0 \\ 0 & \text{de otra manera} \end{cases} \quad [\text{A32}]$$

donde se asume que el registro EM no produce ningún electrón si ningún electrón entra y que toda la carga espuria se produjo antes la amplificación de la señal; estas suposiciones, sin embargo, no son del todo verdaderas en realidad. Se obtiene, a partir de $E[n_{ie}] = \lambda = \mathbf{i}\mathbf{q} + \mathbf{c}$ la composición

$$p(n_{oe}; \mathbf{i}, \mathbf{q}, \mathbf{c}, \mathbf{g}) = (P(\mathbf{i}\mathbf{q} + \mathbf{c}) * G(\mathbf{g}))(n_{oe}) = \begin{cases} \sum_{m=1}^{n_{oe}} P(m; \lambda) \gamma(n_{oe}; m, \mathbf{g}) & n_{oe} > 0 \\ e^{-\lambda} & n_{oe} = 0 \\ 0 & n_{oe} < 0 \end{cases} \quad [\text{A33}]$$

Se asume que el número de electrones que salen del registro EM es mayor o igual al número de electrones que entran a este. Por lo tanto, la sumatoria en A33 progresa hasta $m = n_{oe}$. El término $e^{-\lambda}$ es insignificante si el número de fotones es grande (e.g. $\lambda > 10$), pero afecta la distribución cuando λ es pequeño. Haciendo una serie de suposiciones y reacomodo de las ecuaciones, resulta más conveniente

$$p(n_{oe}; \mathbf{i}, \mathbf{q}, \mathbf{c}, \mathbf{g}) = \begin{cases} \sqrt{\frac{\lambda}{n_{oe}\mathbf{g}}} \exp\left(-\frac{n_{oe}}{\mathbf{g}} - \lambda\right) I_1\left(2\sqrt{\frac{n_{oe}}{\mathbf{g}}}\lambda\right) & n_{oe} > 0 \\ e^{-\lambda} & n_{oe} = 0 \\ 0 & n_{oe} < 0 \end{cases} \quad [\text{A34}]$$

Finalmente, la conversión de las señales electrónicas (análogas) continuas en valores de píxel (digitales) discretos en la imagen final añade el cuarto y último componente del modelo, el ruido de lectura. Este puede modelarse mediante una distribución Normal con desviación estándar \mathbf{r}

$$N(\mathbf{f}n_{ic}; n_{oe}, \mathbf{r}) \quad [\text{A35}]$$

El factor de proporcionalidad análogo-digital, \mathbf{f} (factor A/D, también conocido como la sensibilidad del amplificador), es el número de electrones por valor de píxel en la imagen. En otras palabras, es la relación del número esperado de electrones de salida $E[n_{oe}]$ entre el número esperado de electrones de entrada $E[n_{ie}]$ del registro EM. Por lo tanto, la probabilidad de medir un valor n_{ic} en la imagen

digital para un conjunto de especificaciones de la cámara EMCCD, $\Theta = (\mathbf{q}, \mathbf{c}, \mathbf{g}, \mathbf{r}, \mathbf{f})$, y $\lambda = \mathbf{i}\mathbf{q} + \mathbf{c}$ puede expresarse como:

$$p(n_{ic}; \mathbf{i}, \Theta) = ((P(\lambda)G(\mathbf{g})) * N(\mathbf{r}))(\mathbf{f}n_{ic}) \quad [\text{A36}]$$

$$= P(0; \lambda)N(\mathbf{f}n_{ic}; 0, \mathbf{r}) + \frac{2}{\mathbf{g}} \sum_{m=1}^{\infty} F_X(2\lambda; 4, 2m/\mathbf{g}) N(\mathbf{f}n_{ic}; m, \mathbf{r}) \quad [\text{A37}]$$

Si asumimos que $\xi = n_{oe} - n_{ie} + 1$ y $\theta = \mathbf{g} - 1 + \frac{1}{n_{ie}}$, con base en la aproximación de Tubbs (Tubbs, 2004) para el modelo de una cámara EMCCD, la ecuación A36 y A37 pueden reescribirse como

$$p(n_{ic}; \mathbf{i}, \Theta) = \begin{cases} P(0; \lambda)N(\mathbf{f}n_{ic}; 0, \mathbf{r}) + 2/\mathbf{g}F_X(2\lambda; 4, 2\mathbf{f}n_{ic}/\mathbf{g}) & n_{ic} > 0 \\ P(0; \lambda)N(\mathbf{f}n_{ic}; 0, \mathbf{r}) & n_{ic} \leq 0 \end{cases} \quad [\text{A38}]$$

$$= \begin{cases} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\lambda - \frac{(\mathbf{f}n_{ic})^2}{2\sigma^2}\right) + 2/\mathbf{g}F_X(2\lambda; 4, 2\mathbf{f}n_{ic}/\mathbf{g}) & n_{ic} > 0 \\ \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\lambda - \frac{(\mathbf{f}n_{ic})^2}{2\sigma^2}\right) & n_{ic} \leq 0 \end{cases} \quad [\text{A39}]$$

donde $\sigma^2 = 2\mathbf{g}^2\lambda$. Este el modelo del ruido de una cámara EMCCD en su forma general. La distinción de caso es necesaria ya que la sumatoria en A37 es indeterminada para $n_{ic} \leq 0$.

d. Modelo de las propiedades electrónicas de una cámara sCMOS

Una imagen adquirida con una cámara sCMOS contiene, principalmente, dos tipos de ruido: el ruido de Poisson, característico del proceso de emisión y detección de fotones, y el ruido de lectura introducido durante el procesamiento de la señal en el dispositivo (Long *et al*, 2012). A diferencia de las cámaras EMCCD, cuyo ruido de lectura es normalmente muy bajo y poseen un elevado ruido de amplificación electrónica, se sabe que las cámaras sCMOS poseen una estadística distinta asociada a cada píxel (*offset*, *varianza* y *ganancia*); estos parámetros ocasionan una heterogeneidad en la señal aparente registrada en cada píxel de la imagen, independientemente de la luz que incide en el detector.

El ruido de lectura de una cámara sCMOS puede aproximarse mediante una distribución de probabilidad Gaussiana con media igual a cero y cuya varianza es descrita por las fluctuaciones temporales de la ADU de cada píxel (Huang *et al*, 2013), con base en el principio de la aproximación Normal a una distribución

de Poisson cuando $\lambda \rightarrow \infty$ (Cheng, 1949). Adicionalmente, se incluye el *offset* de cada píxel mediante la adición de este a la distribución Gaussiana, lo que resulta en el desplazamiento del pico de la distribución.

Por lo tanto, cuando los fotones inciden en el sensor del chip, la ADU de la cámara sigue una distribución de probabilidad descrita por la convolución de una distribución de Poisson y una distribución Gaussiana. Dado que la estadística detrás de cada píxel es distinta una de la otra, cada unidad del arreglo del detector posee una función de densidad de probabilidad (FDP) distintiva, dada por

$$P_i(D) = A \sum_{q=0}^{\infty} \frac{1}{q!} e^{-u_i} u_i^q \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_i^2}} e^{-\frac{(D-q\cdot g_i - o_i)^2}{2\sigma_i^2}} \quad [\text{A40}]$$

Donde $P_i(D)$ es la FDP para el píxel i , D representa los conteos digitales específicos para ese píxel (en ADUs), A es una constante de normalización, u_i es el número esperado de fotoelectrones y g_i , o_i y σ_i^2 son la ganancia, *offset* y varianza del píxel i , respectivamente. La aproximación propuesta para estimar estos parámetros realizada para este trabajo se detalla en la [Sección 7.1.2](#).

Una vez obtenidos los mapas de *offset*, varianza y ganancia, que contienen los valores de o_i , σ_i^2 y g_i para cada píxel i del chip del detector, el ruido de una cámara sCMOS puede modelarse mediante

$$I_{sCMOS} = I_{Poisson} \cdot g_i + G(0, \sigma_i^2) + o_i \quad [\text{A41}]$$

donde una imagen con ruido de sCMOS I_{sCMOS} es el resultado de multiplicar la imagen limitada por difracción contaminada con ruido de Poisson $I_{Poisson}$ por el mapa de la ganancia, sumar a cada píxel ruido Gaussiano de media igual a cero y varianza σ_i^2 y el *offset* o_i .

e. *La Función de Punto Extendido de un sistema limitado por difracción*

La Función de Punto Extendido (PSF, por sus siglas en inglés) es un patrón de dispersión tridimensional que describe cómo se observaría una fuente de luz puntual e infinitamente pequeña a través de un sistema óptico específico. Cuando se capturan a través de un sistema óptico, lo que se observa en el resultado es una interacción entre los objetos de la muestra y el patrón de difracción descrito por la PSF. La geometría de este patrón de dispersión está directamente relacionada con la longitud de onda λ que atraviesa el objetivo y la apertura numérica (NA) de este (Harvey & Ftaclas, 1995).

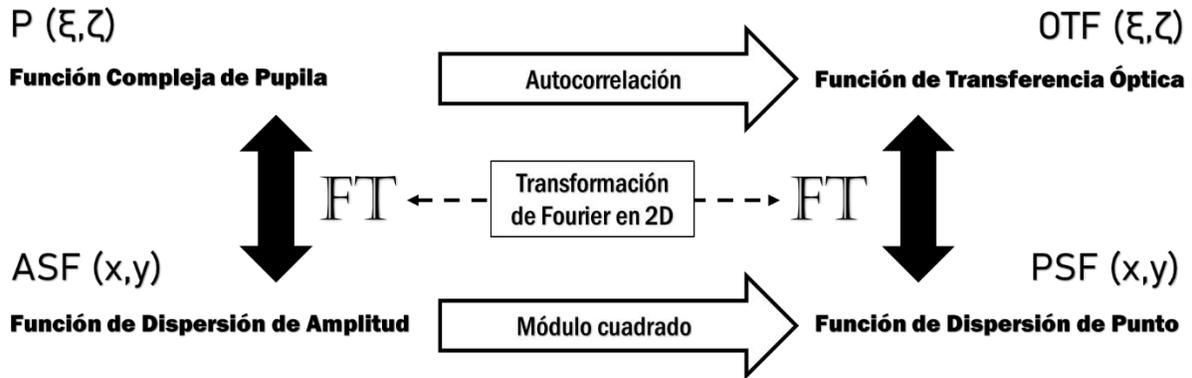


Figura A2. La relación matemática entre la Función de Pupila, la Función de Dispersión de Amplitud, la Función de Transferencia Óptica y la Función de Dispersión de Punto de un sistema óptico.

La función de pupila describe los cambios que sufre una onda de luz al atravesar un sistema óptico, tal como una cámara, un microscopio o el ojo humano. La PSF es el módulo cuadrado de la transformada de Fourier de la función de pupila. La función de transferencia óptica (OTF) es el resultado de calcular la función de autocorrelación de la función de pupila, y puede, a su vez, obtenerse a partir de la transformación de Fourier de la PSF. Adaptado de Chung et al, 2004.

La máxima resolución teórica de un sistema óptico puede calcularse a través de la ecuación de Abbe (Abbe, 1874):

$$d = \frac{1.22\lambda}{n \sin\theta} = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad [A42]$$

donde d es la distancia mínima que permite resolver dos objetos en cercanía uno del otro como entidades separadas, λ es la longitud de onda de la luz detectada y NA es la apertura numérica de las lentes del objetivo.

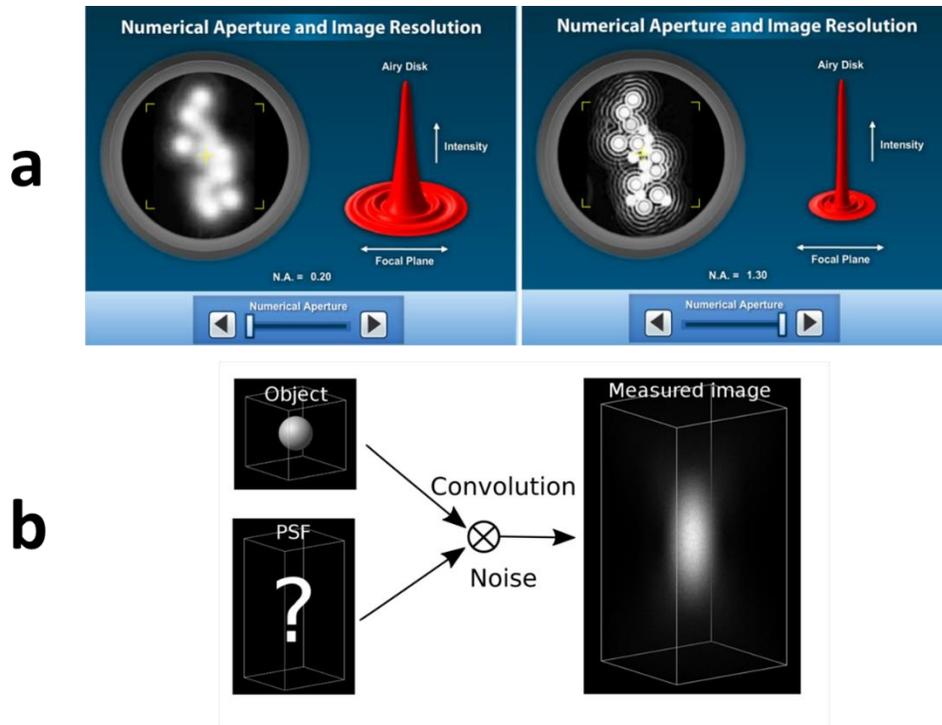


Figura A3. La resolución de un microscopio óptico está determinada, en gran parte, por la longitud de onda de registro de la señal y la apertura numérica de las lentes del objetivo.

