

# Implementación de Lock-in digital para imágenes de microscopía

Juan Camilo López  
Universidad de Los Andes  
(Dated: 19 de julio de 2022)

En el presente proyecto se presenta el funcionamiento de un lock-in amplifier y se demuestra su funcionamiento para hacer multiplexing de señales en el contexto de microscopía. Se simula una señal sinusoidal en el contexto de DMD (digital micromirror device) y se estudia la eficacia del lock in en dichas señales.

## I. INTRODUCCIÓN

En el departamento de física de la Universidad de los Andes tenemos microscopios de fluorescencia con hoja de luz (LSFM por sus siglas en inglés), estos nos permiten tomar imágenes con alta resolución espacio-temporal en muestras biológicas minimizando la fototoxicidad sobre ellas. El procedimiento general para adquirir imágenes es iluminar transversalmente el plano focal del objetivo con un láser en forma laminar (hoja de luz), de tal forma que solo se produce fluorescencia de la región enfocada (figura 1). Para adquirir una imagen en 3D se escanea rápidamente la hoja de luz y el plano focal lo largo de toda la muestra tomando fotos en cada paso, después se procesan todos los planos para reconstruir una imagen 3D de la muestra en un instante determinado. Para lograr esto se utilizan objetivos con alta apertura numérica (NA) que garanticen que el grosor efectivo del campo de visión (FOV) sea considerablemente menor que la muestra, para que al escanear a lo largo de la muestra se registren suficientes volúmenes para reconstruir una imagen coherente de la muestra.

En muchos estudios es necesario observar la muestra durante un tiempo determinado, por lo tanto, para obtener un vídeo en 3D se repite el proceso de escaneo a lo largo de la muestra, tal que cada volumen capturado representa un cuadro del vídeo. Sin embargo hay que tener en cuenta que cada plano tiene que tener un tiempo de exposición mínimo, lo que limita drásticamente el número de cuadros por segundo que pueden ser capturados por el microscopio, y por esta razón es difícil seguir procesos dinámicos y rápidos dentro de la muestra.

Uno de los métodos más exitosos para incrementar la resolución espacial y temporal en el campo de microscopía es el uso de iluminación estructurada. En esta categoría entran todas las técnicas que usen un SLM (spatial light modulator) para crear patrones de iluminación sinusoidal de alta frecuencia CITA!. Entre los SLM más populares se encuentran los DMD (digital micromirror device), los cuales constan de miles de micro espejos controlados electrónicamente, estos se usan para modular la luz de la iluminación cuando esta es reflejada sobre el DMD. El uso de DMDs ha demostrado tener una mayor resolución lateral y un mejor seccionamiento óptico que otros tipos de iluminación convencional, a su vez entregando una menor dosis de radiación sobre la muestra [2].

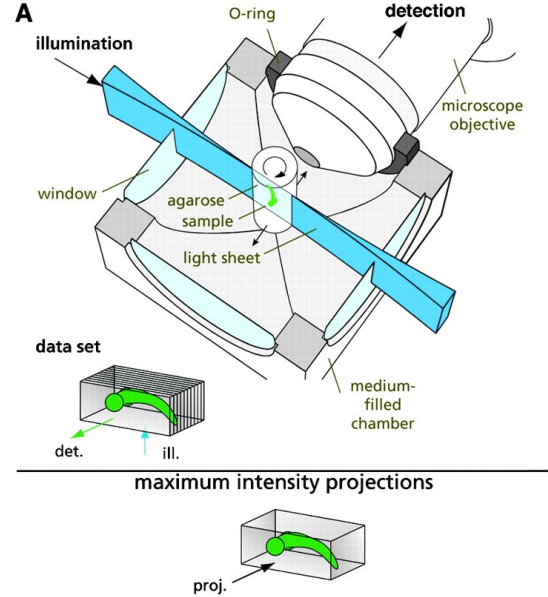


Figura 1. Esquema de la iluminación y detección de un microscopio de fluorescencia de hoja de luz. La detección es ortogonal a la iluminación permitiendo un gran seccionamiento óptico, por lo tanto las proyecciones de intensidades de cada plano permiten crear una imagen en 3D. Imagen tomada de [1]

En el laboratorio Q505 tenemos un microscopio tenemos un microscopio de hoja de luz con un DMD en la iluminación, este nos permite modular el láser para irradiar toda la muestra al mismo tiempo con iluminación sinusoidal con diferentes frecuencias para cada plano focal en el eje Z, con esto nos aseguramos que la respuesta en fluorescencia de cada plano sea coherente con la frecuencia de la señal de entrada. De esta manera, queremos saber si es viable recolectar todas las respuestas en fluorescencia a la vez según su profundidad, haciéndolas pasar por el sensor de la cámara como una señal compuesta, esto se conoce como multiplexing de frecuencias. La idea de esto es poder reducir la dimensionalidad de la información necesaria para poder reconstruir una imagen completa en 3D, ya que es posible filtrar la señal de salida para recuperar todas las señales que la componen según sus frecuencias, de esta forma podemos recuperar la información de la fluorescencia en cada plano acorde a su profundidad tan solo con una foto.