(a) El disco de Airy es un patrón óptico que describe el punto de luz mejor enfocado que puede hacer una lente perfecta con una apertura circular, limitada por la difracción de la luz. La resolución del sistema óptico aumenta a medida que la apertura numérica del mismo es mayor, que provoca una reducción del diámetro del disco de Airy. (b) La PSF describe la respuesta de un sistema óptico ante el impulso de una fuente puntual de luz. Al convolucionar dicha fuente de luz con el patrón de difracción, se obtiene la geometría de la PSF.

Típicamente, un sistema limitado por difracción posee una frecuencia de corte por encima de la cual la señal no puede ser colectada. Dicho límite es descrito por la Función de Transferencia Óptica (OTF) y, al igual que la PSF, está definido por la NA , y la longitud de onda λ de detección del microscopio.

Para el caso de un sistema óptico ideal (i.e. libre de aberraciones ópticas), el radio de la Función de Pupila es igual a NA/λ (Hanser *et al*, 2004) y, dado que la OTF es el resultado de calcular la autocorrelación de la Función de Pupila, el radio la OTF es, por lo tanto, dos veces esta cantidad ($2NA/\lambda$).

B. INTERACCIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES Y SU EFECTO SOBRE EL NÚMERO Y BRILLO

a. Cantidad total de imágenes

Las figuras A4 y A5 ilustran la relación entre los valores del Número y el Brillo esperados y observados, respectivamente, al adquirir distintas cantidades de imágenes para el experimento.

El número total de imágenes óptimo para la cuantificación del Número se encuentra aproximadamente entre 100 y 500 imágenes (figura A4). La cuantificación del Brillo mejora mientras más imágenes se analicen (figura A5).

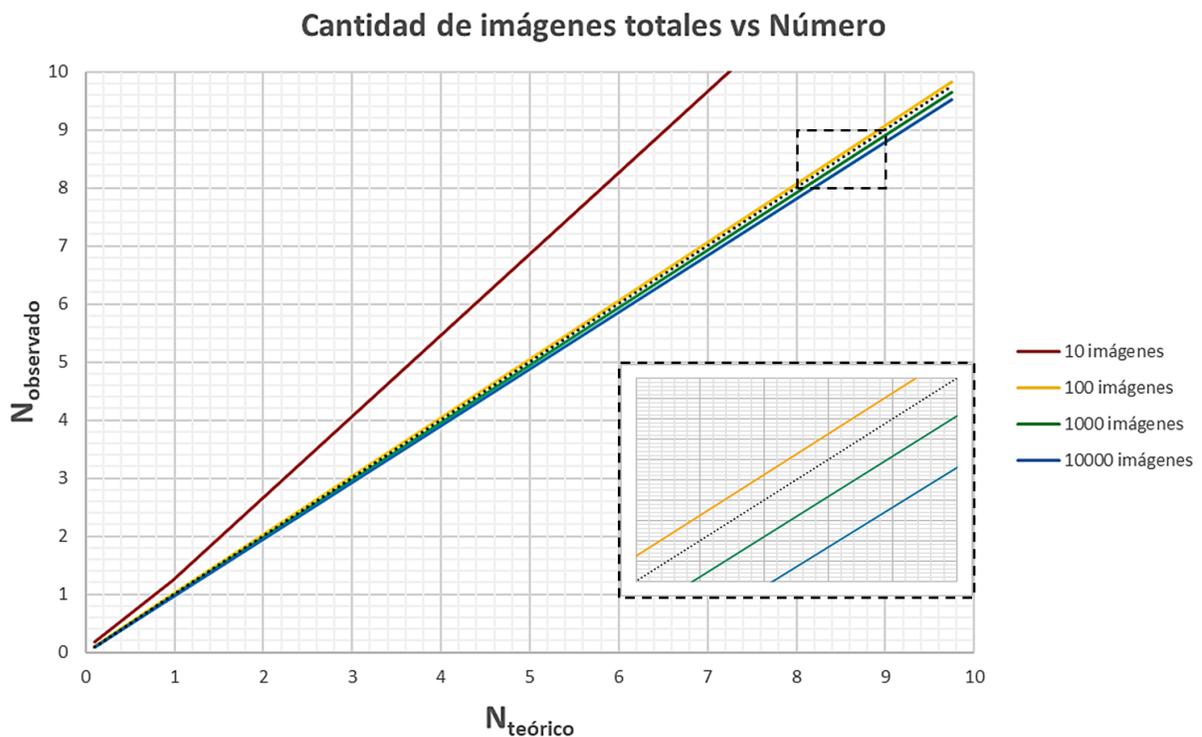


Figura A4. Evaluación del efecto del número total de imágenes sobre el Número.

Cada línea corresponde a una cantidad de imágenes del experimento distinta (ver leyendas en la sección derecha de la figura). La línea gris punteada indica la relación lineal entre el valor teórico simulado y el valor medido. Parámetros de simulación: imágenes de 32 píxeles, tasa de adquisición de 100 cps y coeficiente de difusión de $25 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

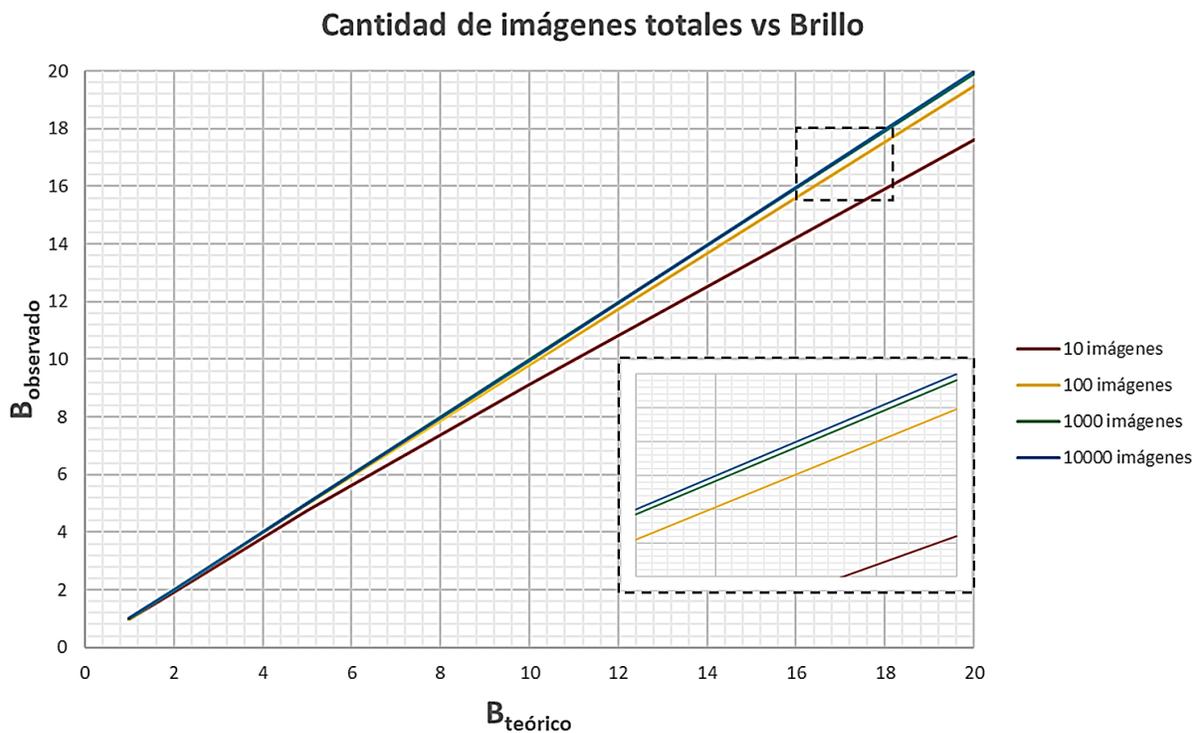


Figura A5. Evaluación del efecto del número total de imágenes sobre el Brillo.

Cada línea corresponde a una cantidad de imágenes por experimento distinta (ver leyendas a la derecha del gráfico). Parámetros de simulación: imágenes de 32 píxeles, tasa de adquisición de 100 cps y Número constante de 1.

b. Tasa de adquisición

La tasa de adquisición está íntimamente relacionada con la temporalidad del fenómeno difusivo que se espera medir. Tasas de adquisición demasiado altas provocan una sobreestimación del Número; este efecto es mitigado mientras más partículas haya presentes, pero acentuado para los oligómeros de mayor orden cuyo coeficiente de difusión es menor (partículas que se mueven más lentamente).

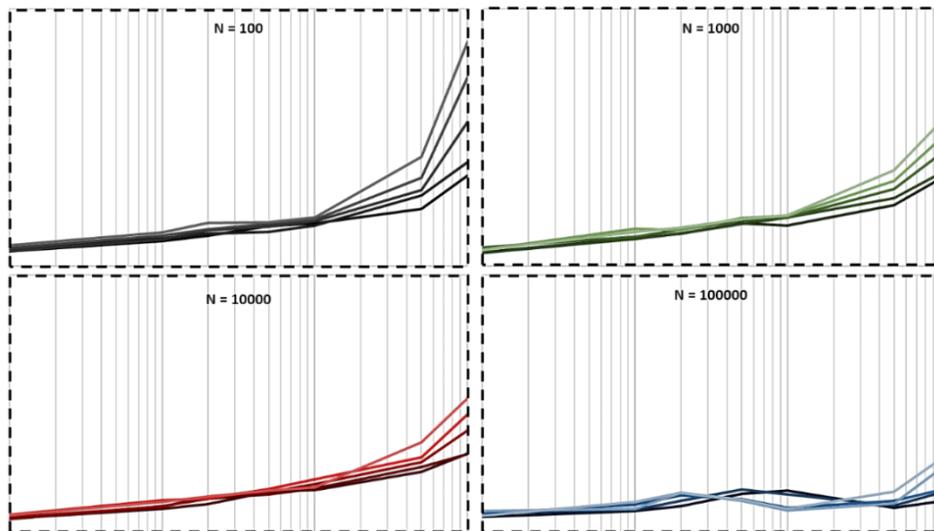
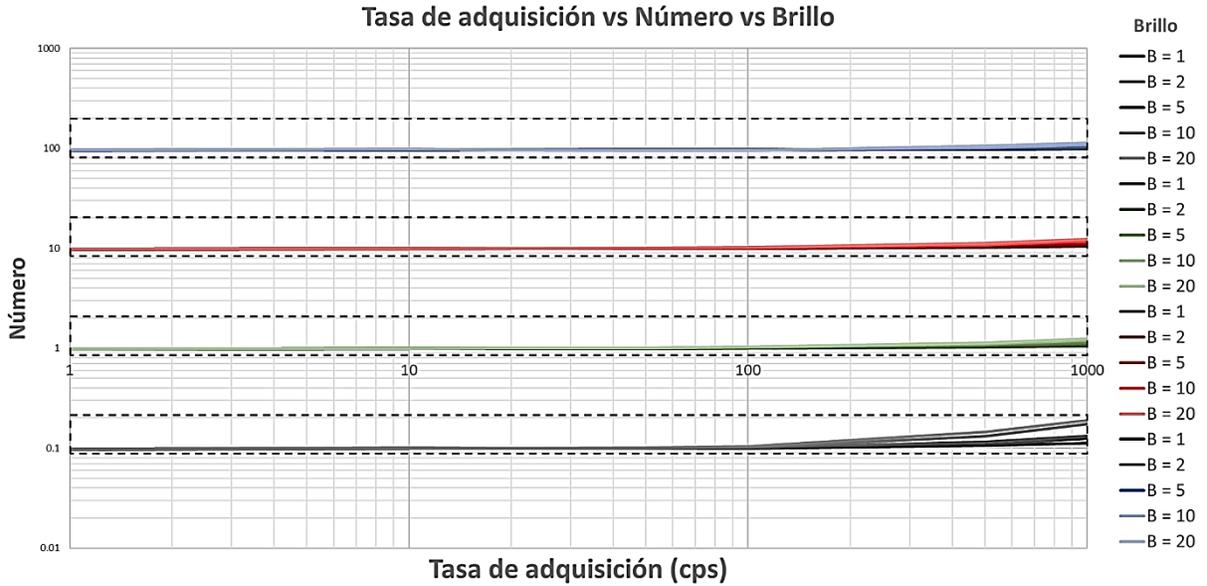


Figura A6. Evaluación de la tasa de adquisición sobre el Número y el Brillo.

Cada conjunto de líneas corresponde a una concentración de partículas específica (paneles inferiores), mientras que las escalas de color de cada uno de estos conjuntos corresponden a un estado estequiométrico distinto (ver leyendas en la sección derecha de la gráfica superior). Parámetros de simulación: imágenes de 32 píxeles y 200 imágenes por simulación.

c. Tamaño de las imágenes

Se requiere un tamaño de imagen mínimo de 16 píxeles. No existe un límite; es posible trabajar con imágenes de dimensiones superiores sin perder la confianza en el análisis si el experimento así lo requiere. Sin embargo, tomando en cuenta la optimización del tiempo de cómputo, imágenes de 16 a 64 píxeles son suficientes.

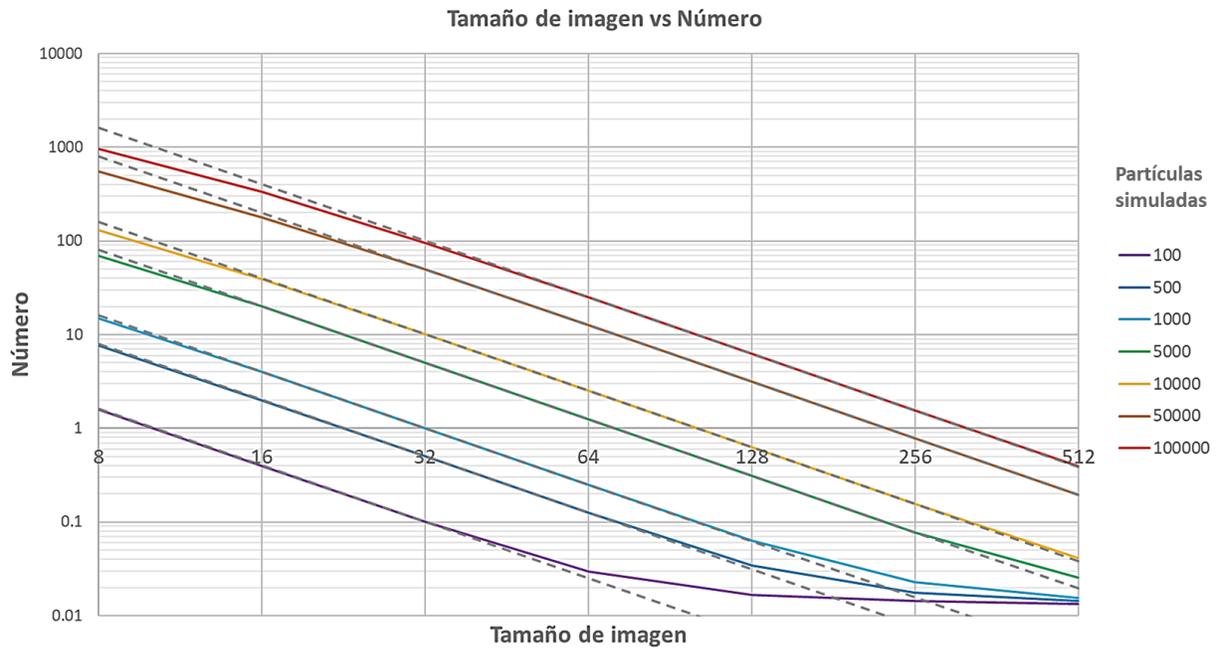


Figura A7. Evaluación del efecto del tamaño de la imagen sobre el Número.

Cada línea corresponde a un número de partículas simulado distinto (ver leyendas en la sección derecha de la figura). Las líneas grises punteadas indican la relación lineal entre el valor teórico esperado y la medición obtenida. Parámetros de simulación: tasa de adquisición de 100 cps, 200 imágenes por simulación y coeficiente de difusión de $25 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

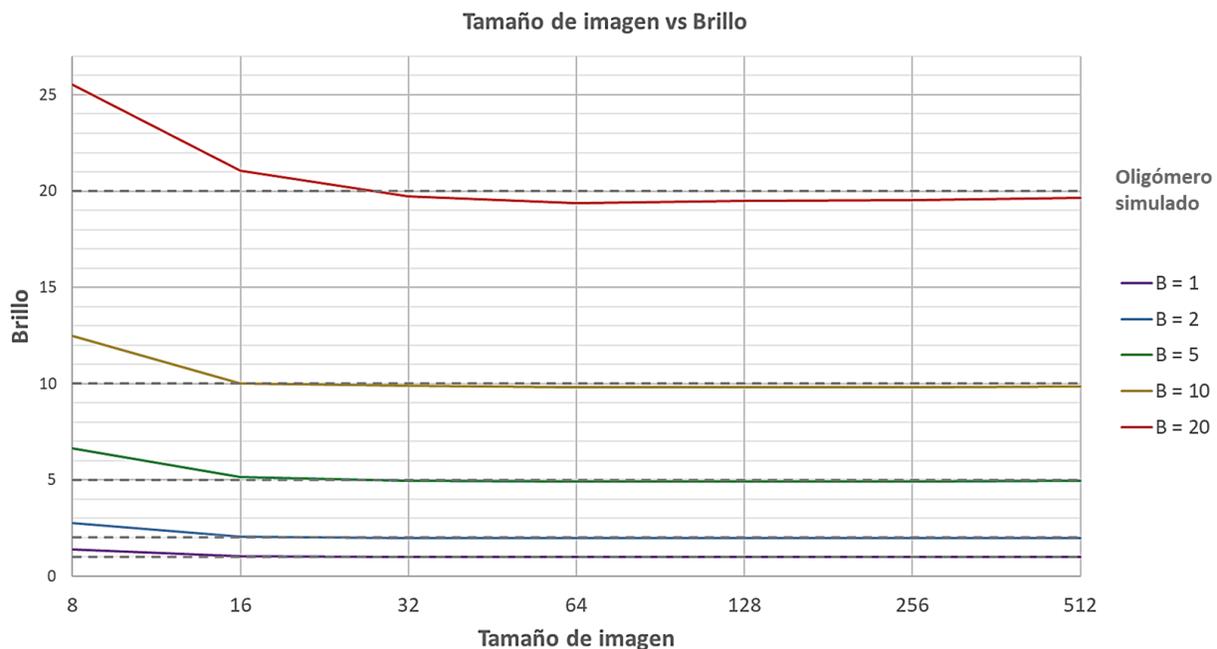


Figura A8. Evaluación del efecto del tamaño de la imagen sobre el Brillo.

Cada línea corresponde a un estado estequiométrico distinto (ver leyendas en la sección derecha de la figura). Las líneas grises punteadas indican el valor teórico esperado. Parámetros de simulación: tasa de adquisición de 100 cps, 200 imágenes por simulación y 10000 partículas simuladas.

C. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL NÚMERO Y BRILLO EN FUNCIÓN DE LA REGIÓN DEL SENSOR SCMOS

a. Estudio cualitativo

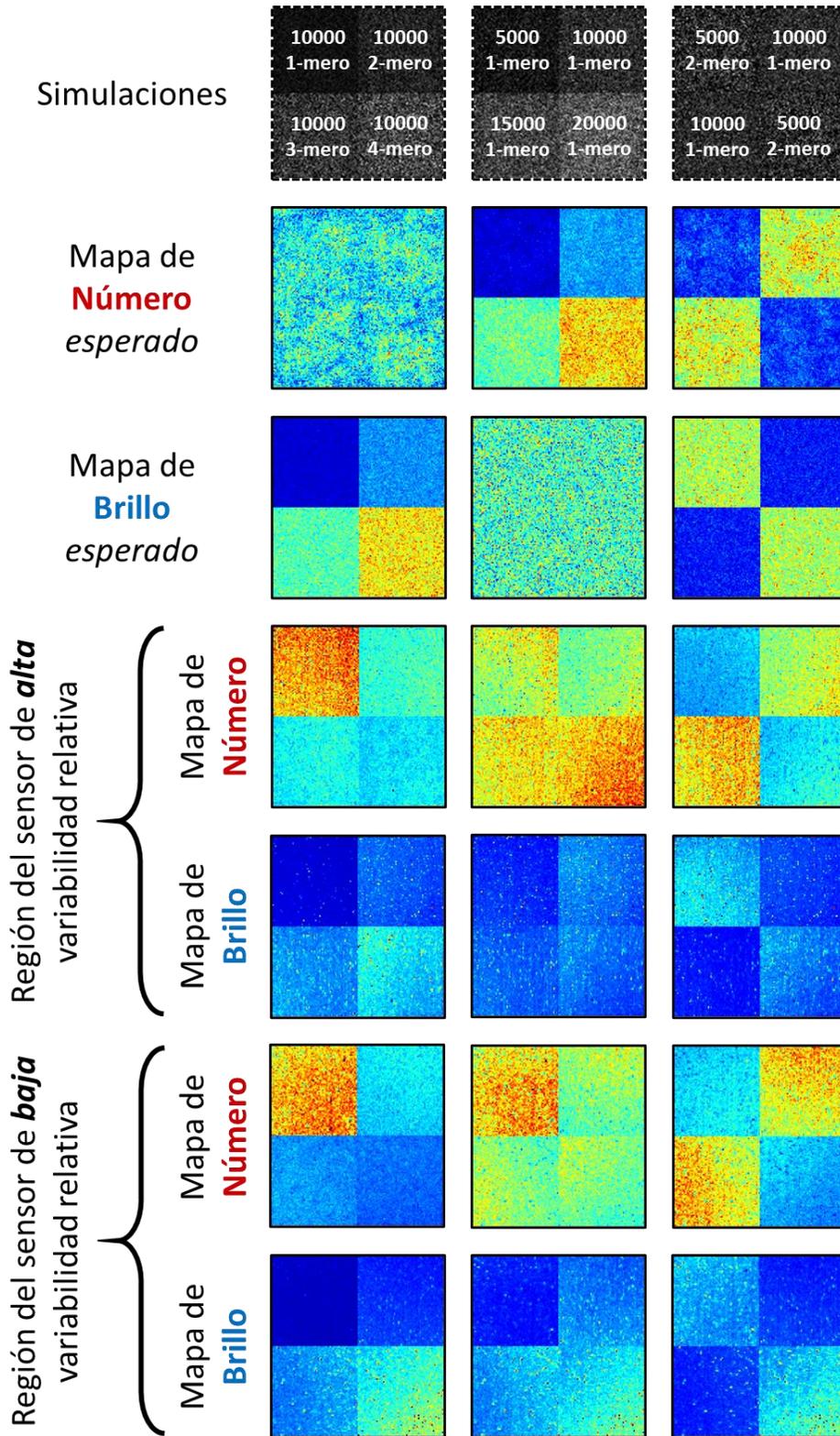


Figura A9. Análisis cualitativo del efecto de la distribución espacial de los parámetros electrónicos del sensor sCMOS sobre la cuantificación del Número y el Brillo.

Dentro de los recuadros de las simulaciones se indica el número total de partículas simuladas por cuadrante y su estado estequiométrico: desde 5000 hasta 20000 monómeros hasta tetrámeros. Parámetros de simulación: 500 imágenes de 128 píxeles y tasa de adquisición de 100 cps. La segunda y tercera fila corresponden a los mapas de Número y Brillo obtenidos a partir de las simulaciones sin ruido sCMOS. Se utilizaron las regiones de alta y baja variabilidad relativa de los mapas de calibración estimados, delimitadas con recuadros anaranjados y azules en la [figura 22](#). La cuarta y quinta fila corresponden a los mapas de Número y Brillo obtenidos a partir de las simulaciones con ruido generado a partir de una zona de alta variabilidad, mientras que la sexta y séptima fila corresponden a los de baja variabilidad. Algunos píxeles de los mapas contenían *hotspots*; para obtener una escala de color comparable entre cada uno de los mapas y, con fines cualitativos, estos píxeles fueron ajustados a valores similares al resto; no obstante, estos datos se muestran preservados en las figuras [A10](#) y [A11](#).

Los *hotspots* presentes en el sensor sCMOS introducen sesgos en el análisis y alteran las escalas de pseudocolor de las imágenes, haciendo imposible una comparación cualitativa de los resultados. El objetivo del procesamiento con ACsN de estas imágenes es el de mitigar esta heterogeneidad en la distribución del ruido de fondo.

De forma cualitativa, es posible observar algunas similitudes en los mapas esperados en comparación con los mapas obtenidos a partir de imágenes con ruido donde la compartimentalización de los parámetros moleculares se preserva. Sin embargo, no puede derivarse un análisis cuantitativo de estos resultados, ya que no reflejan el valor numérico real correspondiente.

b. Estudio cuantitativo

Para analizar de manera cuantitativa la variación local del detector sCMOS, se muestran a continuación los histogramas de las distribuciones de cada cuadrante de los experimentos mostrados en la [figura A9](#).

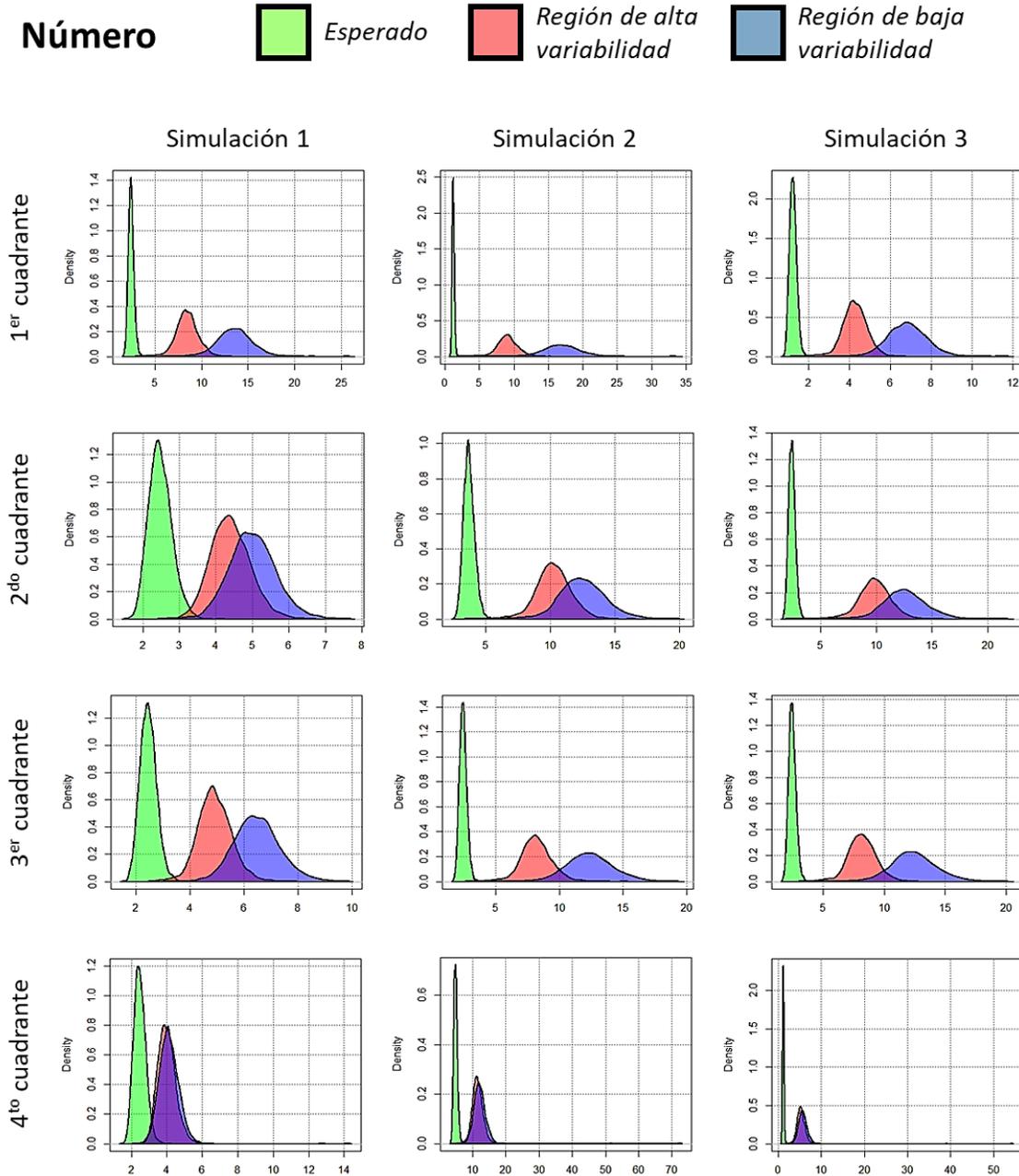


Figura A10. Análisis comparativo de las distribuciones del Número esperado y observado a partir de simulaciones multiparamétricas con ruido CMOS.

Cada gráfico representa la distribución de los valores de cada cuadrante de los mapas del Número, según las condiciones establecidas en la [figura A9](#).

Brillo



Esperado



*Región de alta
variabilidad*



*Región de baja
variabilidad*

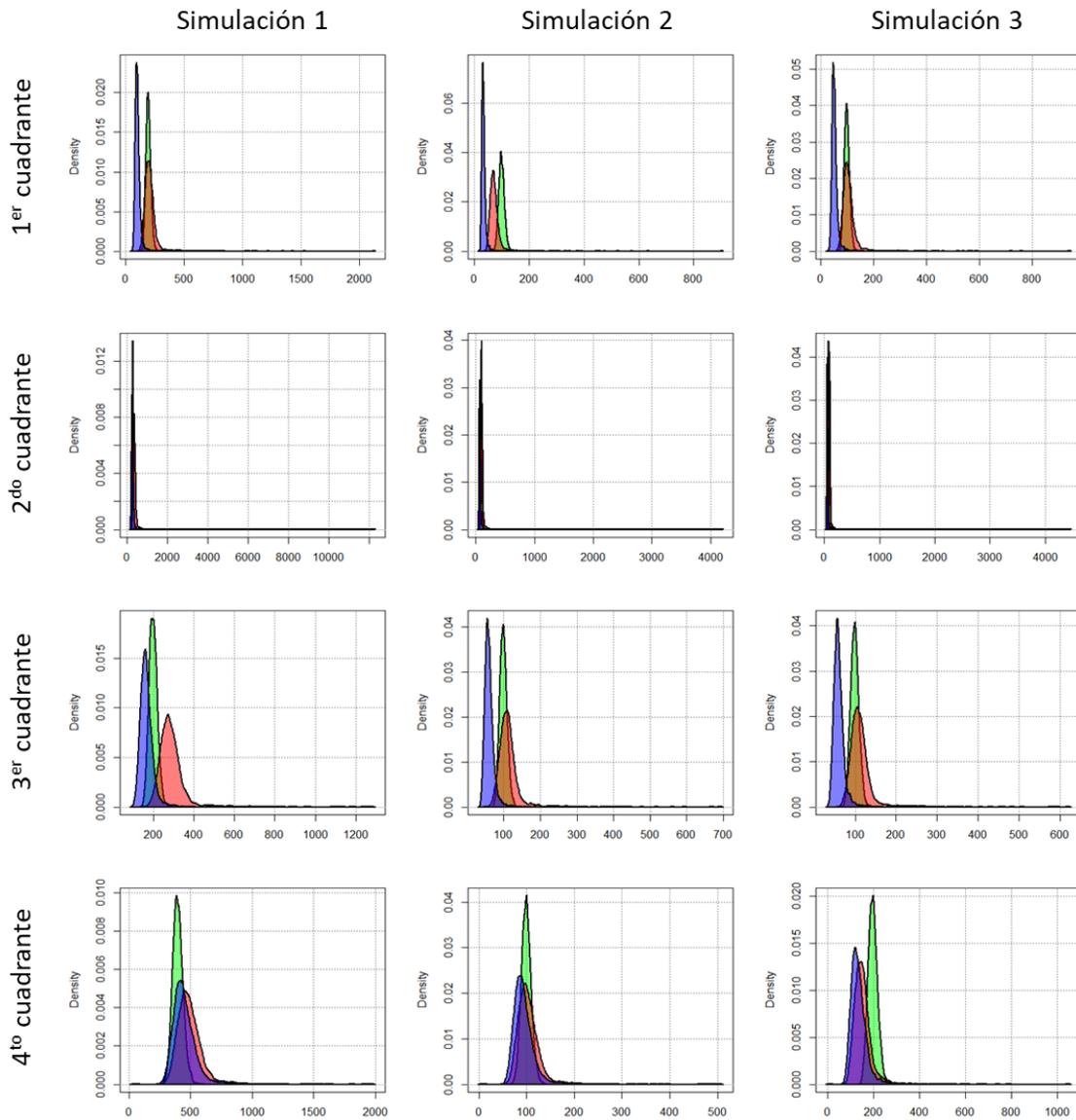


Figura A11. Análisis comparativo de las distribuciones del Brillo esperado y observado a partir de simulaciones multiparamétricas con ruido CMOS.

Cada gráfico representa la distribución de los valores de cada cuadrante de los mapas del Brillo, según las condiciones establecidas en la [figura A9](#).

D. CÓDIGOS DE R

a. Simulación de movimiento Browniano

```
##### Dependencias #####
library(tiff)      # Permite Leer y escribir archivos TIFF, con las funciones
                  # readTIFF() y writeTIFF(), respectivamente.

##### Parámetros de la simulación de partículas #####
walks <- 50       # Número de caminatas aleatorias (i.e. número de partículas)
steps <- 100      # Número total de pasos
D <- 25          # Coeficiente de difusión (um2*s-1)
cspm <- 1000     # Cuentas por segundo por molécula (fotones)
acqTime <- 0.01  # Tasa de adquisición del microscopio (s)
lp <- 10         # Potencia del láser de excitación del microscopio
npx <- 32        # Dimensión de las imágenes simuladas (píxeles)
rstart <- TRUE   # Determina si las partículas comienzan a difundir desde el
                  # centro (F) o desde una posición aleatoria (T)

tif <- TRUE      # Determina si se escribirá un archivo TIFF como resultado (T)
bps <- 16        # Profundidad de píxel de las imágenes TIFF generadas
psfmod <- F     # ¿Simular la óptica del microscopio? T/F
ccdmod <- F     # ¿Simular el ruido de una cámara CCD? T/F
cmosmod <- F    # ¿Simular el ruido de una cámara sCMOS? T/F

##### Función #####
ParticleSim <- function(walks, steps, D, cspm, acqTime, lp, npx, rstart = T,
                        psfmod = FALSE, ccdmod = FALSE, cmosmod = FALSE,
                        tif = T, bps = 16){
  si2 <- (4*D*acqTime)
  sd <- sqrt(si2)
  Ymax <- Xmax <- npx
  M <- list(NULL)
  r <- list(NULL)
  dx <- rnorm(n = walks*steps, mean = 0, sd = sd)
  dy <- rnorm(n = walks*steps, mean = 0, sd = sd)
  for (N in 1:walks){
    ra <- 1:steps + (N-1)*steps
    if (rstart == T){
      coords <- data.frame(rx = cumsum(dx[ra]) + runif(1, 1, Xmax),
                           ry = cumsum(dy[ra]) + runif(1, 1, Ymax))
      r[[N]] <- coords
    } else
      coords <- data.frame(rx = cumsum(dx[ra]) + (Xmax/2),
                           ry = cumsum(dy[ra]) + (Ymax/2))
    r[[N]] <- coords
  }
  for(i in 1:steps){
    print(i)
    m <- matrix(0, nrow = Xmax, ncol= Ymax)
    for(N in 1:walks){
      x <- round(r[[N]]$rx[i])
      y <- round(r[[N]]$ry[i])
      if(!(x>=1 && x<=Xmax)){
        s <- sign(Xmax - x)
        if(s == -1){x <- x%Xmax}
      }
    }
  }
}
```

```

    if(s == 1){x <- Xmax - abs(x)%Xmax}
  }
  if(!(y>=1 && y<=Ymax)){
    s <- sign(Ymax - y)
    if(s == -1){y <- y%Ymax}
    if(s == 1){y <- Ymax - abs(y)%Ymax}
  }
  if(x>0 & y>0 & x<=Xmax & y<=Ymax){
    signal <- cspm*acqTime*lp
    m[x,y] <- m[x,y] + signal
  }
}
if(psfmod == T){
  psf <- PSFmod(PSFsize, Pixelsize, NumAp, Lambda, npx)
  m <- convolve(m, psf)
}
if(ccdmod == T){
  cmosmod = F
  ccd <- CCDmod(I = m, c = C, q = Q, f = f_factor, g = G, s = S)
  m <- matrix(ccd, ncol = npx, nrow = npx) + OFST
}
if(cmosmod == T){
  m <- CMOSmod(img = m, g = gamma, sd = sdv, ofst = ofst, npx = npx)
}
if (tif){
  M[[i]] <- m/2^bps
} else
  M[[i]] <- m
}
if (tif){
  writeTIFF(M, paste0(walks, "Particles", steps, "Steps.tif"),
            bits.per.sample = bps)
}
return(M)
}

```

Escrito con base en la teoría desarrollada en el [Anexo A-a](#)

b. Simulación de la PSF

```
##### Parámetros del sistema óptico #####
PSFsize <- 32      # Dimensión de La PSF (píxeles)
Pixelsize <- 0.15  # Tamaño del píxel de La imagen (micras)
NumAp <- 1.2      # Apertura numérica
Lambda <- 0.510   # Longitud de onda (micras)
npx <- 32         # Dimensión de La representación 2D de La PSF (píxeles)

##### Función #####
PSFmod <- function(PSFsize, Pixelsize, NumAp, Lambda, npx){
  y <- matrix(rep((-PSFsize/2):((PSFsize/2)-1), npx), nrow = npx, ncol = npx)
  x <- t(y)
  mesh <- list(x = x, y = y)
  z <- sqrt((mesh$x^2)+(mesh$y^2))
  scale <- PSFsize*Pixelsize
  kr <- z/scale
  Freq_max <- NumAp/Lambda
  Pupil <- kr < Freq_max
  PSFA <- fft(Pupil)
  PSF <- Re(PSFA*Conj(PSFA))
  OTF <- abs(fft(PSFA*Conj(PSFA), inverse = TRUE))
  OTFn <- OTF/max(OTF)
  PSFn <- PSF/sum(PSF)
  return(PSFn)
}

# Función escrita originalmente por el Dr. Adán Guerrero
# Escrito con base en el trabajo de Liu y col., 2017
```

c. Simulación de ruido EMCCD

```
##### Parámetros de La cámara EMCCD #####
f_factor <- 1      # Factor de proporcionalidad análogo-digital
G <- 25           # Ganancia
Q <- 0.95         # Eficiencia cuántica
C <- 15           # Tasa de emisión de corriente oscura
S <- 1            # Desviación estándar de la distribución normal
OFST <- 100       # Offset del detector

##### Función #####
CCDmod <- function(I, q, c, f, g, s, offset){
  k <- 4
  lambda <- (I*q) + c
  nic <- (g*lambda)/f
  Fchi <- NULL
  G <- NULL
  for (i in 1:length(nic)){
    G = c(G, (1/sqrt(2*pi*s))*exp(-lambda[i] - ((f*nic[i])^2)/(2*s^2)))
    Fchi = c(Fchi,(2/g)*rchisq(1, k, 2*f* nic[i]/ g ))
  }
  return(G + Fchi)
}

# Función escrita originalmente por el Dr. Adán Guerrero
# Escrito con base en el trabajo de Hirsch y col., 2013
```

d. Simulación de ruido sCMOS

```
##### Parámetros de La cámara sCMOS #####  
  
# Importación de mapas de calibración desde archivos TXT  
gainmap <- as.matrix(read.table("gain_map.txt", header = T)) # Mapa de ganancia  
varmap <- as.matrix(read.table("variance_map.txt", header = T)) # Mapa de varianza  
offsetmap <- as.matrix(read.table("offset_map.txt", header = T)) # Mapa de offset  
# Ajuste del tamaño de Los mapas al tamaño de Las imágenes a modelar  
gamma <- gainmap[1:npx, 1:npx]  
sdv <- sqrt(varmap[1:npx, 1:npx])  
ofst <- offsetmap[1:npx, 1:npx]  
  
##### Función #####  
CMOSmod <- function(img, g, sd, ofst, npx){  
  img <- g*rpois(npx*npx, img) + rnorm(npx*npx, 0, sd) + ofst  
  return(img)  
}  
  
# Escrita con base en el trabajo de Liu y col., 2017
```

e. Aproximación para estimar el offset, varianza y ganancia de una cámara sCMOS

```
##### Dependencias #####
library(tiff) # Lectura y escritura de archivos TIFF
library(MASS) # Herramientas de análisis estadístico

##### Cálculo del Offset y Varianza #####
index <- c("01","02","03","04","05","06","07","08","09","10")
SUM <- matrix(0, ncol = 428, nrow = 684)
SUM2 <- matrix(0, ncol = 428, nrow = 684)
for (i in 1:6){
  for (j in index){
    print(paste0("Currently working on substack ",j," of stack ", i))
    current <- readTIFF(paste0("stk_00",j,"_dark",i,".tif"), all = T, as.is = T)
    for (k in 1:length(current)){
      SUM <- SUM + current[[k]]; SUM2 <- SUM2 + (current[[k]]*current[[k]])
    }
  }
}
OFST <- SUM/60000; VAR <- SUM2/60000 - (OFST*OFST)

##### Cálculo de La ganancia #####
index <- c("01","02","03","04","05","06","07","08","09","10")
A <- array(0, dim = c(684,428,7))
B <- array(0, dim = c(684,428,7))
for (i in 12:18){
  SUM <- matrix(0, ncol = 428, nrow = 684)
  SUM2 <- matrix(0, ncol = 428, nrow = 684)
  for (j in 1:3){
    print(paste0("Currently working on substack ",j," of stack ", i))
    current <- readTIFF(paste0("stk_00",j,"_laser",i,".tif"), all = T, as.is = T)
    for (k in 1:length(current)){
      SUM <- SUM + current[[k]]; SUM2 <- SUM2 + (current[[k]]*current[[k]])
    }
  }
  offset <- SUM/10000
  variance <- SUM2/10000 - (offset*offset)
  A[,,(i-11)] <- (variance - VAR)
  B[,,(i-11)] <- (offset - OFST)
}
GAIN <- matrix(0, ncol = 428, nrow = 684)
for(i in 1:dim(A)[1]){
  for(j in 1:dim(A)[2]){
    b <- matrix(B[i,j,])
    a <- matrix(A[i,j,])
    GAIN[i,j]<-ginv(b) %*% a;
  }
}

##### Importación de los mapas de calibración calculados #####
write.csv(OFST, "offset_map.txt", row.names = F, col.names = F)
write.csv(VAR, "variance_map.txt", row.names = F, col.names = F)
write.csv(GAIN, "gain_map.txt", row.names = F, col.names = F)

# Escrito con base en el trabajo de Huang y col., 2013
```

f. Análisis de Número & Brillo

```
##### Parámetros del análisis de N&B #####
S <- 1          # Factor S de proporcionalidad
offset <- 0     # Offset del detector
sigma_o <- 0    # Varianza del detector

##### Funciones #####
imMean <- function(img){
  di <- dim(img)
  if (length(di)!=3) return(img)
  if (di[3]<2) return(img)
  X <- di[1]
  Y <- di[2]
  Imean <- array(NA, dim = c(X,Y))
  for (i in 1:(X)){
    for (j in 1:(Y)){
      Imean[i,j] <- mean(img[i,j,], na.rm = T)
    }
  }
  return(Imean)
}

imVar <- function(img){
  di <- dim(img)
  X <- di[1]
  Y <- di[2]
  Ivar <- array(NA, dim = c(X,Y))
  for(i in 1:(X)){
    for(j in 1:(Y)){
      Ivar[i,j] <- var(img[i,j,], na.rm = T)
    }
  }
  return(Ivar)
}

NB <- function(img, sigma_o = 0, ofst = 0, S = 0){
  img.m <- imMean(img)
  img.v <- imVar(img)
  V <- img.v - var0
  M <- img.m - ofst
  V.min <- min(V)
  M.min <- min(M)
  if (V.min < 0) V <- V + abs(V.min)
  if (M.min < 0) M <- M + abs(M.min)
  B <- V/M
  N <- (M^2)/V
  B[which(B == Inf)] <- NA
  N[which(N == Inf)] <- NA
  if (S>0){
    epsilon <- B / S - 1
    n <- (N * (epsilon + 1)) / epsilon
    vsm <- V - S*M
    vsm.min <- min(vsm)
  }
}
```

```
if (vsm.min < 0) vsm <- vsm + abs(vsm.min)
epsilon <- vsm / M
n <- (M^2)/vsm
epsilon[which(epsilon == Inf)] <- NA
n[which(n == Inf)] <-NA
return(list(n = n, epsilon = epsilon, I_Ioffset = M))
} else {
  return(list(N = N, B = B, I_Ioffset = M))
}
}
```

Funciones escritas originalmente por el Dr. Adán Guerrero

E. ESTIMACIÓN DE LOS MAPAS DE CALIBRACIÓN DEL DETECTOR sCMOS ORCA FLASH 4.0 v2

A continuación, se muestran los mapas de calibración (*offset*, varianza y ganancia) del detector sCMOS. Este modelo particular posee un chip de 2048 x 2048 píxeles. Sin embargo, sólo se calibró una subregión de 684 x 428 píxeles, que es el tamaño máximo de imagen impuesto por el fabricante para el uso con el microscopio Nanoimager del laboratorio. Ver [Sección 7.1.2](#) para una descripción de la aproximación para estimar estos mapas.

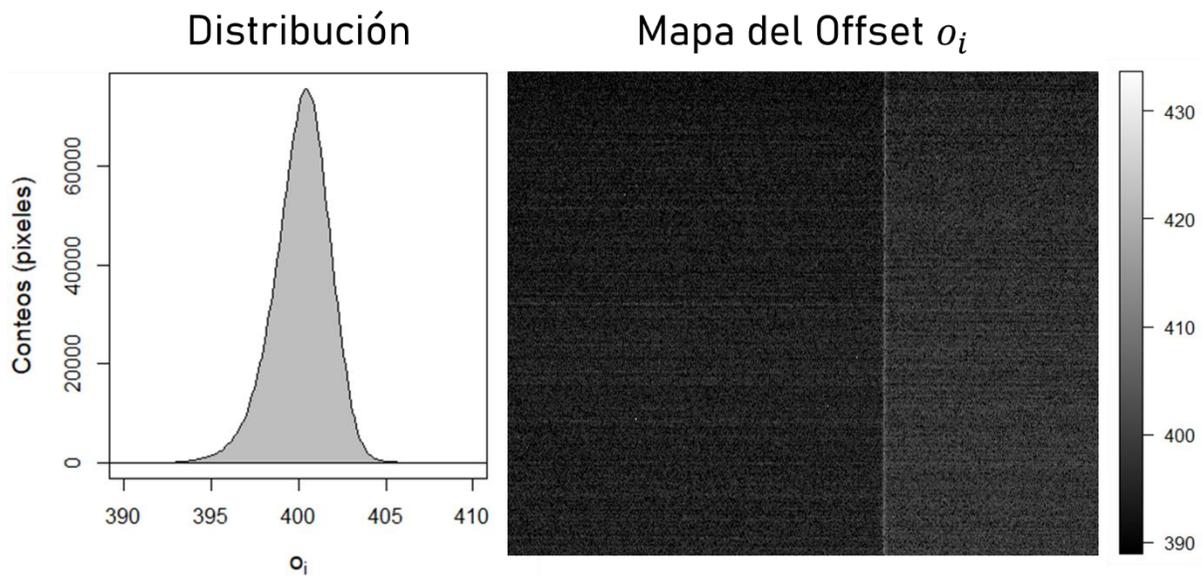


Figura A12. Mapa y distribución del *Offset* de una subregión de 684 x 428 píxeles del detector sCMOS ORCA Flash 4.0 v2 del LNMA.

El patrón de líneas horizontales refleja la arquitectura de procesamiento en línea del detector.

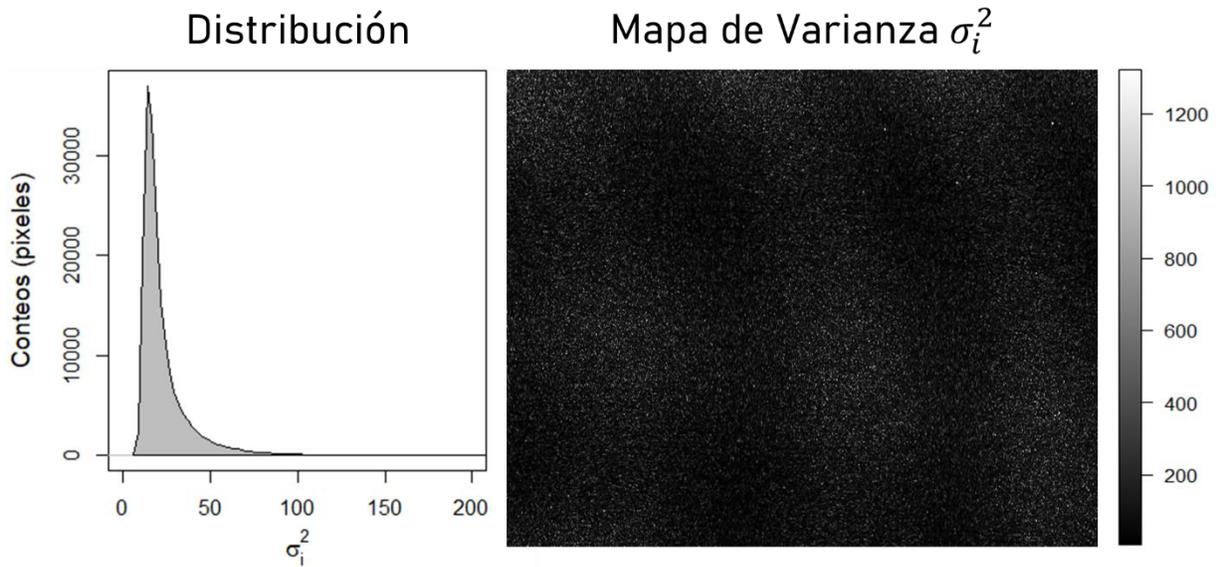


Figura A13. Mapa y distribución de la Varianza de una subregión de 684 x 428 píxeles del detector sCMOS ORCA Flash 4.0 v2 del LNMA.

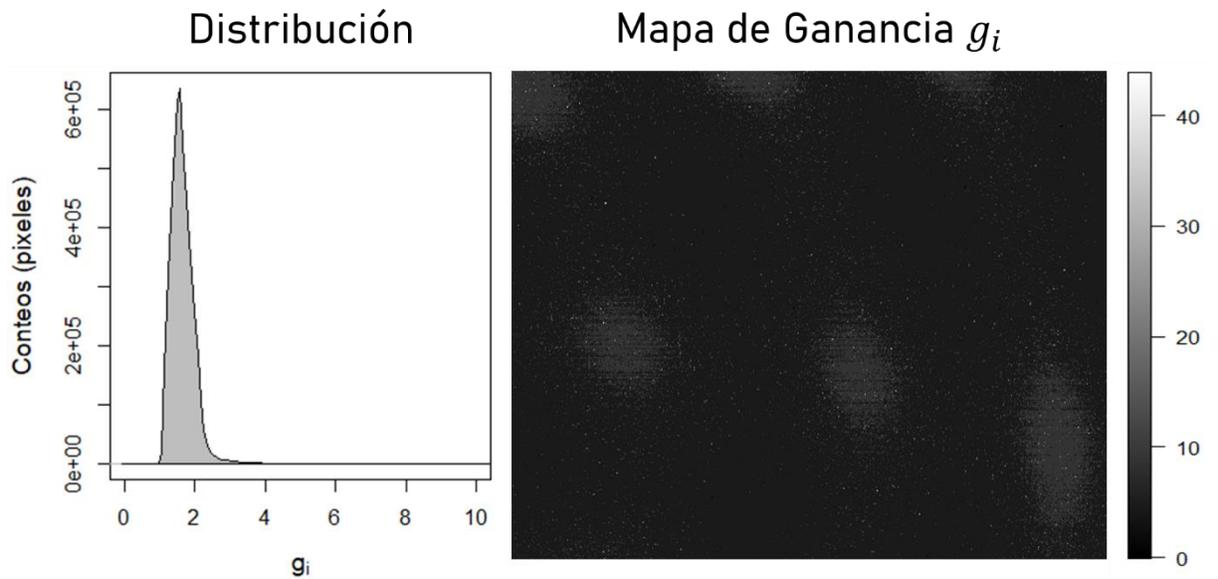


Figura A14. Mapa y distribución de la Ganancia de una subregión de 684 x 428 píxeles del detector sCMOS ORCA Flash 4.0 v2 del LNMA.

F. PUBLICACIONES

- a. *FCslib: an open-source tool for fluorescence fluctuation spectroscopy analysis for mobility, number and molecular brightness in R* (<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa876>)

Bioinformatics, 37(13), 2021, 1930–1931

doi: 10.1093/bioinformatics/btaa876

Advance Access Publication Date: 11 December 2020

Applications Note

OXFORD

Bioimage informatics

FCSlib: an open-source tool for fluorescence fluctuation spectroscopy analysis for mobility, number and molecular brightness in R

R. Pinto-Cámara^{1,†}, A. Linares^{1,†}, D. S. Moreno-Gutiérrez^{2,3}, H. O. Hernández³, J. D. Martínez-Reyes¹, J. M. Rendón-Mancha⁴, C. D. Wood¹ and A. Guerrero^{1,*}

¹Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada and ²Departamento de Computación y Robótica, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62210 Cuernavaca, Morelos, México, ³Departamento de Ciencias de la Computación, Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, México and ⁴Centro de Investigación en Ciencias, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 62209 Cuernavaca, Morelos, México

*To whom correspondence should be addressed.

[†]The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as Joint First Authors.

Associate Editor: Jinbo Xu

Received on March 4, 2020; revised on September 1, 2020; editorial decision on September 23, 2020; accepted on September 28, 2020

Abstract

Summary: *FCSlib* is an open-source R tool for fluorescence fluctuation spectroscopy data analysis. It encompasses techniques such as Fluorescence Correlation Spectroscopy, Number and Brightness, Pair Correlation Function and Pair Correlation of Molecular Brightness.

Availability and implementation: Source code available at <https://cran.r-project.org/web/packages/FCSlib/> for Linux, Windows and macOS platforms. Sample data as well as a user's guide are available at <https://github.com/FCSlib/FCSlib>.

Contact: adanog@ibt.unam.mx

Supplementary information: [Supplementary data](#) are available at *Bioinformatics* online.

1 Introduction

Fluorescence fluctuation spectroscopy (FFS) is a set of non-invasive techniques with high spatial and temporal resolution, that can be used to study the kinetics of particles diffusing at low concentrations within live cell milieu. By analyzing the spatiotemporal properties of the fluorescence emitted by these particles, FFS can measure molecular dynamics and interaction *in vivo* (Lakowicz, 2013). The number of researchers interested in this tool and the need for specialized software have both increased in recent years.

The seminal technique of FFS is single-point Fluorescence Correlation Spectroscopy (spFCS) (Elson and Magde, 1974), which provides information about the dynamics of single molecules populating and transiting a focal volume of observation. In spFCS, the signal from one or more fluorescence channels (FCCS) is acquired over time at frequencies comparable to that of the dynamics of the process of interest (Lakowicz, 2013).

Once the data is collected, quantitative information about the kinetic nature of particles, such as their diffusion constant D , is commonly recovered through the fitting of a physical model (Elson and Magde, 1974). The 'fitFCS' function in *FCSlib* allows to incorporate any of five different models: free diffusion of one or two

species in two and three dimensions, while contemplating (or not) the triplet state of the fluorescence phenomenon.

Even though the classical spFCS approach provides high temporal resolution, it is not intended to provide spatial information about particle mobility at sub-cellular scales. The Pair Correlation Function measures the time it takes for a particle to move from one point to another, calculates the temporal cross-correlation between the signals and characterizes the average path of a certain molecule within the cellular environment, creating a map of molecular flux with a spatial resolution provided by the focal length of the imaging volume (Digman and Gratton, 2009).

Number and Brightness is a time-independent technique based on the analysis of the statistical moments of the fluorescence fluctuations; it provides an indicator of the abundance, spatial organization and stoichiometry of different homo-oligomeric species (Digman et al., 2008).

With the Pair Correlation of Molecular Brightness approach, one can track the mobility of different homo-oligomeric states of a given molecule, coexisting in the same microenvironment (Hinde et al., 2016). The result is an oligomer-specific flux map that graphically reflects the spatiotemporal position of the tracked diffusive species (Fig. 1).

- b. *Nanoscopic resolution within a single imaging frame (en revisión) (pre-print en bioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.10.17.464398>)*

Nanoscopic resolution within a single imaging frame

 Esley Torres García, Raúl Pinto Cámara,  Alejandro Linares,  Damián Martínez, Víctor Abonza, Eduardo Brito-Alarcón,  Carlos Calcines-Cruz, Gustavo Valdés Galindo,  David Torres, Martina Jabłoński,  Héctor H. Torres-Martínez,  José L. Martínez,  Haydee O. Hernández, José P. Ocelotl-Oviedo,  Yasel Garcés,  Marco Barchi,  Joseph G. Dubrovsky,  Alberto Darszon,  Mariano G. Buffone,  Roberto Rodríguez Morales,  Juan Manuel Rendon-Mancha,  Christopher D. Wood,  Armando Hernández-García,  Diego Krapf,  Álvaro H. Crevenna,  Adán Guerrero

doi: <https://doi.org/10.1101/2021.10.17.464398>

This article is a preprint and has not been certified by peer review [what does this mean?].



Abstract | Full Text | Info/History | Metrics |  Preview PDF

Abstract

Mean-Shift Super Resolution (MSSR) is a principle based on the Mean Shift theory that improves the spatial resolution in fluorescence images beyond the diffraction limit. MSSR works on low- and high-density fluorophore images, is not limited by the architecture of the detector (EM-CCD, sCMOS, or photomultiplier-based laser scanning systems) and is applicable to single images as well as temporal series. The theoretical limit of spatial resolution, based on optimized real-world imaging conditions and analysis of temporal image series, has been measured to be 40 nm. Furthermore, MSSR has denoising capabilities that outperform other analytical super resolution image approaches. Altogether, MSSR is a powerful, flexible, and generic tool for multidimensional and live cell imaging applications.

Competing Interest Statement

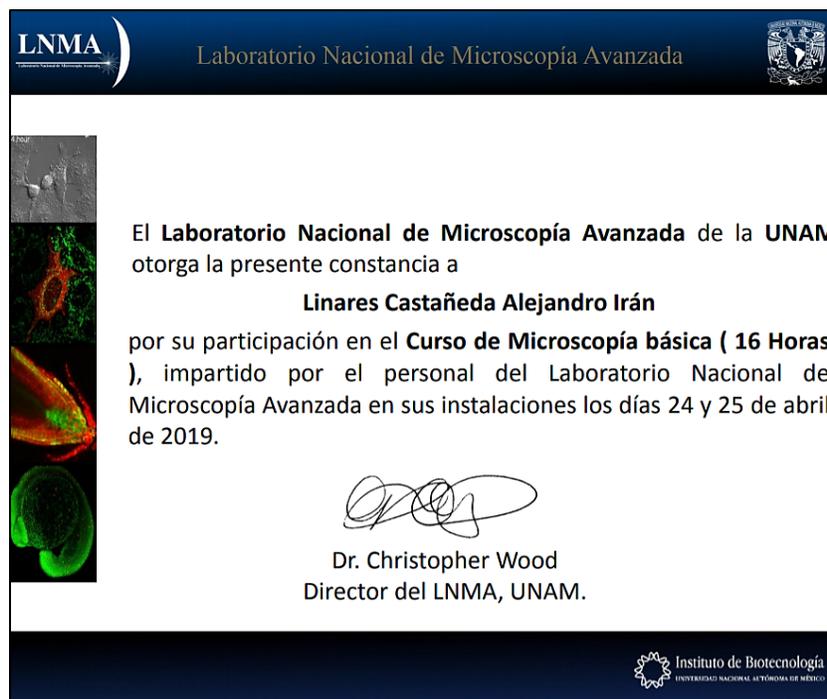
The authors have declared no competing interest.

G. PARTICIPACIÓN EN CURSOS, SIMPOSIOS Y CONGRESOS

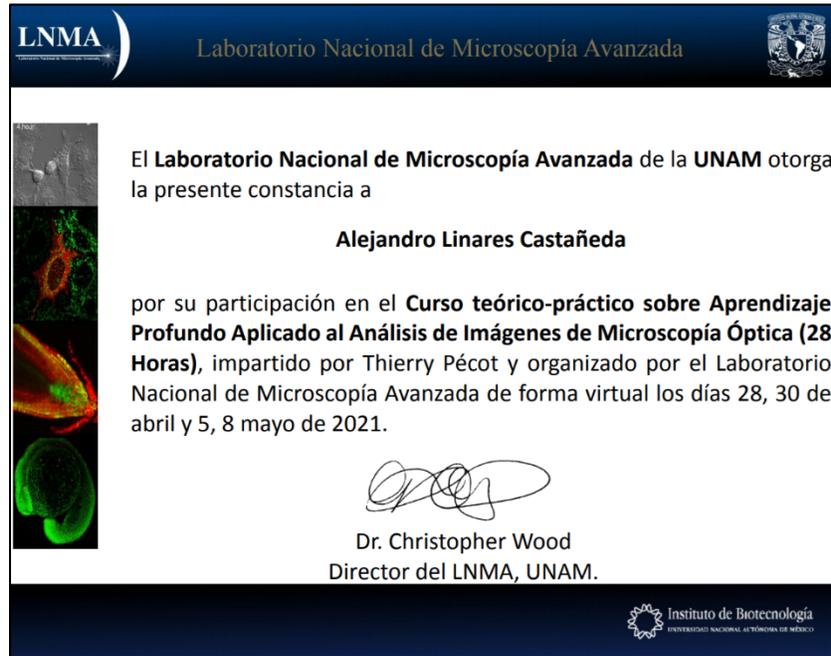
- a. *Taller de molécula única: Aplicaciones en el estudio de Proteínas - Red de Estructura, Función y Evolución de Proteínas (REFEP), IBT, UNAM*



- b. *Curso de Microscopía Básica - Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, IBT, UNAM.*

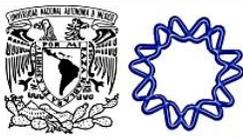


- c. *Curso teórico-práctico sobre Aprendizaje Profundo Aplicado al Análisis de Imágenes de Microscopía Óptica - Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, IBT, UNAM.*



- d. *XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería 2019, León, Guanajuato – Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*





FCSlib: Una paquetería de R para estudios de espectroscopía de fluctuación de la fluorescencia en células vivas

R. Pinto-Cámara ¹, A. Linares-Castañeda ¹, Haydee O. Hernández ², D. S. Moreno-Gutiérrez ³, M. Rendón-Mancha ⁴, C.D. Wood ¹ & A. Guerrero ¹.

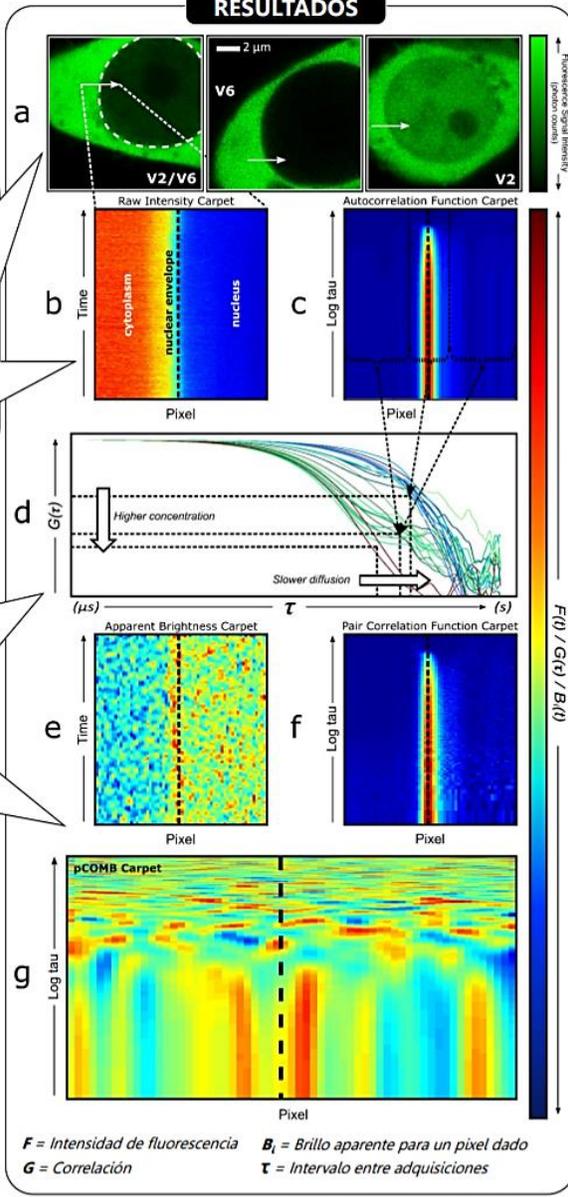
¹ Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62210 Cuernavaca, Morelos, México.
² Departamento de Ciencias de la Computación, Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, México.
³ Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62210 Cuernavaca, Morelos, México.
⁴ Centro de Investigación en Ciencias, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 62210 Cuernavaca, Morelos, México.



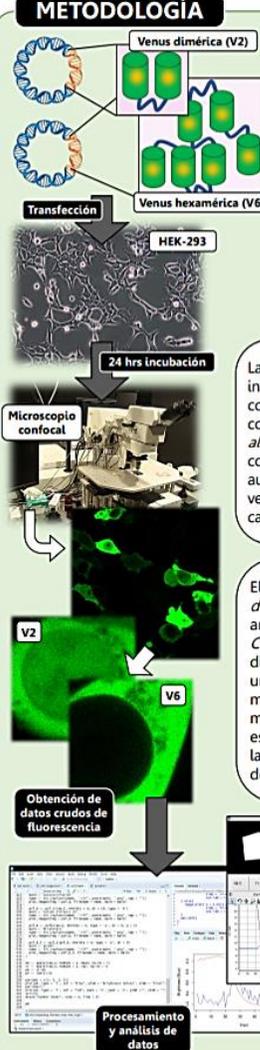

RESUMEN

La espectroscopía de fluctuación de la fluorescencia (EFC) es una serie de técnicas de análisis no invasivas que permiten el estudio de la dinámica molecular e interacciones proteicas específicas *in vivo*. Desarrollamos FCSlib, un software gratuito y de código abierto, capaz de realizar análisis de datos de EFC en células vivas. Esta paquetería para R incluye técnicas de Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia, Número y Brillo, Función de Correlación por Pares y Correlación por Pares de Brillo Molecular.

RESULTADOS



METODOLOGÍA



Se estudió la dinámica de dímeros (V2) y hexámeros (V6) de la proteína fluorescente Venus en el citoplasma, así como su habilidad de atravesar el poro de la membrana nuclear. (a) Células HEK-293 expresando V2 (derecha), V6 (centro) y una combinación de ambas (izquierda). Se realizaron escaneos de intensidad a lo largo de una línea de 64 píxeles (con un tamaño de píxel 50 nm), en dirección del citoplasma al núcleo. Estos datos se representan de manera espacio-temporal en forma de una alfombra de intensidades, tal y como se muestra en el panel (b).

La *Función de Autocorrelación* brinda información acerca de la movilidad y la concentración de las moléculas fluorescentes, con precisión espacio-temporal nanométrica. La *alfombra de autocorrelación*, en el panel (c), corresponde a un conjunto de curvas de autocorrelación, con información de la velocidad a la que se mueven las moléculas y la cantidad de éstas (d).

El método de *Correlación Cruzada por Pares de Brillo Molecular* combina las ventajas del análisis de *Brillo* (e) y *Función de Correlación* (f). Permite distinguir entre las distintas especies homo-oligoméricas de una molécula o proteína coexistiendo en el mismo microentorno. Se rastrea la movilidad de cada especie a través de las estructuras y compartimentos celulares a lo largo del tiempo. El resultado es un mapa de flujo molecular (g).

F = Intensidad de fluorescencia **B_i** = Brillo aparente para un pixel dado
G = Correlación **τ** = Intervalo entre adquisiciones

CONCLUSIONES

FCSlib es herramienta alternativa para el análisis de datos de EFC. Su creación abrirá las puertas de la EFC a una mayor porción del sector científico e impulsará los estudios de la microscopía de fluorescencia en México y todo el mundo.

AGRADECIMIENTOS

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Ciencia Básica 252213, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica DGAPA-PAPIIT IA202417. R.P., A.L. & H.H. recibieron apoyo por CONACYT y DGAPA durante sus estudios de bachillerato. El equipo de microscopía fue provisto y mantenido a través de CONACYT, donativos 123007, 232708, 260541, 280487 y 293624.





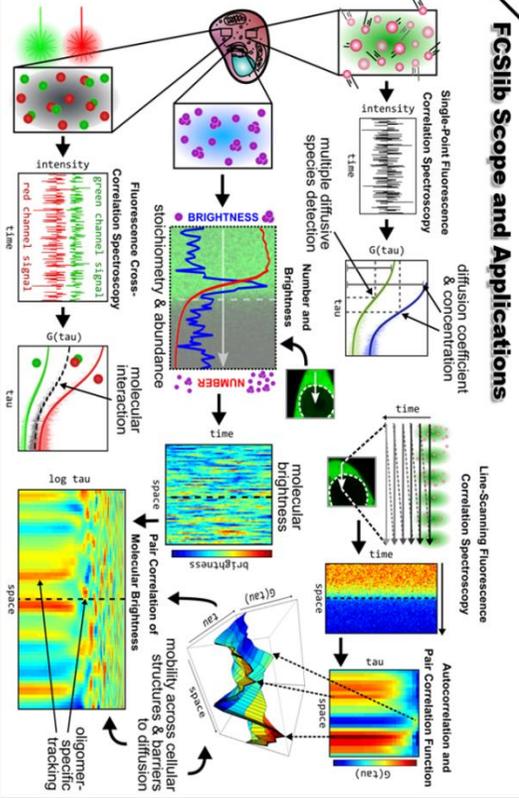
LNMA
LABORATORIO NACIONAL DE NANOCOPORTA ASOCIADO
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FCSlib: an open-source tool for fluorescence fluctuation spectroscopy analysis for mobility, number and molecular brightness in R

Linares A^{1*}, Pinto-Cámara R¹, Moreno D², Hernández H³, Martínez J¹, Rendón-Mancha J⁴, Wood C¹, Guerrero A¹

Summary Fluorescence fluctuation spectroscopy (FFS) comprises a set of non-invasive techniques with high spatial and temporal resolution, that allow to study molecular dynamics and interaction at the nanoscale. FCSlib is a ready available R package that provides multiple functions for FFS analysis performance (see Scope and Applications). Also, several tools for photobleaching correction, data detrending, visualization and data handling are included. Its performance has been tested and is comparable to other currently available tools such as PyCorrFit (Python), PAM (Matlab) and SimFCS (Gerton, LED).

FCSlib Scope and Applications



Single-Point Fluorescence Correlation Spectroscopy
intensity vs time
multiple diffusive species detection
diffusion coefficient & concentration
 $G(\tau)$ vs τ

Line-Scanning Fluorescence Correlation Spectroscopy
molecular brightness vs time
Pair Correlation Function
 $G(\tau)$ vs τ

Autocorrelation and Pair Correlation Function
space vs space
mobility across cellular structures & barriers to diffusion
oligomer-specific tracking

Additional Tools and Features Included in the Package

Custom data binning
 Full time series Binned

PSF length calculation
S, W, k

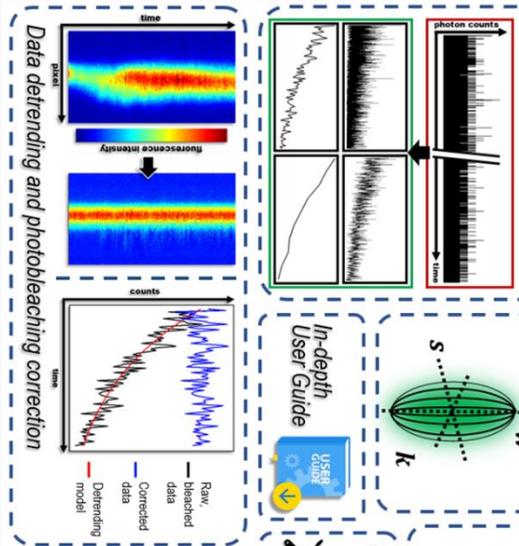
In-depth User Guide
USER GUIDE

Supported file formats
CSV, TXT, MAT, PDF

Custom-built physical model support
G(τ)

Dedicated site for documentation, sample data, updates and support
FCSlib @ GitHub

Data detrending and photobleaching correction

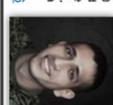


Raw, bleached data vs time
Corrected data vs time
Detrending model vs time

1 Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 4270 Cuernavaca, Morelos, México. **2** Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 4270 Cuernavaca, Morelos, México. **3** Departamento de Ciencias de la Computación, Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, México. **4** Centro de Investigación en Ciencias, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 42709 Cuernavaca, Morelos, México.

Contact | alejandro.linares@mail.lbi.unam.mx

<https://doi.org/10.1093/biointformatics/biaa8776>



Acknowledgements Work financially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Ciencia Básica 28223, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGA-PAP-2017-1422247, RP A., HH) were supported by CONACYT and DGA-P, during their undergraduate studies. A.L., J.M. were supported by CONACYT during his graduate studies. Microscopy equipment was provided and maintained through CONACYT grants 23507, 232108, 268581, 280487 and 279382.



March 4, 2021

Alejandro Linares
National Autonomous University of Mexico
Biotechnology Institute
Avenida Universidad 2001, Chamilpa
Cuernavaca, Morelos
62210
Mexico

Dear Alejandro Linares,

Thank you for participating in the 65th Annual Meeting of the Biophysical Society which was held February 22-26, 2021, virtually.

The Biophysical Society received and scheduled your abstract entitled, "FCSLIB: AN OPEN-SOURCE TOOL FOR FLUORESCENCE FLUCTUATION SPECTROSCOPY ANALYSIS FOR MOBILITY, NUMBER, AND MOLECULAR BRIGHTNESS IN R." to be presented at the meeting.

The meeting provided an opportunity for biophysicists and scientists in related disciplines to share their research, collaborate, and receive feedback on their research.

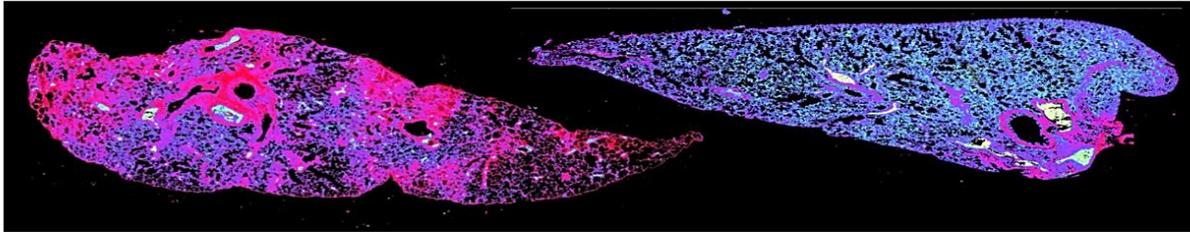
Our office has a record of your attendance at this meeting.

Sincerely yours,

A handwritten signature in black ink that reads "Jennifer L. Pesanelli".

Jennifer L. Pesanelli
Executive Officer

g. 3rd Annual Workshop in Advanced Microscopy and Biophotonics – Institut Pasteur de Montevideo



3rd Annual Workshop in Advanced Microscopy and Biophotonics

This is to certify that **ALEJANDRO LINARES** participated in the “**3rd Annual Workshop In Advanced Microscopy and Biophotonics**” held at Hospital de Clínicas & Institut Pasteur de Montevideo from November 22th to 26th, 2021.