Para poder desarrollar este proyecto a futuro, queremos saber si es posible recuperar las señales de la fluorescencia de cada plano usando un amplificador lock-in digital. Por ende, para decidir si acercamiento vale o no la pena, mi proyecto de laboratorio intermedio consintió en implementar un amplificador Lock-in digital y probar su funcionamiento en datos simulados de iluminación sinusoidal generada por DMD.

## II. ESTRUCTURA DE LA SIMULACIONES

Se usó el lenguaje de programación Python para realizar la implementación del lock-in amplifier, y las simulaciones de la iluminación sinusoidal para probar el funcionamiento de este. Así mismo, todas las gráficas, y los datos artificiales fueron generados en Python, haciendo uso de las librerías NumPy, Pandas y matplotlib.

### A. Lock-in amplifier

Se implementó un Lock-in que realiza el filtrado de señales simuladas. Este recibía como entrada la señal de referencia y la señal de entrada que queremos recuperar mezclada con un ruido artificial, ambas en forma de np.array. El Lock-in realizaba el filtrado y arrojaba la amplitud de la señal de entrada siempre y cuando su frecuencia sea igual a la de la señal de referencia. Por simplicidad, todas las señales procesadas por el Lock-in estaban en fase. La señal de referencia la podemos escribir como:

$$U_R(t) = A_R \sin(\omega_R t) \quad (1)$$

El Lock-in se aprovecha de la ortogonalidad de las funciones sinusoidales, de tal forma que el promedio temporal entre dos señales con frecuencias  $f_1 \neq f_2$  es 0. Si por el contrario,  $f_1 = f_2$  la integral del promedio temporal será diferente de 0, y devuelve el promedio de las amplitudes [3]. Esto mismo lo aplicamos con las señal de referencia  $U_R(t)$  y la señal de entrada  $U_{in}$ , tal que para un tiempo  $\tau \gg 2\pi/\omega_R$  se cumple que:

$$U_{out} = \frac{1}{T} \int_0^\tau U_R(t) U_{in}(t) dt \quad (2)$$

tal que si  $f_1 = f_2$  :

$$U_{out} = \frac{1}{2} A_R A_{in} \quad (3)$$

Donde  $A_{in}$  es la amplitud de la señal  $U_{in}(t)$  que queremos recuperar entre el ruido. Cabe resaltar que en la implementación de la ecuación 2 se usó un promedio de todos los puntos que componen cada señal debido a que son discretas.

### B. Simulación de iluminación gaussiana en 2D

Para tener una imagen de referencia en el contexto de microscopia, se generó una imagen 64x64 cuyos píxeles poseían una intensidad sacada de una curva gaussiana en dos dimensiones, tal como se muestra a continuación:

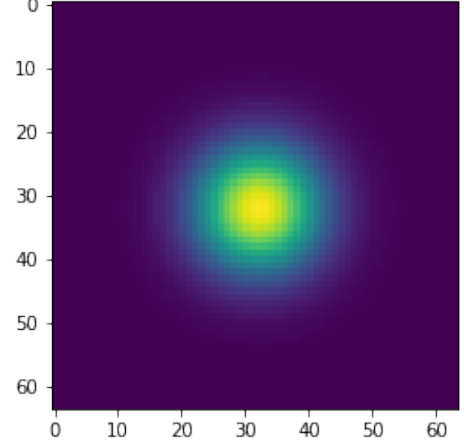


Figura 2. Iluminación sinusoidal de dos dimensiones con parámetros arbitrarios. La curva esta normalizada, de tal forma que los valores de la intensidad de cada píxel están acotados entre 0 y 1.

El propósito de esta imagen es tener un punto de partida para inicializar las amplitudes de las señales artificiales, de esta forma podemos poder añadirle ruido a cada una para posteriormente realizar un filtrado, de esta tenemos un punto de comparación para calificar el desempeño del filtro.