Leonel Malacrida (PhD)
Head Advanced Bioimaging Unit
Institut Pasteur Montevideo // Universidad de la Republica



Referencias

- Abbe, E. (1874). A contribution to the theory of the microscope and the nature of microscopic vision. *Proc. Bristol Nat. Soc*, **1**, 200-261.
- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., & Ram, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*, **11**(7), 36-42.
- Allaire, J. (2012). RStudio: integrated development environment for R. *Boston, MA*, **770**(394), 165-171.
- baron Fourier, J. B. J. (1822). *Théorie analytique de la chaleur*. Chez Firmin Didot, père et fils.
- Bonder, J. F. (2015). Ecuaciones Diferenciales Parciales.
- Brown, R. (1828). XXVII. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *The Philosophical Magazine*, **4**(21), 161-173.
- Chen, Y., Müller, J. D., Ruan, Q., & Gratton, E. (2002). Molecular brightness characterization of EGFP in vivo by fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophysical journal*, **82**(1), 133-144.
- Chen, Y., Müller, J. D., So, P. T., & Gratton, E. (1999). The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophysical journal*, **77**(1), 553-567.
- Cheng, T. T. (1949). The normal approximation to the Poisson distribution and a proof of a conjecture of Ramanujan. *Bulletin of the American Mathematical Society*, **55**(4), 396-401.
- Chung, S. J., Miller, D. W., & de Weck, O. L. (2004). ARGOS testbed: study of multidisciplinary challenges of future spaceborne interferometric arrays. *Optical Engineering*, **43**(9), 2156-2167.
- Coates, C. (2011). New sCMOS vs. current microscopy cameras. *Biophotonics International*, **18**(5), 24-27.
- Coates, C. G., Denvir, D. J., McHale, N. G., Thornbury, K. D., & Hollywood, M. (2004). Optimizing low-light microscopy with back-illuminated electron multiplying charge-coupled device: enhanced sensitivity, speed, and resolution. *Journal of biomedical optics*, **9**(6), 1244-1253.
- Cutrale, F., Rodriguez, D., Hortigüela, V., Chiu, C.L., Otterstrom, J., Mieruszynski, S., Seriola, A., Larrañaga, E., Raya, A., Lakadamyali, M., Fraser, S.E., Martinez, E. & Ojosnegros, S. (2019). Using enhanced number and brightness to measure protein oligomerization dynamics in live cells. *Nature protocols*, **14**(2), 616-638.
- Dalal, R. B., Digman, M. A., Horwitz, A. F., Vetri, V., & Gratton, E. (2008). Determination of particle number and brightness using a laser scanning confocal microscope operating in the analog mode. *Microscopy research and technique*, **71**(1), 69-81.
- Davidovits, P., & Egger, M. D. (1969). Scanning laser microscope. *Nature*, **223**(5208), 831-831.
- Diekmann, R., Deschamps, J., Li, Y., Tschanz, A., Kahnwald, M., Matti, U., & Ries, J. (2021). Photon-free (s) CMOS camera characterization for artifact reduction in high-and super-resolution microscopy. *bioRxiv*.
- Di Rienzo, C., Gratton, E., Beltram, F., & Cardarelli, F. (2013). Fast spatiotemporal correlation spectroscopy to determine protein lateral diffusion laws in live cell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**(30), 12307-12312.
- Digman, M. A., & Gratton, E. (2009). Imaging barriers to diffusion by pair correlation functions. *Biophysical journal*, **97**(2), 665-673.
- Digman, M. A., & Gratton, E. (2011). Lessons in fluctuation correlation spectroscopy. *Annual review of physical chemistry*, **62**, 645-668.

- Digman, M. A., Brown, C. M., Sengupta, P., Wiseman, P. W., Horwitz, A. R., & Gratton, E. (2005). Measuring fast dynamics in solutions and cells with a laser scanning microscope. *Biophysical journal*, **89**(2), 1317-1327.
- Digman, M. A., Dalal, R., Horwitz, A. F. & Gratton, E., (2008) Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope. *Biophysical journal*, **94**, 2320–2332.
- Elson, E. L. (2011). Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future. *Biophysical journal*, **101**(12), 2855-2870.
- Fick, A. (1855). V. On liquid diffusion. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, **10**(63), 30-39.
- Gervasi, M. G., Xu, X., Carbajal-Gonzalez, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E., & Krapf, D. (2018). The actin cytoskeleton of the mouse sperm flagellum is organized in a helical structure. *Journal of cell science*, **131**(11).
- Hanser, B. M., Gustafsson, M. G., Agard, D. A., & Sedat, J. W. (2004). Phase-retrieved pupil functions in wide-field fluorescence microscopy. *Journal of microscopy*, **216**(1), 32-48.
- Harvey, J. E., & Ftaclas, C. (1995). Diffraction effects of telescope secondary mirror spiders on various image-quality criteria. *Applied Optics*, **34**(28), 6337-6349.
- Hebert, B., Costantino, S., & Wiseman, P. W. (2005). Spatiotemporal image correlation spectroscopy (STICS) theory, verification, and application to protein velocity mapping in living CHO cells. *Biophysical journal*, **88**(5), 3601-3614.
- Hirsch, M., Wareham, R. J., Martin-Fernandez, M. L., Hobson, M. P., & Rolfe, D. J. (2013). A stochastic model for electron multiplication charge-coupled devices—from theory to practice. *PLoS one*, **8**(1).
- Huang, F., Hartwich, T. M., Rivera-Molina, F. E., Lin, Y., Duim, W. C., Long, J. J., Uchil, P. D., Myers, J. R., Baird, M. A., Mothes, W., Davidson, M. W., Toomre, D. & Bewersdorf, J. (2013). Video-rate nanoscopy using sCMOS camera—specific single-molecule localization algorithms. *Nature methods*, **10**(7), 653-658.
- Ihaka, R., & Gentleman, R. (1996). R: a language for data analysis and graphics. *Journal of computational and graphical statistics*, **5**(3), 299-314.
- Karatzas I., Shreve S.E. (1998) Brownian Motion. In: Brownian Motion and Stochastic Calculus. *Graduate Texts in Mathematics*, vol **113**. Springer, New York, NY
- Kitamura, A., & Kinjo, M. (2018). State-of-the-Art fluorescence fluctuation-based spectroscopic techniques for the study of protein aggregation. *Int. J. Mol. Sc.*, **19**(4), 964.
- Kolin, D. L., & Wiseman, P. W. (2007). Advances in image correlation spectroscopy: measuring number densities, aggregation states, and dynamics of fluorescently labeled macromolecules in cells. *Cell biochemistry and biophysics*, **49**(3), 141-164.
- Lakowicz JR. Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2006). doi:10.1007/978-0-387-46312-4
- Landau, H. J. (1967). Sampling, data transmission, and the Nyquist rate. *Proceedings of the IEEE*, **55**(10), 1701-1706.
- Lin, R., Clowsley, A. H., Jayasinghe, I. D., Baddeley, D., & Soeller, C. (2017). Algorithmic corrections for localization microscopy with sCMOS cameras-characterisation of a computationally efficient localization approach. *Optics express*, **25**(10), 11701-11716.
- Litwiller, D. (2005). CMOS vs CCD: Maturing technologies, maturing markets. *Photonics Spectra*.
- Liu, S., Mlodzianoski, M. J., Hu, Z., Ren, Y., McElmurry, K., Suter, D. M., & Huang, F. (2017). sCMOS noise-correction algorithm for microscopy images. *Nature methods*, **14**(8), 760.

- Long, F., Zeng, S., & Huang, Z. L. (2012). Localization-based super-resolution microscopy with an sCMOS camera Part II: Experimental methodology for comparing sCMOS with EMCCD cameras. *Optics Express*, **20**(16), 17741-17759.
- Luisier, F., Blu, T., & Unser, M. (2010). Image denoising in mixed Poisson–Gaussian noise. *IEEE Transactions on image processing*, **20**(3), 696-708.
- Lukinavičius, G., Reymond, L., D'este, E., Masharina, A., Göttfert, F., Ta, H., Güther, A., Fournier, M., Rizzo, S., Waldmann, H., Blaukopf, C., Sommer, C., Gerlich, D.W., Arndt, H., Hell, S.W. & Johnsson, K. (2014). Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nature methods*, **11**(7), 731-733.
- Magde, D., Elson, E., & Webb, W. W. (1972). Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters*, **29**(11), 705.
- Malacrida, L., Rao, E., & Gratton, E. (2018). Comparison between iMSD and 2D-pCF analysis for molecular motion studies on *in vivo* cells: The case of the epidermal growth factor receptor. *Methods*, **140**, 74-84.
- Mandracchia, B., Hua, X., Guo, C., Son, J., Urner, T., & Jia, S. (2020). Fast and accurate sCMOS noise correction for fluorescence microscopy. *Nature communications*, **11**(1), 1-12.
- Melak, M., Plessner, M., & Grosse, R. (2017). Actin visualization at a glance. *Journal of cell science*, **130**(3), 525-530.
- Miguel-Ramirez, R. A., Velasco-Felix, A. G., Pinto-Cámara, R., Wood, C. D., & Guerrero, A. (2017). In Fluorescence Fluctuation Spectroscopy in Living Cells. *Microscopy*.
- Milo, R., & Phillips, R. (2015). Cell biology by the numbers. *Garland Science*.
- Mullikin, J. C., van Vliet, L. J., Netten, H., Boddeke, F. R., Van der Feltz, G., & Young, I. T. (1994, May). Methods for CCD camera characterization. In Image Acquisition and Scientific Imaging Systems (Vol. **2173**, pp. 73-84). *International Society for Optics and Photonics*.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., & Behringer, R. (2006). Quick and humane sacrifice of a mouse by cervical dislocation. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2006**(1), pdb-prot4357.
- Ngiam, J., Chen, Z., Bhaskar, S., Koh, P., & Ng, A. (2011). Sparse filtering. *Advances in neural information processing systems*, **24**, 1125-1133.
- Nolan, R., Alvarez, L. A., Elegheert, J., Iliopoulou, M., Maria Jakobsdottir, G., Rodriguez-Muñoz, M., Radu Aricescu, A. & Padilla-Parra, S. (2017). nandb—number and brightness in R with a novel automatic detrending algorithm. *Bioinformatics*.
- Nolan, R., Iliopoulou, M., Alvarez, L., & Padilla-Parra, S. (2018). Detecting protein aggregation and interaction in live cells: A guide to number and brightness. *Methods*, **140**, 172-177.
- Ojosnegros, S., Cutrale, F., Rodríguez, D., Otterstrom, J. J., Chiu, C. L., Hortigüela, V., Tarantino, C., Seriola, A., Mieruszynski, S., Martínez, E., Lakadamyali, M., Raya, A. & Fraser, S. E. (2017). Eph-ephrin signaling modulated by polymerization and condensation of receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**(50), 13188-13193.
- Paddock, S. W. (1999). Confocal laser scanning microscopy. *Biotechniques*, **27**(5), 992-1004.
- Paul, M. D., Rainwater, R., Zuo, Y., Gu, L., & Hristova, K. (2021). Probing Membrane Protein Association Using Concentration-Dependent Number and Brightness. *Angewandte Chemie*, **133**(12), 6577-6582.
- Petersen, N. O., Höddelius, P. L., Wiseman, P. W., Seger, O., & Magnusson, K. E. (1993). Quantitation of membrane receptor distributions by image correlation spectroscopy: concept and application. *Biophysical journal*, **65**(3), 1135-1146.

- Pinto-Cámara, R., Linares, A., Moreno-Gutiérrez, D.S., Hernández, H.O., Martínez-Reyes, J.D., Rendón-Mancha, J.M., Wood, C.D. & Guerrero, A. (2021). FCSlib: an open-source tool for fluorescence fluctuation spectroscopy analysis for mobility, number and molecular brightness in R. *Bioinformatics*, **37**(13), 1930-1931.
- Qian, H., & Elson, E. L. (1990). On the analysis of high order moments of fluorescence fluctuations. *Biophysical journal*, **57**(2), 375-380.
- Robbins, M. S., & Hadwen, B. J. (2003). The noise performance of electron multiplying chargecoupled devices. *IEEE transactions on electron devices*, **50**(5), 1227-1232.
- Ross, J. A., Digman, M. A., Wang, L., Gratton, E., Albanesi, J. P., & Jameson, D. M. (2011). Oligomerization state of dynamin 2 in cell membranes using TIRF and number and brightness analysis. *Biophysical journal*, **100**(3), L15-L17.
- Sankaran, J., Balasubramanian, H., Tang, W. H., Ng, X. W., Röllin, A., & Wohland, T. (2021). Simultaneous spatiotemporal super-resolution and multi-parametric fluorescence microscopy. *Nature communications*, **12**(1), 1-14.
- Tubbs, R. N. (2003). Lucky Exposures: Diffraction limited astronomical imaging through the atmosphere. *arXiv preprint astro-ph/0311481*.
- Unruh, J. R., & Gratton, E. (2008). Analysis of molecular concentration and brightness from fluorescence fluctuation data with an electron multiplied CCD camera. *Biophysical journal*, **95**(11), 5385-5398.
- Valencia, D. P., & González, F. J. (2011). Understanding the linear correlation between diffusion coefficient and molecular weight. A model to estimate diffusion coefficients in acetonitrile solutions. *Electrochemistry Communications*, **13**(2), 129-132.
- Van Kampen, N. G. (1982). The diffusion approximation for Markov processes. *Thermodynamics & kinetics of biological processes*, 181-195.
- von Diezmann, A., Shechtman, Y., & Moerner, W. E. (2017). Three-dimensional localization of single molecules for super-resolution imaging and single-particle tracking. *Chemical reviews*, **117**(11), 7244-7275.
- Youker, R. T., & Teng, H. (2014). Measuring protein dynamics in live cells: protocols and practical considerations for fluorescence fluctuation microscopy. *Journal of biomedical optics*, **19**(9), 090801.
- Yu, L., Lei, Y., Ma, Y., Liu, M., Zheng, J., Dan, D., & Gao, P. (2021). A Comprehensive Review of Fluorescence Correlation Spectroscopy.
- Zhang, Z., Wang, Y., Piestun, R., & Huang, Z. L. (2021). Characterizing and correcting camera noise in back-illuminated sCMOS cameras. *Optics Express*, **29**(5), 6668-6690.