### C. Simulación iluminación sinusoidal con ruido y multiplexing de frecuencias

Para demostrar el funcionamiento del lock-in en el contexto de multiplexing de señales se diseñó el siguiente procedimiento:

1. A cada píxel de la figura 2 le asociamos una señal sinusoidal señales sinusoidales para un tiempo  $\tau \gg 2\pi/f$ , las amplitudes fueron inicializadas entre 0 y 1 de acuerdo con el valor de intensidad de su respectivo píxel. La frecuencia de cada señal esta dada por la formula  $f_{ij} = (j + 1)Hz$ , de esta forma cada fila de píxeles en la imagen 2 tiene la misma frecuencia.
2. A cada punto de cada señal sinusoidal le agregamos un ruido gaussiano de aproximadamente un orden de magnitud mayor a la amplitud de dicha señal. A continuación se muestra un ejemplo de una de las señales dentro con su respectivo

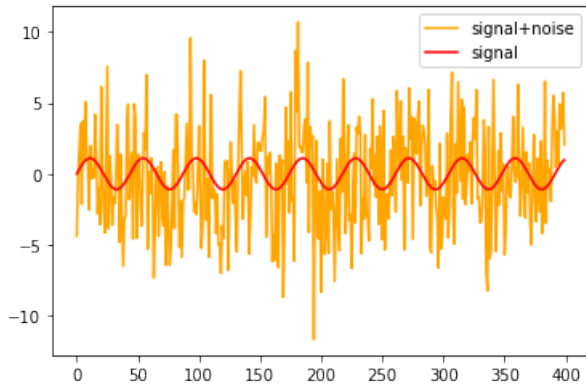


Figura 3. Señal sinusoidal antes y después de haberle aplicado el ruido gaussiano. La señal representa al píxel en la posición  $i = 22$  y  $j = 21$  en la imagen de la figura 2.

3. Sumamos todas las filas de la matriz para tener un vector fila de largo 64, donde cada pixel representa la mezcla de 64 señales ruidosas con un rango de frecuencias entre 1 y 65 Hertz, de esta forma colapsamos una dimensión de la imagen original, pasando de  $64 \times 64$  a  $1 \times 64$ . Esto lo hicimos con el propósito de demostrar que es posible reducir la dimensionalidad de la información, reduciendo así el numero de canales necesarios (en el contexto de CMOS cada píxel representa un sensor de la cámara) para posteriormente recuperar cada señal con el lock-in y poder reconstruir la imagen original. La figura 4 representa una ilustración de como quedaría la imagen de la figura 2 al sumar todas sus filas.

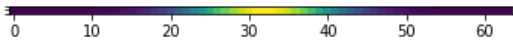


Figura 4. Imagen de la suma de las intensidades de las filas píxeles de la imagen.

#### D. Simulación de iluminación sinusoidal con un DMD

Se simuló la señal recibida por una cámara CMOS frente a iluminación sinusoidal con amplitudes según el número de fotones que llegan al sensor en un tiempo de exposición de 10 ms, esto se realizó para frecuencias de 4, 8, 16 y 32 hertz, cada una en un intervalo de tiempo de 0 a 1 segundo. A cada una de estas señales se le añadió un ruido de Poisson ó shot noise relacionado con las discrepancias en el conteo de fotones durante el tiempo de exposición, este error tiene un orden de  $\sqrt{n}$ , siendo  $n$  el número de fotones que en promedio deben llegar en ese intervalo de tiempo. La figura 5 muestra un ejemplo de una de las señales generadas para una frecuencia de 4hz y con una amplitud de  $n = 50$  fotones, y su respectiva señal teniendo en cuenta el ruido.

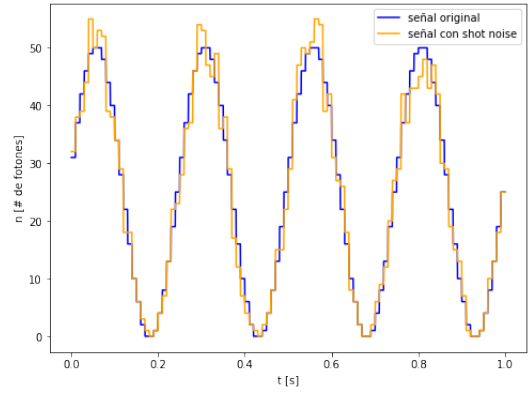


Figura 5. Ejemplo de la de la detección de fotones del sensor de una cámara frente a iluminación sinusoidal con frecuencia de 4 hz y tiempo de exposición de 10 ms. Los conteos de fotones son discretos y representados por números enteros, los cuales están sujetos a un ruido estadístico.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Para demostrar el funcionamiento del lock-in se filtraron todas las señales sinusoidales de cada canal del vector fila de la figura 4, para esto primero se inicializó una matriz  $64 \times 64$  con las de señales de referencia de amplitud 1, y con las frecuencias respectivas según  $f_{ij} = j + 1$  hertz. Usando el broadcasting de Python para el producto entre la matriz ( $1 \times 64$ ) y la matriz de señales de referencia ( $64 \times 64$ ) obtuvimos una nueva matriz  $64 \times 64$ , la cual contiene todas las señales originales multiplicadas con su respectiva señal de referencia. Aplicando un promedio temporal sobre cada señal mixta se obtuvo la siguiente imagen:

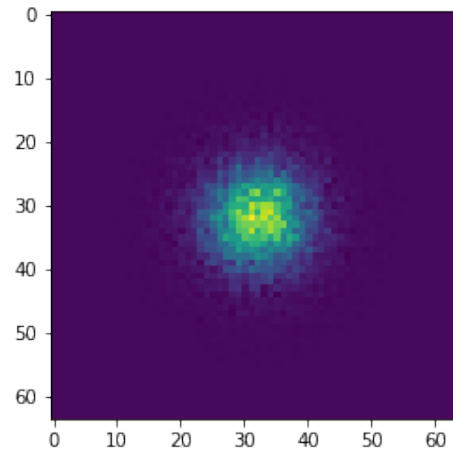


Figura 6. Imagen de referencia recuperada por medio del lock-in implementado.

La imagen recuperada nos muestra el poder del

lock-in para realizar multiplexing de señales en ambientes extremadamente ruidosos, si bien la calidad de imagen se vio deteriorada por el ruido, la imagen de referencia de la figura 2 sigue siendo reconocible después del lock-in.

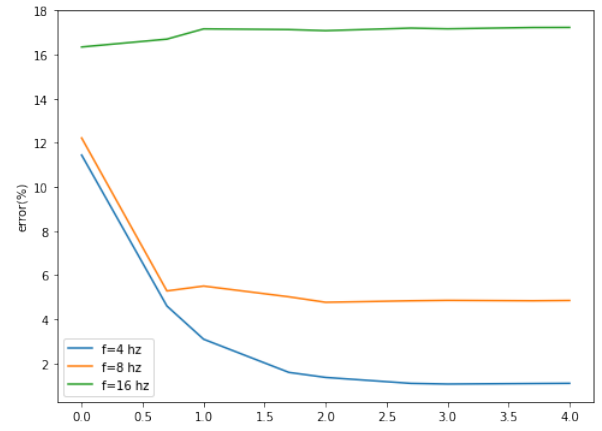


Figura 7. Grafica del error relativo promedio entre la amplitud real de la señal y la amplitud recuperada por el lock-in, para 3 frecuencias distintas.

De la grafica 7 nos damos cuenta que el tiempo de exposición escogido es bueno par procesar señales con frecuencias menores a 8 hertz, y que para gran numero de fotones el lock-in mejora su funcionamiento considerablemente.

#### IV. CONCLUSIONES

1. Pudimos observar el poder del lock-in para hacer multiplexing de señales en ambientes ruidosos. Esto se demostró simulando una imagen 2D, pero en el contexto de los DMD uno puede realizar exactamente el mismo procedimiento para colapsar un volumen 3D a una matriz (¡Cuyas entradas representan cada sensor de la CMOS!).
2. Para determinar la eficiencia del lock-in para recuperar amplitudes de señales generadas por iluminación sinusoidal, se aplicó el lock-in para extraer las amplitudes de las señales simuladas con frecuencias de 4,8 y 16 hertz, con intensidades entre 1 y 10000 conteos. Nos dimos cuenta que la amplitud recuperada por el lock-in fluctuaba para cada intento debido a la aleatoriedad del ruido, por ende, cada señal se simuló 200 veces y se sacó una media entre el error relativo para cada caso. A continuación podemos ver las relaciones encontradas entre el error relativo vs el logaritmo del conteo de fotones  $\log_{10}(n)$  :
3. Pudimos observar que para conteos grandes de fotones el error del lock-in disminuía drásticamente, esto pone en evidencia el comportamiento de la función  $f(x) = \sqrt{n}9$ , y de como el numero de conteos se empiezan a concentrar rápidamente en la media en una distribución de Poisson.

---

[1] N. Scherf and J. Huisken, Nature Biotechnology **33**, 88 (2015).  
[2] N. Chakrova, B. Rieger, and S. Stallinga, Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXII (2015), doi.10.1117/12.2077677.

[3] J. M. Maxson, Lehigh University Department of Physics , 1 (2007).

Aprobado: