

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS
Departamento de Óptica y Estructura de la Materia



TESIS DOCTORAL

**Análisis difraccional de objetos microscópicos : aplicación a
la extracción de los parámetros morfológicos que
caracterizan a una célula biológica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Margarita Chevalier del Río

Madrid, 2015

R. 61424.

DE 537.533.35
CHE

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Físicas
Departamento de Optica y Estructura de la Materia

**ANALISIS DIFRACCIONAL DE OBJETOS
MICROSCOPICOS: APLICACION A LA
EXTRACCION DE LOS PARAMETROS
MORFOLOGICOS QUE CARACTERIZAN A UNA
CELULA BIOLOGICA**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5319780807

Margarita Chevalier del Río

Madrid, 1988

Colección Tesis Doctorales. N.º 208/88

6 14383871

• **Margarita Chevalier del Río**

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 - 28015 Madrid
Madrid, 1988
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-7970-1988**

**DEPARTAMENTO DE OPTICA Y ESTRUCTURA DE LA MATERIA
FACULTAD DE CIENCIAS FISICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**ANALISIS DIFRACCIONAL DE OBJETOS MICROSCOPICOS:
APLICACION A LA EXTRACCION DE LOS PARAMETROS MORFOLOGICOS
QUE CARACTERIZAN A UNA CELULA BIOLOGICA**

**DIRECTOR:
Dra.D^a. M^a LUISA CALVO PADILLA**

**MEMORIA PRESENTADA POR MARGARITA CHEVALIER DEL RIO
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS FISICAS**

MADRID, 1985

AGRADECIMIENTOS

El tema de trabajo de esta tesis doctoral ha sido sugerido por Maria Luisa Calvo Padilla. A ella le debo pues, el haber despertado mi inquietud hacia un campo de investigación de tanto interés, las muchas horas que me ha dedicado, las muchas sugerencias que ha aportado al trabajo y, en definitiva su colaboración.

Mi estancia en el Departamento de Física de la Universidad de Bremen me permitió conocer al profesor Boseck. El fué quien me introdujo en las técnicas de filtrado dinámico y en otras técnicas de procesado igualmente interesantes. Mi paso por su Departamento fué de gran interés tanto científico como humano. "Ich solle dem professor Boseck Ihre Hilfe danken".

La elaboración de este trabajo no hubiera sido posible sin Carmen Carreras y, no sólo por la importancia que tiene para mí su colaboración, sino por la enorme paciencia que ha demostrado al mecanografiar este texto: 52 tablas, 52 gráficas y 250 páginas. No existen palabras para expresar mi agradecimiento.

A Manuel Yuste le agradezco sus valiosas aportaciones tanto científicas como técnicas de indudable valor en la elaboración de este texto.

Con Pablo Méndez he podido mantener valiosas discusiones en la interpretación de muchos resultados. Le agradezco su entrañable amistad.

No quisiera olvidar a todos mis compañeros del Departamento de Óptica y de la Cátedra de Física Médica por su inestimable amistad y ayuda.

Este trabajo ha sido realizado en el marco del acuerdo de colaboración existente entre el Departamento de Óptica y la Cátedra de Física Médica de la Universidad Complutense. Este acuerdo se firmó siendo el profesor Durán Director del Departamento de Óptica. A él y al profesor Vañó quiero agradecerles su apoyo y confianza.

M. Chevalier

<u>INDICE</u>	<u>Pag.</u>
- INTRODUCCION.....	1
- <u>Capítulo 1:</u> "TRANSMISION Y ABSORCION DE RADIACION POR UNA CELULA BIOLOGICA: FUNDAMENTOS TEORICOS":	
1.1.- Introducción.....	7
1.2.- Aproximación eikonal.....	8
1.3.- Función de transmisión óptica.....	11
1.4.- Función de transmisión óptica asociada a una célula biológica.....	16
1.5.- Amplitud de scattering tridimensional y aproximación eikonal.....	22
1.5.1.- Sección eficaz total: Intensidad difractada..	26
Bibliografía del Capítulo 1.....	29
- <u>Capítulo 2:</u> "ANALISIS DIFRACCIONAL: RESPUESTA EN EL PLANO DE FOURIER":	
2.1.- Introducción.....	30
2.2.- Respuesta en el plano de Fourier.....	31
2.3.- Efecto del desplazamiento del núcleo sobre la respuesta en el plano de Fourier.....	38
2.4.- Particularidades en la función de transmisión: Variaciones de la respuesta en el plano de Fourier...	41
2.4.1.- La célula como objeto de fase.....	42
2.4.1.1.- Efecto del desplazamiento del núcleo.....	45
2.4.2.- La célula como objeto de amplitud.....	46
2.4.2.1.- Efecto del desplazamiento del núcleo.....	48
2.5.- Aproximaciones para valores de fase pequeños.....	49
2.5.1.- Caso general.....	49
2.5.2.- Caso de fase.....	52
Bibliografía del Capítulo 2.....	55
- <u>Capítulo 3:</u> "ANALISIS NUMERICO":	
3.1.- Introducción.....	56
3.2.- Condiciones generales.....	57

	<u>Pag.</u>
3.3.- Caso general.....	58
3.3.1.- Núcleo centrado.....	58
3.3.2.- Efecto debido al desplazamiento del núcleo respecto del centro de simetría.....	76
3.4.- Caso de fase.....	100
3.4.1.- Núcleo centrado.....	100
3.4.2.- Efecto del desplazamiento del núcleo respecto del centro de simetría.....	117
3.5.- Caso de amplitud.....	130
3.5.1.- Núcleo centrado.....	130
3.5.2.- Efecto del desplazamiento del núcleo con respecto al centro de simetría.....	141
3.6.- Aproximaciones para valores de fase pequeños.....	150
3.6.1.- Caso general.....	150
3.6.2.- Caso de fase.....	176
3.7.- Conclusiones generales sobre el análisis numérico...	184
Bibliografía del Capítulo 3.....	187
- <u>Capítulo 4: "DISPOSITIVOS Y RESULTADOS EXPERIMENTALES. COMPARACION CON EL MODELO TEORICO":</u>	
4.1.- Introducción.....	188
4.2.- Descripción del dispositivo experimental.....	190
4.3.- Descripción del objeto.....	190
4.4.- Descripción de los resultados experimentales.....	191
4.5.- Comparación con los resultados teóricos.....	201
4.5.1.- Cálculo de la función de transmisión asociada a una transparencia.....	201
4.5.2.- Resultados numéricos.....	204
Bibliografía del Capítulo 4.....	209
- <u>Capítulo 5: "FILTRADO ESPACIAL DINAMICO. INTERPRETACION Y APLICACIONES":</u>	
5.1.- Introducción.....	210
5.2.- Técnicas de filtrado estático. Discusión y resul- tados experimentales.....	211
5.3.- Filtrado de frecuencias espaciales dinámico. Descripción matemática.....	217

	<u>Pag.</u>
5.3.1.- Registro coherente.....	217
5.3.2.- Registro incoherente.....	218
5.3.3.- Expresión final del término de inter- ferencia de la Eq. (5.13).....	220
5.3.4.- Resultados experimentales.....	221
5.4.- Conclusiones.....	225
Bibliografía del Capítulo 5.....	227
- CONCLUSIONES GENERALES.....	228
- APENDICE A.....	230
- APENDICE B.....	233
- APENDICE C.....	236
- APENDICE D.....	239
- APENDICE E.....	242

INTRODUCCION.

La complejidad de los problemas que presentan muchas de las investigaciones actuales requieren de la participación de especialistas en diversos campos, que aporten sus conocimientos en la búsqueda de soluciones.

En la actualidad, es innegable el éxito de investigaciones donde la interdisciplinariedad ha jugado un papel determinante. Tanto es así, que cada vez son más los temas de trabajo que se abordan bajo esta perspectiva.

El estudio de células biológicas es una muestra de este tipo de investigaciones. En los últimos años, biólogos, matemáticos, químicos, físicos, médicos, etc, han aportado sus experiencias en el desarrollo de técnicas que han permitido profundizar en el conocimiento de las estructuras biológicas.

En la determinación de la morfología celular se han usado técnicas de Microscopía electrónica (Boseck, S., 1981), que requieren grandes esfuerzos de investigación punta, para conseguir elevar el poder de resolución hasta límites convenientes de análisis. Las imágenes obtenidas con estas técnicas pueden ser digitalizadas y analizadas numericamente. En estos casos, es necesaria la aplicación de modernas técnicas de tratamiento de información (Santisteban, A. et al., 1981) tanto digitales como analógicas, y el uso de avanzados resultados matemáticos en el procesado de los datos.

Los esfuerzos que se realizan en este campo no sólo tienen por objeto profundizar en la morfología celular, sino que, también, pretenden conocer las variaciones que sufren las células cuando son atacadas por agentes patógenos o físicos. Los resultados de estos trabajos son de interés en el campo del diagnóstico, y han dado lugar al desarrollo de complejas técnicas físicas, químicas y matemáticas. Es claro que tanto la aportación inicial de elementos de estudio, como la explotación de los resultados, ha de hacerse desde la Biología o la Medicina (Catsimpoilas, N., 1982).

Muchas de estas técnicas presentan la desventaja de tener que manipular el objeto para su análisis. Por ejemplo, la utilización de la Microscopía electrónica conlleva la preparación adecuada de las muestras para que puedan ser observadas. Por otra parte, la interacción del haz de electrones con el espécimen biológico produce alteraciones estructurales en el mismo que son irreversibles en el proceso del análisis. Otras técnicas, como son las derivadas de las medidas eléctricas, inducen modificaciones en la estructura celular. Este hecho deriva de las propiedades conductoras que presenta la membrana celular, dando lugar a un campo eléctrico parásito que viene a modificar el análisis de la señal eléctrica (Grover, N.B. et al, 1969, 1972).

La utilización de técnicas de inmunofluorescencia está siendo utilizada en la actualidad para el estudio de variaciones estructurales localizadas en determinadas zonas de una célula así como de diferenciación celular (Hardy, R.R. et al., 1982). Si bien es una técnica de resultados satisfactorios se necesitan procedimientos de experimentación altamente sofisticados. Es, pues, importante la búsqueda de técnicas experimentales no tan complejas y que requieran métodos de análisis que puedan ser abordados con modelos matemáticos de más sencillo tratamiento. En este sentido, los métodos ópticos no destructivos parecen ser los que dan lugar a una alteración mínima y, por tanto, son una alternativa importante en la aplicación a métodos de diferenciación morfológica (Almeida, S.P. et al., 1977).

Entre los métodos ópticos, el scattering de luz ha sido recientemente desarrollado como técnica muy sensible al tamaño, forma e índice de refracción de objetos cuyas dimensiones sean comparables a la de la longitud de onda de la radiación incidente, como es el caso de los objetos biológicos (Ishimaru, A., 1978). La teoría de Mie describe la intensidad total del campo de scattering, en el cual está contenida la información sobre el tamaño e índice de refracción del objeto (Kerker, M., 1969). La aplicación al estudio de células biológicas requiere la introducción de un modelo matemático que se establece al considerar que éstas son asimilables a una esfera constituida por dos capas concéntricas, la más

interna representaría al núcleo, y la más externa, al citoplasma. Este modelo teórico (Wyatt, P.F., 1968; Mullaney, P.F. et al., 1969) ha sido utilizado como test permitiendo el diseño de detectores específicos. Experimentalmente, el ángulo bajo el cual se realiza la detección es el parámetro del cual depende la información. Así, en el scattering hacia delante ($0^\circ \leq \theta \leq 20^\circ$) esta técnica es sensible a objetos cuyos diámetros están comprendidos entre 8 y 20 μm y a variaciones en el índice de refracción del núcleo y del citoplasma. En el scattering hacia atrás ($\theta = 180^\circ$) se obtiene información sobre la membrana de la célula, siendo ésta una zona de máxima sensibilidad a pequeños cambios en la morfología del objeto (Meyer, R.A., 1977). En la detección a 90° se obtiene información de objetos cuyas dimensiones están comprendidas entre 3 y 30 μm . La respuesta que se obtiene es tres órdenes de magnitud inferior a la obtenida en la dirección hacia delante. Junto a las ventajas que este método presenta, debido a su alta sensibilidad, existe una dificultad en la detección de la señal por ser ésta muy débil. Como consecuencia, la interpretación de los resultados presenta graves inconvenientes al hacerse importante la señal de ruido de fondo del fotomultiplicador.

El procesado óptico lineal de la imagen es otro método que presenta la ventaja de ser no destructivo, permitiendo hacer estudios "in vivo" de las células biológicas. A esto hay que añadir la rapidez operativa así como la obtención directa de la respuesta en forma de imagen óptica, detectable por muy diversos métodos. En el estudio "in vivo" se obtiene información del espécimen biológico en tiempo real, mientras que del estudio de réplicas fotográficas se conoce la información de cierto tipo de imagen del objeto. Las técnicas de difracción y filtrado óptico de frecuencias espaciales, ampliamente aplicadas en la actualidad a otros campos de la Física (Bescós, J. y Santamaría, J., 1982), se presentan como prometedoras en este nuevo campo de la Bio-óptica y aparecen de gran interés si se conjugan con procesos adicionales de la señal.

En particular, el análisis de la distribución de intensidad de difracción permite obtener información del objeto difrac

tante. Cuando éste es heterogéneo, el estudio del patrón de difracción se hace más complejo. Sin embargo, cuando los distintos componentes del objeto presentan la misma simetría, se facilita la obtención de información del mismo a partir de la distribución de intensidad de difracción.

En este trabajo de investigación se ha aboradado el análisis de células biológicas por técnicas de difracción y procesado óptico lineal de la imagen. Está constituido por cinco Capítulos cuyo contenido pasamos a describir:

En el Capítulo 1 se establece un régimen de transición entre el scattering tridimensional y el bidimensional que permite demostrar que cuando el plano sobre el cual se obtiene la respuesta se aleja suficientemente, ésta es interpretable como una difracción en régimen de Fraunhofer. Así mismo, se define un modelo teórico para la función de transmisión asociada a una célula biológica individual.

En el Capítulo 2 se estudia la respuesta en el plano de Fourier considerando en la función de transmisión diversas aproximaciones que suponen diferentes comportamientos ópticos de la célula (objeto de fase, objeto de amplitud, etc), obteniéndose en cada caso la correspondiente respuesta analítica.

En el Capítulo 3 se analizan numericamente todos los comportamientos anteriormente estudiados, dada la dificultad de obtener más información de las expresiones analíticas. Se estudia la influencia de los parámetros ópticos asignados a la célula sobre su respuesta en el plano de Fourier. Este minucioso estudio, en el que se han considerado un amplio rango de valores para los parámetros, permitirá, una vez obtenida la figura de difracción, conocer y asociar valores a los parámetros que caracterizan la célula.

En el Capítulo 4 se detallan los resultados experimentales que se obtienen cuando se estudia el patrón de difracción de una transparencia de una célula biológica obtenida a través de un microscopio óptico con la técnica de contraste de fase. Los resultados obtenidos mediante el procesado analógico de la señal

se comparan con los teóricos estudiados en el Capítulo 3.

En el Capítulo 5 se desarrolla una innovadora técnica de filtrado espacial dinámico, estudiándose su interpretación matemática. A través de ella se obtiene información diferenciada de cada parte de la célula, discutiéndose el rango de aplicabilidad del método y su comparación con un régimen convencional estático.

Al final de este trabajo, se incluyen cinco Apéndices que explican de forma detallada las aproximaciones más importantes utilizadas en los desarrollos teóricos, así como un diagrama de los programas de cálculo numérico utilizados.

Por último, notese que al final de cada Capítulo se incluye la bibliografía correspondiente.

BIBLIOGRAFIA DE LA INTRODUCCION.

- 1.- ALMEIDA, S.P. et al.: "A Real-Time Optical processor for Pattern Recognition of Biological Specimens" en: "Applications of Holography and Optical Data Processing" (Editado por: MAROM, E. et al., Pergamon Press, N.Y., 1977), pp. 573.
- 2.- BESCOS, J. & SANTAMARIA, J.: "Tratamiento de imágenes por métodos ópticos" en: "Tratamiento de imágenes por métodos ópticos y digitales" (Ed. ICE, Univ. de Salamanca, 1982).
- 3.- BOSECK, S: "Optics in Biomedical Sciences", Springer Series in Optical Sciences (Ed. Springer-Verlag, Berlin, 1982), pp. 15.
- 4.- CATSIMPOOLAS, N.: "Cell Analysis". (Ed. Plenum Press, N.Y., 1982).
- 5.- GROVER, N.B. et al.: "Electrical sizing of particles in suspensions. I: Theory": Biophys., I, 9, pp. 1398 (1969).
III: "Rigidid spheroides and red blood cells": Ibid, 12, pp. 1059 (1972).
- 6.- HARDY, R.R. et al.: "B-Cell Subpopulations Identifiable by two-Color Fluorescence Analysis using a Dual-Laser FACS" en: "Immunoglobulin D: Structure and Function" (Editado por: Thorbecke, G.J. et al., Annals of the N.Y. Acadmy of Sciences, N.Y., 399, 1982) pp. 112.
- 7.- ISHIMARU, A.: "Wave Propagation and Scattering in Random Media" (Ed. Academic Press, N.Y., 1978).
- 8.- KERKER, M.: "The Scattering of light and other Electromagnetic Radiation" (Ed. Academic Press, N.Y., 1969).
- 9.- MEYER, R.A.: "Light Scattering from Red Blood Cell Ghosts: Sensitivity of angular dependence structure to membrane thickness and refractive index". Applied Optics, 16, pp. 2036 (1977).
- 10.- MULLANEY, P.F. & DEAN, P.N.: "Cell sizing: A small-angle light scattering method for sizing particles of low relative refractive index", Applied Optics, 8, pp. 2361 (1969).
- 11.- SANTISTEBAN, A. et al.: "Optics in Biomedical Sciences", Springer Series in Optical Sciences (Ed. Springer Verlag, Berlin, 1982), pp. 48.

CAPITULO 1

TRANSMISION Y ABSORCION DE RADIACION POR UNA CELULA BIOLOGICA: FUNDAMENTOS TEORICOS.

1.1.- INTRODUCCION

En este capítulo abordaremos el fenómeno de la propagación del campo electromagnético a través de un medio caracterizado ópticamente por su función permeabilidad dieléctrica $\epsilon(\vec{r})$. Estamos considerando, por tanto, medios ópticamente inhomogéneos, con la particularidad, además, de que una de sus dimensiones espaciales es mucho más pequeña que las otras dos y por ello podemos prácticamente considerarlos como objetos bidimensionales. Este es el caso de los especímenes biológicos.

Las características de estos medios permiten en el límite hacer una serie de aproximaciones que simplifican la expresión analítica del campo eléctrico transmitido y puesto que, se estudia este fenómeno en el rango de las frecuencias ópticas, se puede hacer una aproximación de tipo eikonal. Los resultados obtenidos son consistentes con otros ya conocidos para medios ópticamente inhomogéneos.

A partir de la aproximación eikonal para el campo transmitido se introduce la función de transmisión óptica. Al considerar el medio como absorbente, es decir, con un coeficiente de atenuación no despreciable, se obtiene dicha función de transmisión como el producto de dos términos, uno de amplitud y otro de fase. Se aplica al caso concreto de una célula biológica.

Por último, a partir de la amplitud de dispersión tridimensional en aproximación eikonal se obtiene una expresión explícita para la sección eficaz total de scattering, que como se demuestra coincide con el comportamiento matemático de la intensidad difractada.

1.2.- APROXIMACION EIKONAL

Supongamos un objeto tridimensional tal como se muestra en la Figura 1, en él que el espesor Δ según el eje z es mucho mas pequeño que las dimensiones x e y .

Sobre dicho objeto incide un campo eléctrico paralelo al eje z , en forma de onda plana monocromática y linealmente polarizada que designamos por E^i .

El problema que se plantea es determinar el campo escalar transmitido por el objeto en la dirección del eje z .

El campo incidente E^i será según hemos supuesto de la forma:

$$E^i(\vec{r}) = e^{ikz} \quad \vec{r} = (x, y, z) \quad (1.1)$$

y por tanto solo depende de la coordenada z .

El campo escalar transmitido $E^t(\vec{r})$ dependerá en general de las tres coordenadas:

$$E = E^t(\vec{r}) \quad (1.2)$$

Supondremos que el campo total $E(\vec{r})$ en la dirección del eje z puede expresarse en cualquier punto como:

$$E(\vec{r}) = E^i(z) E'(\vec{r}) \quad (1.3)$$

donde $E'(\vec{r})$ es una función que cumple las siguientes condiciones:

a) Para valores de z superiores al espesor Δ , el campo total coincidirá con el campo transmitido:

$$E(\vec{r}) = E^t(\vec{r}) \quad \text{para } z > \Delta \quad (1.4)$$

b) Cuando $z \rightarrow -\infty$, $E'(\vec{r})$ tenderá a 1, y así tendremos que:

$$E(\vec{r}) = E^i(\vec{r}) \quad \text{si } z \rightarrow -\infty$$

c) Por último, el campo $E(\vec{r})$ debe cumplir la ecuación de ondas escalar:

$$(\nabla^2 + k^2) E(\vec{r}) = -k^2(\epsilon(\vec{r}) - 1) E(\vec{r}) \quad (1.5)$$

donde: ∇^2 es el operador laplaciana $(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2})$,

$\epsilon(\vec{r})$ representa la permeabilidad dieléctrica del objeto en estudio y, $k = 2\pi/\lambda$ es la componente según el eje z del vector de onda, siendo λ la longitud de onda de la radiación incidente.

Como ya se enunció al principio, nuestro problema es encontrar el campo escalar transmitido. La ec. (1.3) nos permite obtener dicho campo una vez que tengamos determinada la función $E'(\vec{r})$. Para ello vamos a partir de la tercera condición aplicándola a la ec. (1.3)

Aplicando el operador gradiente $\vec{\nabla}$ a esta expresión tendremos:

$$\vec{\nabla} E = (\vec{\nabla} E^i) E' + (\vec{\nabla} E') E^i \quad (1.6)$$

de forma que para $\nabla^2 E$, se obtiene:

$$\nabla^2 E = \vec{\nabla}(\vec{\nabla} E) = (\nabla^2 E^i) E' + (\nabla^2 E') E^i + 2(\vec{\nabla} E^i)(\vec{\nabla} E') \quad (1.7)$$

De acuerdo con (1.1):

$$\nabla^2 E^i = -k^2 E^i$$

y por tanto:

$$\nabla^2 E' = -k^2 E'^i E' + E'^i \nabla^2 E' + 2ikE'^i \frac{\partial E'}{\partial z} \quad (1.8)$$

que sustituida en (1.5) y después de dividir por E'^i conduce a la expresión:

$$\nabla^2 E' + 2ik \frac{\partial E'}{\partial z} = -k^2 (\epsilon(\vec{r}) - 1) E' \quad (1.9)$$

que es la ecuación diferencial buscada para $E'(\vec{r})$.

En el tratamiento que sigue supondremos que la longitud de onda λ es mucho más pequeña que la longitud típica del objeto Δ . Por otra parte, supondremos que para desplazamientos inferiores a la longitud de onda λ la permeabilidad dieléctrica $\epsilon(\vec{r})$ es prácticamente constante. Estamos, por tanto, en aproximación eikonal y de acuerdo con ella podemos establecer que:

- Para desplazamientos inferiores a λ , E' varía lentamente y por tanto $\nabla^2 E'$ es despreciable frente a $\partial E'/\partial z$.

- Para desplazamientos superiores a λ se tiene que:

$$|2ik \frac{\partial E'}{\partial z}| = \frac{4\pi}{\lambda} |\frac{\partial E'}{\partial z}| > \begin{cases} |\frac{\partial}{\partial x} (\frac{\partial E'}{\partial x})| \\ |\frac{\partial}{\partial y} (\frac{\partial E'}{\partial y})| \\ |\frac{\partial}{\partial z} (\frac{\partial E'}{\partial z})| \end{cases} \quad (1.10)$$

con lo cual el término $\nabla^2 E'$ es despreciable frente a los otros dos y, por tanto, la ecuación diferencial que debe cumplir $E'(\vec{r})$ en aproximación eikonal es:

$$\frac{\partial E'}{\partial z} = -\frac{k}{2i} (\epsilon(\vec{r}) - 1) E' \quad (1.11)$$

La integración de esta ecuación para valores fijos de x e y conduce a:

$$E'(\vec{r}) = e^{-\frac{k}{2i} \int_0^z (\epsilon(x, y, z') - 1) dz'} \quad (1.12)$$

al imponer que $E'(\bar{r})$ tiende a 1 cuando $z \rightarrow -\infty$.

Esta expresión de $E'(\bar{r})$ en aproximación eikonal coincide con otros resultados ya conocidos para medios con permeabilidad dieléctrica variable, como ocurre en una red holográfica, en cuyo caso se denomina aproximación de Raman-Nath (Solymar, L. and Cooke, D., 1981).

Finalmente, el campo total $E(\bar{r})$ en aproximación eikonal es:

$$E(\bar{r}) = E^i(z) e^{ik/2 \int_0^z (\epsilon(x,y,z') - 1) dz'} \quad (1.13)$$

que para $z > \Delta$ coincide con el campo transmitido.

1.3.- FUNCION DE TRANSMISION OPTICA.

A partir de la expresión del campo total $E(\bar{r})$ en aproximación eikonal se puede obtener la función de transmisión óptica eikonal.

El factor de transmisión o coeficiente de transmisión de un determinado medio cuya permeabilidad dieléctrica es distinta de la del vacío se define según la teoría electromagnética de la radiación como la relación entre las amplitudes del campo eléctrico transmitido por el medio y el campo eléctrico incidente (Born & Wolf, 1975).

$$t = \frac{E^t(\bar{r})}{E^i(\bar{r})} \quad (1.14)$$

cuando la radiación incide perpendicularmente al plano que contiene al objeto, tal como aparece en la Fig. 1. En este caso, dado

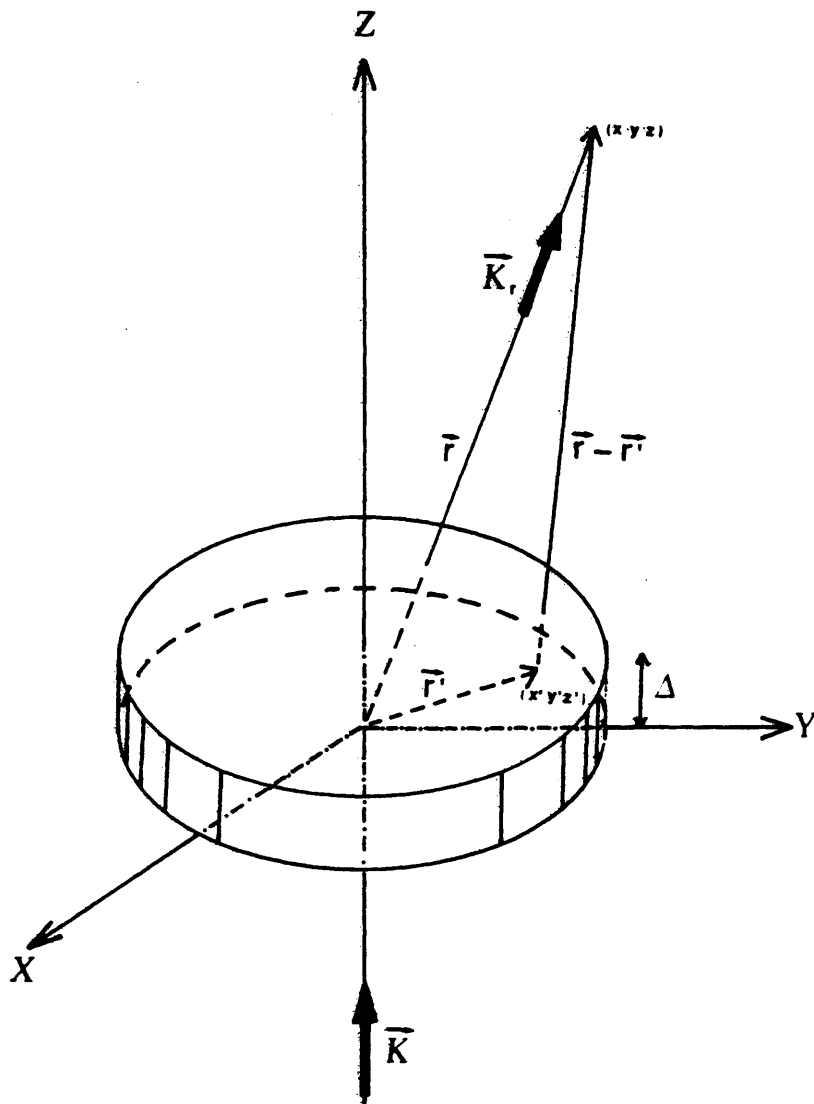


Fig. 1.- Definición de las coordenadas utilizadas en el cálculo de la amplitud de scattering.

que se esta desarrollando un tratamiento escalar, nos estamos refiriendo a una sola componente del campo: $\vec{E}^i = (0, 0, E_z)$, que designaremos como onda TM (transversal magnética) incidente. En consecuencia de la ec. (1.13) se deduce que:

$$t(x, y) = e^{ik/2} \int_0^{\Delta} dz' (\epsilon(x, y, z') - 1) \quad (1.15)$$

Cuando el medio es inhomogéneo la función de transmisión presenta igualmente una dependencia en la posición. En general, la relación entre esta función y la permeabilidad dieléctrica sigue una ley exponencial. Si designamos por:

$$\phi_{eik}(x, y) = k/2 \int_0^{\Delta} dz' (\epsilon(x, y, z') - 1) \quad (1.16)$$

la ec. (1.15) es:

$$t(x, y) = e^{i\phi_{eik}(x, y)} \quad (1.17)$$

y la función de transmisión viene expresada en términos de la fase eikonal.

En el caso en que el medio transmisor de la radiación - tenga una permeabilidad dieléctrica próxima a la del vacío, ($\epsilon(\vec{r}) - 1$ es un valor pequeño) se puede obtener una ley simplificada al desarrollar en serie el término exponencial de la ec. (1.17):

$$t(x, y) = 1 + \frac{ik}{2} \int_0^{\Delta} dz' (\epsilon(x, y, z') - 1) \quad (1.18)$$

Si además el medio es tal que ϵ varía muy poco en la dirección z : $\epsilon(x, y, z) \approx \epsilon(x, y)$. En este caso obtenemos:

$$t(x, y) = 1 + \frac{ik\Delta}{2} (\epsilon(x, y) - 1) \quad (1.19)$$

Para longitud de onda λ y espesor Δ fijos, la función de transmisión óptica depende linealmente de la permeabilidad dieléctrica $\epsilon(x,y)$.

Nótese que para espesores Δ pequeños pero no despreciables, como es nuestro caso, $t(x,y)$ es distinta de la unidad debido al factor $k\Delta/2(\epsilon(x,y) - 1)$ que actúa sobre la fase de la onda transmitida. Este interesante resultado se tendrá en cuenta más adelante.

Medio absorbente:

El caso más general supone considerar el medio transmisor como medio absorbente. La permeabilidad dieléctrica es entonces una función compleja de la forma:

$$\epsilon(x,y,z) = \text{Re}\epsilon(x,y,z) + i\text{Im}\epsilon(x,y,z) \quad (1.20)$$

La ec. (1.17) se expresa ahora como:

$$t(x,y) = A(x,y) e^{i\phi} e^{ik(x,y)} \quad (1.21)$$

A partir de la ec. (1.15) podemos expresar $t(x,y)$ en forma explícita como:

$$t(x,y) = e^{ik/2 \int_0^\Delta dz' (\text{Re}\epsilon(x,y,z') - 1)} \cdot e^{-k/2 \int_0^\Delta dz' \text{Im}\epsilon(x,y,z')} \quad (1.22)$$

Identificando con la ec. (1.21):

$$A(x,y) = e^{-k/2 \int_0^\Delta dz' \text{Im}\epsilon(x,y,z')} \quad (1.23)$$

que es el coeficiente de atenuación o término de amplitud en aproximación eikonal expresada en función de la parte imaginaria de ϵ , $\text{Im}(x,y) > 0$, y:

$$\phi(x,y) = \frac{k}{2} \int_0^{\Delta} dz' (\text{Re}\epsilon(x,y,z') - 1) \quad (1.24)$$

que es la fase eikonal expresada en función de la parte real de ϵ .

Si de nuevo suponemos que: $\epsilon(x,y,z) = \epsilon(x,y)$, las ecs. (1.23) y (1.24) se expresan como:

$$A(x,y) = e^{-k\Delta/2 \text{Im}\epsilon(x,y)} \quad (1.25)$$

$$\phi(x,y) = \frac{k\Delta}{2} (\text{Re}\epsilon(x,y) - 1) \quad (1.26)$$

En el caso más general el coeficiente de atenuación del medio no varía linealmente con $\text{Im}\epsilon(x,y)$, puesto que según la ec. (1.25):

$$\text{Im}\epsilon(x,y) = -\frac{2}{k\Delta} \ln A(x,y) \quad (1.27)$$

Sin embargo, si el medio absorbe sólo debilmente la radiación, puede suponerse que $\text{Im}\epsilon$ es un valor pequeño, pudiéndose desarrollar en serie la ec. (1.25):

$$A(x,y) = 1 - \frac{k\Delta}{2} \text{Im}\epsilon(x,y) \quad (1.28)$$

Obtenemos en este caso una dependencia lineal del coeficiente de atenuación con $\text{Im}\epsilon(x,y)$. Nótese que si, para Δ fijo, $-\text{Im}\epsilon(x,y)$ es pequeño, van a obtenerse siempre valores para $A(x,y)$, muy próximos pero distintos de uno. Este es otro importante resultado que utilizaremos posteriormente.

1.4.- FUNCION DE TRANSMISION OPTICA ASOCIADA A UNA CELULA BIOLOGICA.

Una célula biológica puede considerarse como un objeto inhomogéneo bidimensional. Su inhomogeneidad proviene de las variaciones en el índice de refracción debidas a las diferentes estructuras químicas que delimitan su anatomía (núcleo, citoplasma, vacuolas, Aparato de Golgi, etc.).

De forma simplificada supondremos a la célula como un objeto con simetría circular, considerando fundamentalmente tres regiones diferenciadas: núcleo, citoplasma y membrana. (Fig. 2). Este modelo representa células cuya morfología corresponde a estructuras bien diferenciadas como es el caso de células parabasales. (Fig. 3).

Los trabajos publicados que abordan bien el problema de scattering o bien el de difracción (Pernick et al. 1978; Meyer - 1977; Turke et al. 1978), solamente distinguen entre dos zonas: núcleo y citoplasma.

El interés que tiene el incluir la membrana como una parte diferenciada radica en las importantes reacciones químicas que en ella tienen lugar (fenómenos de transporte, intercambio de iones Na^+ , K^- , etc.), y que se ven alterados cuando la célula es atacada por agentes patógenos. Estas modificaciones alteran la distribución de energía en el espectro y por tanto modifican la respuesta en el plano de difracción. Desde el punto de vista óptico las variaciones en los componentes químicos de la membrana celular suponen variaciones en sus propiedades ópticas: se produce una variación en el índice de refracción y por tanto, como se ha discutido en la sección 1.2, se produce una variación en el coeficiente de transmisión, pudiendo considerarse entre ambos una dependencia lineal.

Como situación más general, se puede suponer que la célula biológica tiene un coeficiente de atenuación distinto de la unidad. Este coeficiente, debido a la geometría asignada, depende de la variable radial: $A = A(r)$, suponiendo que dicho coeficiente varía de una región a otra de la célula. Por otra parte, se tienen

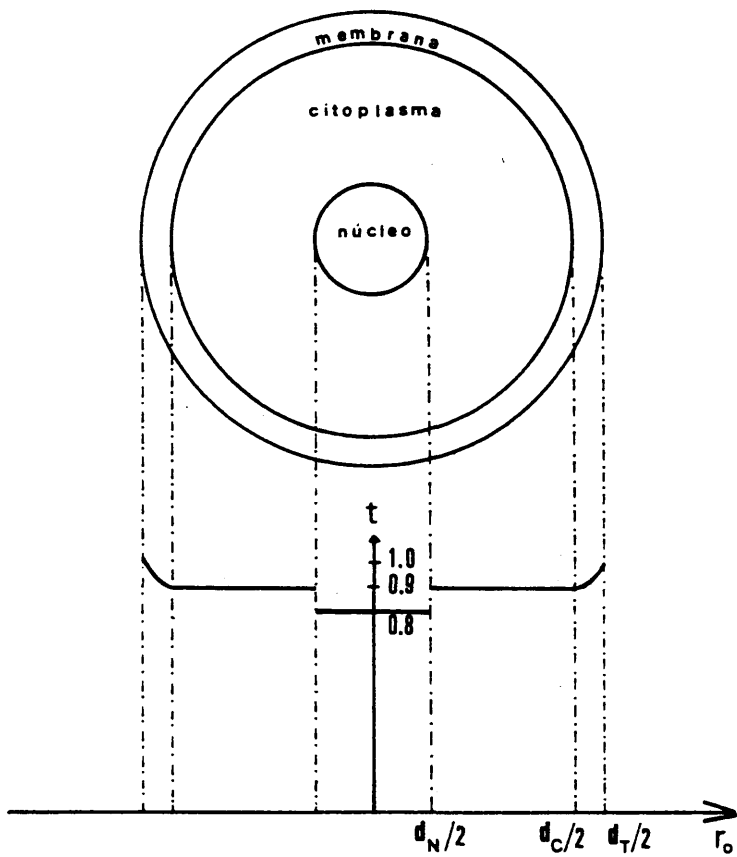


Fig. 2.- Función de transmisión asociada a una célula biológica.

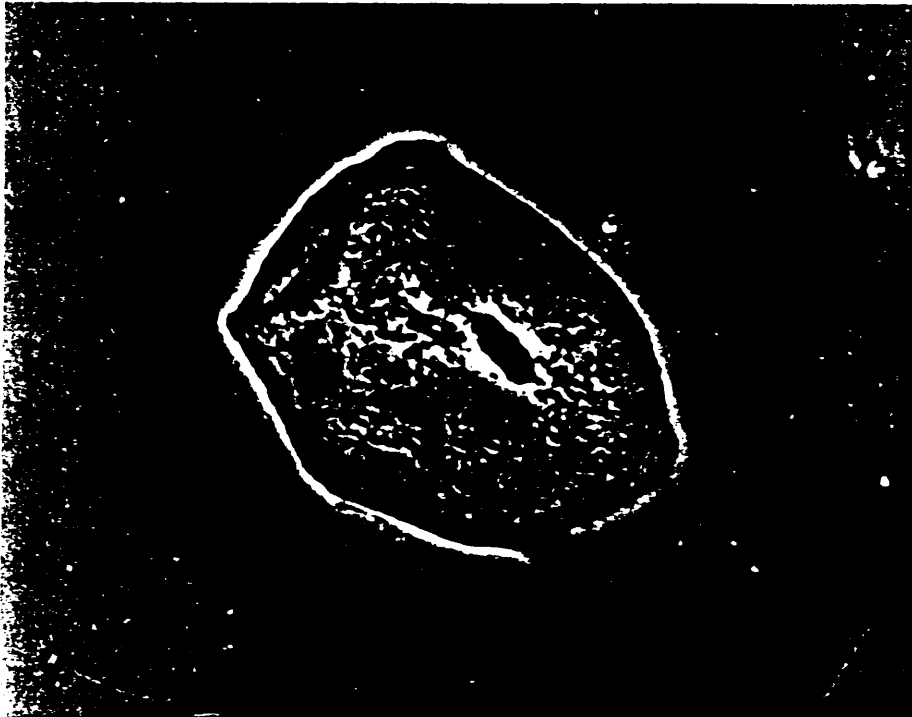


Figura 3

en cuenta las variaciones en el espesor de la célula. Esta queda considerada como un objeto con variaciones en el perfil, dependiendo de las distintas regiones y suponiendo siempre que las variaciones de espesor son pequeñas, es decir, el término de fase eikonal es:

$$\phi = \phi_{eik}(r)$$

Con estas consideraciones, y de acuerdo con la ec. (1.21), la función de transmisión óptica asociada a la célula será en general una función compleja de la forma (Chevalier, M., Calvo, M.L. y Carreras, C., 1983):

$$t(r) = A(r) e^{i\phi(r)} \quad (1.29)$$

donde r es la variable radial.

El término de amplitud $A(r)$ tiene la forma que aparece en la Fig. 2 y se define como:

$$A(r) = \begin{cases} t_N & 0 < r < d_N/2 \\ t_C & d_N/2 < r < d_C/2 \\ t_M(r) & d_C/2 < r < d_T/2 \end{cases} \quad (1.30)$$

siendo t_N y t_C los factores de atenuación asociados al núcleo y al citoplasma. Se supone que éstos son constantes y menores que la unidad, tal como se ha discutido en la sección 1.2. Los parámetros d_N , d_C y d_T representan respectivamente los diámetros del núcleo, citoplasma y total de la célula.

La información adicional correspondiente a la membrana vendría expresada por la función $t_M(r)$. Si consideramos que en ella hay una variación gradual en su composición química, lo que se manifiesta en un gradiente en el índice de refracción desde la frontera citoplasma-membrana hasta la capa más externa de la membrana,

la función más sencilla que representaría este comportamiento es una función parabólica. Por tanto, asociaremos a la función de transmisión de la membrana celular una variación de tipo parabólico. (Volkenshtein, M.V., 1983).

Así pues, $t_M(r)$ será:

$$t_M(r) = ar^2 + br + c \quad (1.31)$$

con las siguientes condiciones en la frontera:

$$t_M(r = d_C/2) = t_C \quad (1.32)$$

$$t_M(r = d_T/2) = t_M \quad (1.33)$$

donde t_M es una constante.

$$\left. \frac{dt_M(r)}{dr} \right|_{d_C/2} = 0 \quad (1.34)$$

La condición (1.34) expresa que entre citoplasma y membrana no existe discontinuidad. Por el contrario la condición (1.33) implica una discontinuidad fuerte entre la parte más externa de la membrana celular y el medio exterior a la célula.

La función de transmisión asociada a la membrana con estas condiciones de contorno es:

$$t_M(r) = \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} (2r - d_C)^2 + t_C \quad (1.35)$$

La parte compleja de la función de transmisión asociada a la célula en la ec. (1.29) da cuenta del retraso que sufre la onda incidente como consecuencia del espesor no despreciable de la célula.

Según los postulados de la Optica Geométrica y de acuerdo con la ec. (1.26), la fase asociada a la célula, $\phi(r)$, esta definida como:

$$\phi(r) = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta(n(x,y) - 1) \quad (1.36)$$

donde:

$$\delta = \Delta(n(x,y) - 1) \quad (1.37)$$

representa el camino óptico y $n(x,y) = (\epsilon(x,y))^{1/2}$, es el índice de refracción del medio.

En nuestro caso particular suponemos que cada parte de la célula (núcleo, citoplasma y membrana) tiene asociada un índice de refracción y espesor constantes, de forma que la ec. (1.36) se puede expresar como:

$$\phi(r) = k \sum_{i=1}^3 \delta_i \quad (1.38)$$

donde el subíndice i denota cada parte de la célula. En la práctica esto supone asignar un valor distinto para la fase a cada zona considerada, y por tanto:

$$\phi(r) = \begin{cases} \phi_N & 0 \leq r \leq d_N/2 \\ \phi_C & d_N/2 < r \leq d_C/2 \\ \phi_M & d_C/2 < r \leq d_T/2 \end{cases} \quad (1.39)$$

donde ϕ_N , ϕ_C y ϕ_M son las fases asociadas a cada zona y las consideramos constantes.

La función de transmisión óptica, ec. (1.29), quedará por tanto en la forma:

$$t(r) = \begin{cases} t_N e^{i\phi_N} & 0 \leq r \leq d_N/2 \\ t_C e^{i\phi_C} & d_N/2 < r \leq d_C/2 \\ t_M(r) e^{i\phi_M} & d_C/2 < r \leq d_T/2 \end{cases} \quad (1.40)$$

1.5.- AMPLITUD DE SCATTERING TRIDIMENSIONAL Y APROXIMACION EIKONAL.

Definida la función de transmisión óptica, queda por caracterizar el campo transmitido en términos de dicha función.

En general, se supone que la célula biológica es un objeto inhomogéneo tridimensional que actúa como centro de scattering (*). Es decir, el campo emergente de la célula es un campo eléctrico de scattering cuya fórmula general de representación es una ecuación escalar integral asociada a la ecuación diferencial de ondas, ec. (1.5) (Newton, R.G., 1966):

$$E(\vec{r}) = E^i(\vec{r}) - \frac{1}{4\pi} \int_V d^3\vec{r}' \frac{e^{ik|\vec{r} - \vec{r}'|}}{|\vec{r} - \vec{r}'|} (-k^2(\epsilon(\vec{r}') - 1)) E(\vec{r}') \quad (1.41)$$

donde V designa el volumen total de la célula y \vec{r}' el vector de posición de un punto (x', y', z') de la misma (ver Fig. 1).

A partir de esta ecuación la amplitud de dispersión o amplitud de scattering se puede obtener en términos del campo de scattering en aproximación asintótica. Para ello vamos a sustituir el propagador del núcleo de la integral por su comportamiento a largas distancias, es decir, vamos a pasar de una onda esférica a una onda plana cuando $|\vec{r}| \rightarrow \infty$.

(*): También se puede utilizar el término esparcimiento y en algunos casos dispersión. Por ello se ha elegido el término anglosajón.

En esta aproximación podemos hacer las siguientes consideraciones:

$$\frac{1}{|\vec{r} - \vec{r}'|} \rightarrow \frac{1}{|\vec{r}|}$$

y

$$e^{ik|\vec{r} - \vec{r}'|} \rightarrow e^{ik|\vec{r}|} e^{-i\vec{k}_r \vec{r}'}$$

donde $\vec{k}_r = k \frac{\vec{r}}{|\vec{r}|}$, es el vector de propagación en la dirección \vec{r} .
 Nótese, que por tanto, $|\vec{k}_r| = k$.

Sustituyendo en la ec. (1.41) tenemos:

$$E(\vec{r}) = E^i(\vec{r}) + f(\vec{k}_r, \vec{k}) \frac{e^{ik|\vec{r}|}}{|\vec{r}|} \quad (1.42)$$

expresión aproximada para el campo total de scattering a largas -
 distancias, donde $f(\vec{k}_r, \vec{k})$ representa la amplitud para el scattering
 desde la dirección \vec{k} a la dirección \vec{k}_r . De aquí en adelante
 llamaremos \vec{k}' al vector \vec{k}_r utilizando así una notación más general.
 La expresión de la amplitud de scattering será:

$$f(\vec{k}', \vec{k}) = -\frac{1}{4\pi} \int_V d^3\vec{r}' \exp(-i\vec{k}' \cdot \vec{r}') (-k^2 (\epsilon(\vec{r}') - 1)) E(\vec{r}') \quad (1.43)$$

Teniendo en cuenta que la longitud de onda es pequeña -
 frente a las dimensiones del objeto, es decir, que podemos utilizar
 la aproximación eikonal, sustituimos en (1.43) la expresión ob-
 tenida del campo transmitido en dicha aproximación, ec. (1.13):

$$f(\bar{k}', \bar{k}) = -\frac{1}{4\pi} \int_V dx' dy' dz' \exp\{-i\bar{k}' \cdot \bar{r}'\} (-k^2(\epsilon(\bar{r}') - 1)) \cdot e^{i\bar{k} \cdot \bar{r}'} \exp\{ik/2 \int_0^{z'} dz'' (\epsilon(x', y', z'') - 1)\} \quad (1.44)$$

La integral sobre el volumen total podemos desglosarla en dos: una sobre el plano xy, y otra a lo largo del espesor Δ de la célula:

$$f(\bar{k}', \bar{k}) = -\frac{1}{4\pi} \int_{S \equiv xy} dx' dy' \int_0^{\Delta} dz' \exp\{i\bar{r}' \cdot (\bar{k} - \bar{k}')\} (-k^2(\epsilon(\bar{r}') - 1)) \exp\{ik/2 \int_0^{z'} dz'' (\epsilon(x', y, z'') - 1)\} \quad (1.45)$$

Si ahora hacemos dentro del núcleo de la integral la siguiente aproximación:

$$e^{i\bar{r}' \cdot (\bar{k} - \bar{k}')} \approx e^{-i\bar{r}' \cdot \underline{k}'} \quad (1.46)$$

donde $\underline{r}' = (x', y')$ y $\underline{k}' = (k'_x, k'_y)$, ya que los términos $\exp\{i(z'k_z - z'k'_z)\}$ y $\exp\{i(x'k_x + y'k_y)\}$ tienden a la unidad debido a que $k_z = k'_z$ y $k_x = k_y = 0$, por ser estas últimas las componentes del vector de onda \bar{k} de la onda incidente que habíamos supuesto en la dirección del eje z.

Se considera, por tanto, que las oscilaciones propias del término exponencial debido a la fase ($\bar{r}' \cdot (\bar{k} - \bar{k}')$) son originadas fundamentalmente en la propagación de la onda hacia adelante en el plano xy. Esta suposición es válida siempre que Δ sea suficientemente pequeño, caso de la célula biológica en estudio, y que el fenómeno de scattering hacia adelante sea importante.

Todo esto equivale a expresar $f(\bar{k}', \bar{k})$ en aproximación eikonal tal como ha sido desarrollado por Glauber (Glauber, R.J., 1959).

Así:

$$f(\underline{k}', k) = -\frac{1}{4\pi} \int_S dx' dy' e^{-i\underline{r}' \cdot \underline{k}'} J \quad (1.47)$$

donde:

$$J = \int_0^\Delta dz' (-k^2 (\epsilon(\bar{r}') - 1) \exp\{ik/2 \int_0^{z'} dz'' (\epsilon(x', y', z'') - 1)\} \quad (1.48)$$

Manipulando convenientemente J puede también formularse como:

$$J = -\frac{2k}{i} \int_0^\Delta dz' \frac{\partial}{\partial z'} \{ \exp(ik/2 \int_0^{z'} dz'' (\epsilon(x', y', z'') - 1)) \} \quad (1.49)$$

obteniéndose la expresión explícita para J cuando realizamos la integración:

$$J = -\frac{2k}{i} \{ \exp \{ ik/2 \int_0^\Delta dz' (\epsilon(x', y', z'') - 1) \} - 1 \} \quad (1.50)$$

que sustituida en la ec. (1.47) nos da la amplitud de scattering:

$$f(\underline{k}', k) = (k/2\pi i) \int_S dx' dy' e^{-i\underline{r}' \cdot \underline{k}'} \{ e^{(ik/2) \int_0^\Delta dz'' (\epsilon(x', y', z'') - 1)} - 1 \} \quad (1.51)$$

De acuerdo con la Eq. (1.15), $f(\underline{k}', k)$ puede formularse en términos de la función de transmisión $t(x', y')$:

$$f(\underline{k}', k) = -\frac{i}{\lambda} \int_S dx' dy' e^{i\underline{k}' \cdot \underline{r}'} (t(x', y') - 1) \quad (1.52)$$

que representa la amplitud de scattering tridimensional en aproximación eikonal. Esta aproximación coincide con la aproximación de la teoría de la difracción de Sommerfeld-Rayleigh (Cathey, W. T., 1974). Aquí, $(t(x', y') - 1)$ representa la amplitud compleja en un punto (x', y') del plano que contiene a la célula biológica. El término $\exp(-i\underline{k}' \cdot \underline{r}')$ representa al propagador que, en principio, es un frente generalizado al que se le puede asignar una geometría arbitraria.

Es de destacar que este resultado demuestra como, a través de una aproximación eikonal, el fenómeno de scattering tridimensional se hace equivalente a un fenómeno de difracción bidimensional.

Imponiendo las condiciones de frente cuadrático al propagador, se obtiene $f(\underline{k}', k)$ en términos de una transformación de Fourier. Este interesante resultado permite introducir en la sección siguiente la respuesta en el plano de Fourier asociada a la célula biológica y su posterior análisis difraccional.

Esta aproximación supone que $z \gg x, y; x', y', y$:
 $\exp\{-i\underline{k}' \cdot \underline{r}'\} = \exp\{-ik \underline{r}'/z\} = \exp\{-2\pi i(xf_x + yf_y)\}$ siendo $f_x = x'/\lambda z$ y $f_y = y'/\lambda z$ las frecuencias espaciales.

Nótese que la aproximación a régimen de Fraunhofer se ha realizado al considerar el comportamiento asintótico del propagador en la ec. (1.41) y tomar la aproximación de Glauber.

1.5.1.- Sección eficaz total: Intensidad Difractada

La sección eficaz total de scattering puede definirse en términos de la amplitud de dispersion (Newton, R.G., 1966):

$$\sigma = \int_{\Omega} d\Omega_{\bar{k}}, |f(\underline{k}', k)|^2 \quad (1.53)$$

$\Omega_{\bar{k}}$, es el ángulo sólido total determinado por la dirección de propagación \bar{k}' .

De acuerdo con la ec. (1.52), la sección eficaz total puede ser expresada como:

$$\sigma = \frac{1}{\lambda^2} \int dx' dy' \int dx'' dy'' (t(x', y') - 1) (t^*(x'', y'') - 1) \int_{\Omega} d\Omega_{\bar{k}}, e^{i\underline{k}'(\underline{r}'' - \underline{r}')} \quad (1.54)$$

teniendo en cuenta que $d\Omega_{\bar{k}}, = \frac{1}{k^2} d^2\underline{k}'$, donde el elemento diferencial $d^2\underline{k}'$ es la superficie elemental perpendicular a la dirección \bar{k}' .

Por lo tanto:

$$\begin{aligned} \int_{\Omega} d\Omega_{\bar{k}}, e^{i\underline{k}'(\underline{r}'' - \underline{r}')} &= \frac{1}{k^2} \int d^2\underline{k}', e^{i\underline{k}'(\underline{r}'' - \underline{r}')} = \\ &= \frac{(2\pi)^2}{k^2} \delta^{(2)}(\underline{r}'' - \underline{r}') \end{aligned} \quad (1.55)$$

donde $\delta^{(2)}(\underline{r}'' - \underline{r}')$ es la δ -Dirac bidimensional. Entonces sustituyendo en la ec. (1.54) tenemos:

$$\sigma = \int d\underline{r}' \int d\underline{r}'' (t(x', y') - 1) (t^*(x'', y'') - 1) \delta^{(2)}(\underline{r}'' - \underline{r}') \quad (1.56)$$

y, finalmente:

$$\sigma = \int d^2\underline{r}' |t(x', y') - 1|^2 \quad (1.57)$$

Esta expresión nos indica que la sección eficaz total de scattering es equivalente a la intensidad total difractada.

Este resultado ya ha sido obtenido para objetos inhomogéneos con geometría cilíndrica como es el caso de una fibra óptica (Calvo, M.L. y Juncos, P., 1979), en el sentido de interpretar el fenómeno de scattering como un fenómeno de difracción.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 1.

- 1.- BORN, M. & WOLF, E.: "Principles of Optics". (Ed. Pergamon Press, Londres, 1975). Capítulo 1.
- 2.- CALVO, M.L. & JUNCOS; P.: "Bidimensional Scattering of TM Waves by an Optical fiber". Proc. SPIE The Int. Soc. Opt. Eng., 213, pp. 35-7 (1979).
- 3.- CATHEY, W.T.: "Optical Information Processing and Holography". (Ed. John Wiley & Sons, N.Y., 1974). Capítulo 1.
- 4.- CHEVALIER, M., CALVO, M.L. & CARRERAS, C.: "Applications of Optical Image Processing for the determination of the Optical Properties of Cellular membranes". I.E.E.E. Computer Society Reprint, 422, pp. 137 (1983).
- 5.- GLAUBER, R.J.: "High Energy Collision Theory" en "Lectures in Theoretical Physics". (Ed. Brittin and Dunham, Interscience, 1959). Vol. 1.
- 6.- MEYER, R.A.: "Light Scattering from red blood cell ghosts: Sensitivity of angular dependence structure to membrane thickness and refractive index". Applied Optics, 16, pp. 2036 (1977).
- 7.- NEWTON, R.G.: "Scattering Theory of waves and particles". (Ed. McGraw-Hill, N.Y., 1966).
- 8.- PERNICK, B. et al.: "Screening of cervical cytological samples using Coherent Optical Processing". Applied Optics
Part I: 17, pp. 21-34 (1978).
Part II: 17, pp. 35-51 (1978).
- 9.- SOLYMAR, L. & COOK, D.: "Volume Holography and Volume Gratings". (Ed. Academic Press, N.Y., 1981). Capítulo 2.
- 10.- TURKE, B. et al.: "Fourier Optical Approach to the extraction of morphological parameters from the diffraction pattern of biological cells". Applied Optics, 17, pp. 2754 (1978).
- 11.- VOLKENSHTEIN, M.V.: "Biophysics". (Ed. MIR, Moscú, 1983). Capítulo 10.

CAPITULO 2

ANALISIS DIFRACCIONAL: RESPUESTA EN EL PLANO DE FOURIER.

2.1.- INTRODUCCION.

Como vimos en el capítulo anterior, el fenómeno de esparcimiento o scattering producido por un objeto tridimensional de espesor muy pequeño pero no despreciable es equivalente a un fenómeno de difracción, cuando la observación se realiza en un plano suficientemente alejado del objeto, siendo la formulación análoga a una transformación de Fourier.

Por ello, en este capítulo, se aborda el estudio de la respuesta analítica en el plano de Fourier asociada al objeto difractante en cuestión, la célula biológica.

Utilizando la función de transmisión que caracteriza a la célula biológica y que quedó definida en el capítulo anterior, se obtiene la amplitud total de difracción y la intensidad difractada en términos de la transformada de Fourier de esta función de transmisión. Así mismo cada una de las contribuciones de las distintas partes de la célula a la amplitud total de difracción son también estudiadas.

Al tener en cuenta las posibles características ópticas de las células biológicas, se han hecho distintas consideraciones en el comportamiento de la función de transmisión, estudiándose en todos los casos la amplitud total de difracción. Entre ellas cabe destacar la consideración de la célula como objeto de fase, siendo los valores de las fases asociadas pequeñas y menores que la unidad, por ser ésta una situación cercana a la realidad para una amplia clase de células biológicas. No obstante, y con objeto de obtener una información más completa de la estructura matemática así como del comportamiento numérico de las respuestas en el plano de Fourier, se estudia igualmente el caso de una célula biológica considerada como simple objeto de amplitud.

2.2.- RESPUESTA EN EL PLANO DE FOURIER.

La distribución de la amplitud compleja para el campo difractado, $\Psi(x_0, y_0)$, en aproximación de Fraunhofer se expresa en términos de la transformada de Fourier de la función de transmisión, $t(x', y')$, asociada a un objeto bidimensional, cuando el plano que lo contiene es iluminado normalmente por una onda plana monocromática, como:

$$\Psi(x_0, y_0) = \frac{1}{i\lambda z} e^{ikz} e^{ik(x_0^2 + y_0^2)/2z} \iint_{-\infty}^{+\infty} t(x', y') e^{-2\pi i(x_0 x' + y_0 y')/\lambda z} dx' dy' \quad (2.1)$$

donde (x_0, y_0) y (x', y') son las coordenadas cartesianas asociadas respectivamente al plano de difracción y al plano objeto, λ es la longitud de onda de la radiación incidente y z es la distancia entre el plano objeto y el plano de observación (Cathey, W.T., 1974).

Consideremos ahora un frente de onda plano y monocromático que incide sobre un objeto situado en el plano E_1 (Fig. 4) que se encuentra situado a una distancia $d_0 < |f|$. Se puede demostrar (Cathey, W.T., 1974) que en el plano focal posterior de la lente obtenemos la amplitud de difracción asociada al objeto. Esta distribución de la amplitud está asimismo expresada por la ec. (2.1), sustituyendo z por la distancia focal de la lente. En todo el desarrollo posterior será esta situación física la considerada.

Así pues, la amplitud de difracción asociada al objeto se calcula sustituyendo en la ec. (2.1) la función definida en la ec.(1.40). Por presentar esta función simetría circular es conveniente expresar la amplitud de difracción en coordenadas polares. Esto supone realizar una transformación de Bessel-Fourier o transformada de Hankel de orden cero. La ec. (2.1) será ahora:

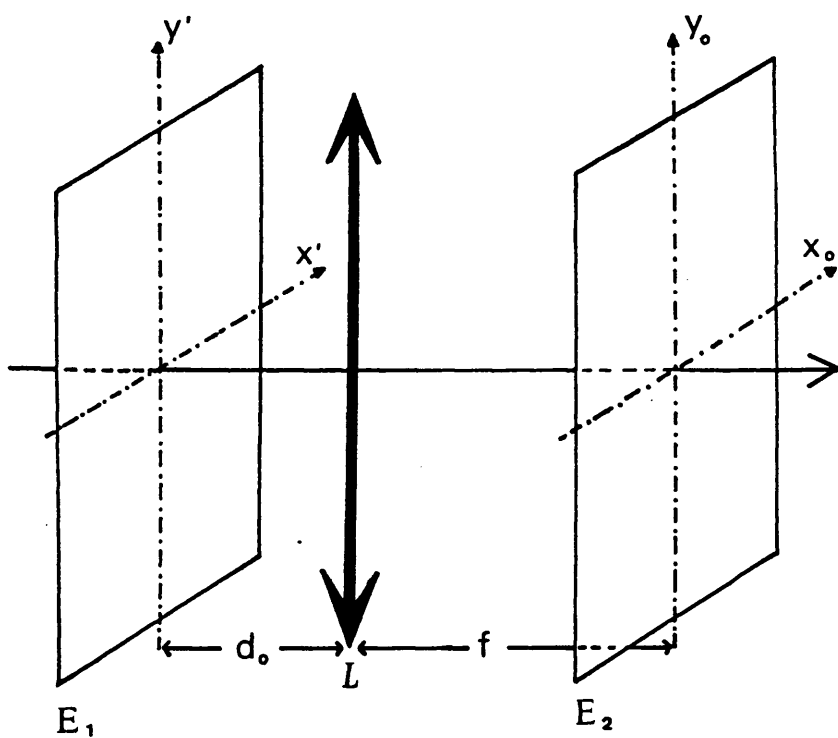


Fig. 4.- Esquema de las coordenadas utilizadas en la obtención de la respuesta en el plano de Fourier.

$$\Psi(r_0) = \frac{1}{i\lambda f} e^{ikf} e^{ikr_0^2/2f} 2\pi \int_0^\infty r' t(r') J_0(2\pi r' r_0/\lambda f) dr' \quad (2.2)$$

siendo:

$$J_0(a) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} e^{-ia \cos(\theta - \phi)} d\theta \quad (2.3)$$

la función de Bessel de primera clase y orden cero (Papoulis, A., 1968).

Por tanto, si sustituimos en la ec. (2.2) la función de transmisión asociada a la célula biológica tendremos:

$$\begin{aligned} \Psi(r_0) = & \frac{e^{ikf} e^{ikr_0^2/2f}}{i\lambda f} 2\pi \left(\int_0^{d_N/2} r' t_N e^{i\phi_N} J_0(2\pi r' \rho) dr' + \right. \\ & + \int_{d_N/2}^{d_C/2} r' t_C e^{i\phi_C} J_0(2\pi r' \rho) dr' + \\ & \left. + \int_{d_C/2}^{d_T/2} r' t_M(r') e^{i\phi_M} J_0(2\pi r' \rho) dr' \right) \quad (2.4) \end{aligned}$$

Considerando la siguiente igualdad:

$$\int_0^x \xi^{p+1} J_p(\xi) d\xi = x^{p+1} J_{p+1}(x) \quad (2.5)$$

(Abramowitz & Stegun, 1972) y desdoblado convenientemente los intervalos de integración, se resuelven las dos primeras integrales que aparecen en la igualdad (2.4):

$$\begin{aligned} \psi(x_0) = & \frac{e^{ikf} e^{ikr_0^2/2f}}{i\lambda f} 2\pi \left\{ \frac{t_N e^{i\phi_N}}{4} d_N^2 \frac{J_1(\pi\rho d_N)}{\pi\rho d_N} + \right. \\ & + \frac{t_C e^{i\phi_C}}{4} d_C^2 \frac{J_1(\pi\rho d_C)}{\pi\rho d_C} - \frac{t_C e^{i\phi_C}}{4} d_N^2 \frac{J_1(\pi\rho d_N)}{\pi\rho d_N} + \\ & \left. + \int_{d_C/2}^{d_T/2} r' t_M(r') e^{i\phi_M} J_0(2\pi r'\rho) dr' \right\}_{\rho = r_0/\lambda f} \quad (2.6) \end{aligned}$$

El cuarto término del lado derecho de la ec. (2.6) es una integral cuyo resultado contiene información de la amplitud de difracción asociada a la membrana celular cuya función de transmisión ha sido definida como:

$$t_M(r') = \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} (2r' - d_C)^2 + t_C$$

Llevando esta última relación a la integral se obtiene:

$$\begin{aligned} \int_{d_C/2}^{d_T/2} r' t_M(r') e^{i\phi_M} J_0(2\pi r'\rho) dr' = & \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} e^{i\phi_M} \cdot \\ & \left(\int_{d_C/2}^{d_T/2} 4r'^3 J_0(2\pi r'\rho) dr' - 4 d_C \int_{d_C/2}^{d_T/2} r'^2 J_0(2\pi r'\rho) dr' + \right. \\ & \left. + d_C^2 \int_{d_C/2}^{d_T/2} r' J_0(2\pi r'\rho) dr' \right) + \int_{d_C/2}^{d_T/2} t_C e^{i\phi_M} r' J_0(2\pi r'\rho) dr' \end{aligned} \quad (2.7)$$

Considerando la ley de recurrencia de las funciones de Bessel (Abramowitz & Stegun, 1972):

$$J_{n+1}(z) = \frac{2n}{z} J_n(z) - J_{n-1}(z)$$

y desdoblado el intervalo de integración, se puede resolver la primera integral que aparece a la derecha de la igualdad (2.7). La segunda integral se resuelve teniendo en cuenta la definición general de la integral de las funciones de Bessel con dependencia polinómica en la variable (Abramowitz & Stegun, 1972):

$$\int_0^z t^\mu J_\nu(t) dt = z^\mu \frac{\Gamma(\frac{\nu+\mu+1}{2})}{\Gamma(\frac{\nu-\mu+1}{2})} \sum_{k=0}^{\infty} \frac{\Gamma\{(\nu+2k+1)\}}{\Gamma(\frac{\nu-\mu+1}{2}+k)} \cdot J_{\nu+2k+1}(z)$$

siendo $\Gamma(a)$ la función gamma.

En nuestro caso $\mu = 2$ y $\nu = 0$, que sustituidas en la expresión anterior dan lugar a una serie de funciones de Bessel. La convergencia de la serie obtenida se discute en el Apéndice A. Por tanto, la segunda integral de la derecha de la ec. (2.7) quedaría, considerando los intervalos de integración adecuados, en la forma:

$$\int_0^{d_T/2} r'^2 J_0(2\pi r' \rho) dr' = \frac{d_T^2}{8\pi\rho} (-0.25) \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(2k+1)\Gamma(k-1/2)}{\Gamma(k+5/2)} J_{2k+1}(\pi\rho d_T) \quad (2.8)$$

Las dos últimas integrales de la expresión (2.7) se resuelven aplicando la relación (2.5).

Finalmente la distribución de la amplitud de difracción puede escribirse como:

$$\Psi(r_0) = \frac{1}{i\lambda f} e^{ikf} e^{ikr_0^2/2f} \sum_{i=1}^3 A_i(\rho) \Big|_{\rho = r_0/\lambda f} \quad (2.9)$$

donde $A_i(\rho)$ representa las contribuciones de cada parte de la célula (núcleo, citoplasma y membrana) a la amplitud total de difracción. Así, la contribución nuclear será:

$$A_1(\rho) = (t_N e^{i\phi_N} - t_C e^{i\phi_C}) \frac{d_N^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_N)}{\pi\rho d_N} \quad (2.10)$$

Se puede apreciar cómo este resultado es análogo al que se obtiene cuando la función de transmisión corresponde a la de una abertura circular. La respuesta es proporcional a la función de Airy cuyo argumento depende del diámetro nuclear. Teniendo en cuenta la Propiedad de Similaridad de la Transformada de Fourier (*), esta contribución será la más extendida en el plano de Fourier. Los factores complejos que multiplican a la función de Airy son consecuencia de la discontinuidad existente en la función de transmisión al pasar del núcleo al citoplasma, que se manifiesta como la diferencia entre los factores de transmisión asociados a estas dos regiones de la célula (Calvo, M.L. et al., 1984).

(*): $g(ar) = 1/a G(\rho/a)$

La contribución asociada al citoplasma es:

$$\begin{aligned}
 A_2(\rho) = & t_C (e^{i\phi_C} - e^{i\phi_M}) \frac{d_C^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_C)}{\pi\rho d_C} + e^{i\phi_M} \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} \cdot \\
 & \left\{ - \frac{d_C^4}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_C)}{\pi\rho d_C} - \frac{d_C^3}{2\pi\rho} \frac{J_2(\pi\rho d_C)}{\pi\rho d_C} + \frac{d_C^4}{4} \frac{J_3(\pi\rho d_C)}{\pi\rho d_C} \right\} - \\
 & - e^{i\phi_M} \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} \frac{d_C^3}{2\pi\rho} (-0.25). \\
 & \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(2k+1)\Gamma(k-1/2)}{\Gamma(k+5/2)} J_{2k+1}(\pi\rho d_C) \quad (2.11)
 \end{aligned}$$

El primer término de (2.11) es equivalente al obtenido en la contribución nuclear, y de igual manera, depende de la función de Airy, que ahora tiene el argumento proporcional al diámetro asociado al citoplasma. Los factores que multiplican a la función de Airy son resultado de la discontinuidad que presentan las fases asociadas a cada zona, que hacen que la función de transmisión no sea continua al pasar de una zona a otra. Es, pues, esta diferencia de fases la que da lugar al fenómeno de difracción en el borde citoplasma-membrana.

Los términos segundo y tercero de la expresión (2.11) son consecuencia de la definición dada para el factor de transmisión de la membrana celular. Como se recordará este factor responde a una función parabólica y continua que hace que el factor de transmisión varíe de t_C a t_M de forma muy suave. Por esta razón no existe una discontinuidad en el borde que sea responsable del fenómeno de difracción, sino que existirán infinitos bordes ya que

$t_M(r')$ toma un valor distinto para cada r' comprendido entre $d_C/2$ y $d_T/2$.

La contribución de la membrana es:

$$\begin{aligned}
 A_3(\rho) = & e^{i\phi_M} t_C \frac{d_T^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} + e^{i\phi_M} \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} \cdot \\
 & \left\{ \frac{d_C^2 d_T^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} + \frac{d_T^3}{2\pi\rho} \frac{J_2(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} - \frac{d_T^3}{4} \frac{J_3(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} \right\} + \\
 & + e^{i\phi_M} \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} \frac{d_C d_T^2}{2\pi\rho} (-0.25) . \\
 & \cdot \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(2k+1)\Gamma(k-1/2)}{\Gamma(k+5/2)} J_{2k+1}(\pi\rho d_T) \quad (2.12)
 \end{aligned}$$

El primer sumando de esta contribución es consecuencia de la difracción asociada al borde más exterior de la célula. Al igual que en los casos anteriores depende de la función de Airy de argumento proporcional al diámetro total celular. Los demás términos que aparecen en la expresión (2.12) tienen una interpretación análoga a la realizada en la contribución del citoplasma.

2.3.- EFFECTO DEL DESPLAZAMIENTO DEL NUCLEO SOBRE LA RESPUESTA EN EL PLANO DE FOURIER.

Un amplio porcentaje de las células biológicas presentan su núcleo desplazado con respecto al centro de simetría. La posición del núcleo varía de unas células a otras, dentro incluso de especímenes biológicos que pertenecen a un mismo grupo. Debien

do suponerse, como norma general, que dicha posición es aleatoria; esta situación fuerza a redefinir la función de transmisión, ec. (1.40), de forma que se tenga en cuenta este fenómeno. En la Fig. 5 se representa la nueva función, siendo \bar{E} el vector desplazamiento del núcleo. En esta figura puede apreciarse cómo la función de transmisión pierde la simetría circular pasando a depender de las variables radial y angular (Chevalier, M. et al., 1983). Así tendremos que:

$$t(r') \rightarrow t(r', \theta)$$

y la expresión de la función de transmisión será en coordenadas polares:

$$t(r', \theta) = \begin{cases} t_N e^{i\phi_N} - t_C e^{i\phi_C} & (r'^2 - E(r', \theta)) \leq (d_N/2)^2 \\ t_C e^{i\phi_C} & 0 \leq r' \leq d_C/2 \\ t_M(r') e^{i\phi_M} & d_C/2 \leq r' \leq d_T/2 \end{cases} \quad (2.13)$$

donde $E(r', \theta)$ representa la función desplazamiento. En el Apéndice B se calcula la transformada de Fourier asociada a esta función, obteniéndose que la distribución de amplitud es:

$$\Psi(r_0) = \frac{1}{i\lambda f} e^{ikf} e^{ikr_0^2/2f} \sum_{i=1}^3 A_i(\rho) \Big|_{\rho = r_0/\lambda f} \quad (2.14)$$

siendo la contribución nuclear:

$$A_1(\rho) = e^{-2\pi i \rho \bar{E}} (t_N e^{i\phi_N} - t_C e^{i\phi_C}) \frac{d_N^2}{4} \frac{J_1(\pi \rho d_N)}{\pi \rho d_N} \quad (2.15)$$

Este resultado es análogo al obtenido en el apartado 2.2 diferenciándose únicamente en el factor de fase que depende del desplazamiento asociado al núcleo.

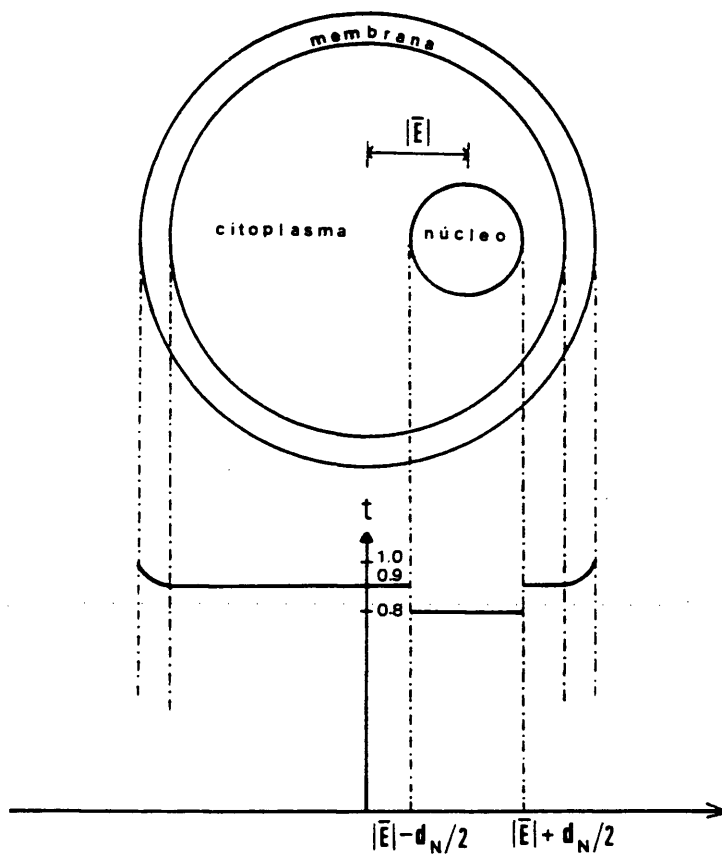


Fig. 5.- Función de transmisión asociada a una célula biológica cuyo núcleo se encuentra desplazado del centro de simetría.

Las contribuciones del citoplasma, $A_2(\rho)$, y de la membrana, $A_3(\rho)$, coinciden con las obtenidas cuando el núcleo no está desplazado (ecs. (2.11) y (2.12)), razón por la cual no se incluyen aquí.

Como conclusión podemos decir que la única modificación que sufre la distribución de amplitud en el plano de Fourier es la aparición de un término de fase adicional, proporcional al desplazamiento y que afecta únicamente a la contribución nuclear.

La distribución de intensidad se calcula como:

$$I(x_0) = \psi(x_0)\psi^*(x_0) = \frac{1}{\lambda^2 f^2} \{A_1^2(x_0) + A_2^2(x_0) + A_3^2(x_0) + 2 \operatorname{Re} \left[(A_1 A_2^*) + (A_1 A_3^*) + (A_2 A_3^*) \right]\} \quad (2.16)$$

Esta distribución presenta factores interferenciales que dependen del desplazamiento asociado al núcleo.

2.4.- PARTICULARIDADES EN LA FUNCION DE TRANSMISION: VARIACIONES DE LA RESPUESTA EN EL PLANO DE FOURIER.

En el apartado 2.2 se ha estudiado la respuesta en el plano de Fourier cuando se asociaba a la célula biológica una función de transmisión compleja en la forma:

$$t(x') = A(x') e^{i\phi(x')}$$

que implica suponer que la célula es un objeto que absorbe radiación y que tiene un espesor no despreciable (ver Sección 1.3). A continuación estudiaremos ciertas particularidades en la función de transmisión que están relacionadas con comportamientos más pró

ximos a la morfología real de una célula biológica, por lo que a su descripción macroscópica se refiere.

2.4.1.- La célula como objeto de fase.

Considerar a la célula como un objeto exclusivamente de fase significa matemáticamente que:

$$t_N = t_C = t_M = 1$$

Sustituyendo estos valores en el factor de transmisión asociado a la membrana (ec. (1.35)), obtenemos que $t_M(r') = 1$, perdiéndose el carácter de continuidad existente entre los factores de transmisión del citoplasma y de la membrana.

Bajo estas condiciones la función de transmisión será ahora:

$$t(r') = e^{i\phi(r')} = \begin{cases} e^{i\phi_N} & 0 \leq r \leq d_N/2 \\ e^{i\phi_C} & d_N/2 \leq r \leq d_C/2 \\ e^{i\phi_M} & d_C/2 \leq r \leq d_T/2 \end{cases} \quad (2.17)$$

y por tanto $|t(r')|^2 = 1$ en cualquiera de las regiones de la célula. Físicamente, esto significa que la célula es un objeto transparente siendo ésta la situación más común a la mayoría de las células biológicas. Por ello, el estudio de las mismas requiere, en la mayoría de los casos, la utilización de técnicas especiales que permitan su observación. Tal es el caso, por ejemplo, de las técnicas de observación por contraste de fase para el estudio de células inmersas en preparaciones cuyas propiedades ópticas están muy próximas a las de la célula. Como es sabido este método tiene la ventaja de no tener que someter a los especímenes biológicos a procesos de tinción, que siempre conllevan modificaciones en sus propiedades.

Interesa comentar que si bien el coeficiente de atenuación de la célula se hace igual a la unidad, la sección eficaz σ tal no se anula. En efecto, volviendo a la ec. (1.57) se obtiene en este caso:

$$\sigma = 2 \left[d^2 \underline{\Gamma}' \{1 - \text{Re} [t(x', y')]\} \right] \quad (2.18)$$

Es decir, de acuerdo con (2.13):

$$\sigma = 2 \left[d^2 \underline{\Gamma}' \{1 - \cos \phi(x', y')\} \right] \quad (2.19)$$

lo cual implica físicamente que el fenómeno de scattering se sigue produciendo y, por tanto, puede ser estudiado por las técnicas de análisis difraccional.

Nótese que σ solo se anularía para valores de la fase ϕ tales que $\phi(x', y') = 0$, lo cual, a su vez, significaría la no existencia de centros de scattering.

En la ec. (2.17) ϕ_N , ϕ_C y ϕ_M son los factores de fase asociados a cada parte de la célula. Asumimos que éstas tienen un espesor no despreciable y por tanto, las fases son constantes y mayores que la unidad.

La amplitud de difracción será, al igual que en el caso anterior:

$$\psi(r_0) = \frac{1}{i\lambda f} e^{ikf} e^{ikr_0^2/2f} \sum_{i=1}^3 A_i(\rho) \quad (2.20)$$

siendo $A_i(\rho)$ la contribución de cada parte de la célula a la amplitud total de difracción. Cada una de ellas se calcula poniendo $t_N = t_C = t_M = 1$ en su ecuación correspondiente (ecs. (2.10), (2.11) y (2.12)). Así tendremos que:

$$A_1(\rho) = (e^{i\phi_N} - e^{i\phi_C}) \frac{d_N^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_N)}{\pi\rho d_N} \quad (2.21)$$

$$A_2(\rho) = (e^{i\phi_C} - e^{i\phi_M}) \frac{d_C^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_C)}{\pi\rho d_C} \quad (2.22)$$

$$A_3(\rho) = e^{i\phi_M} \frac{d_T^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} \quad (2.23)$$

Así, pues, la contribución debida al núcleo es análoga a la obtenida en el caso general. Se obtiene una función de Airy multiplicada por la diferencia entre los factores de transmisión del núcleo y del citoplasma. Nótese, que en este caso, el fenómeno de difracción se produce como consecuencia de la diferencia que existe entre las fases.

Las contribuciones del citoplasma (ec. (2.22)) y de la membrana (ec. (2.23)) quedan mucho más simplificadas debido a que los factores de transmisión asociados al citoplasma y a la membrana, t_C y t_M , son constantes e iguales a la unidad, perdiéndose la contribución originada por la variación parabólica asociada a la membrana. En este caso, $A_2(\rho)$ y $A_3(\rho)$ dependen exclusivamente de la función de Airy cuyo argumento es múltiplo de los diámetros del citoplasma y total de la célula. En $A_3(\rho)$ el factor que multiplica a la función de Airy tiene dependencia unicamente con ϕ_M debido a que la difracción está originada en este caso por el salto brusco que se produce entre la parte más externa de la célula y el medio que la contiene, cuya fase asociada es nula.

La distribución de la intensidad en el plano de difracción se obtiene como:

$$I(x_0) = \Psi(x_0) \Psi^*(x_0) \quad (2.24)$$

2.4.1.1.- Efecto del desplazamiento del núcleo.

La función de transmisión en este caso se obtiene sustituyendo en la ec. (2.13) los factores de transmisión por la unidad, teniendo entonces que:

$$t(x', \theta) = \begin{cases} e^{i\phi_N} - e^{i\phi_C} & 0 \leq (r'^2 - E(r', \theta)) \leq (d_N/2)^2 \\ e^{i\phi_C} & 0 \leq r' \leq d_C/2 \\ e^{i\phi_M} & 0 < r' \leq d_T/2 \end{cases} \quad (2.25)$$

La distribución de amplitud, al igual que en los casos anteriores, vuelve a obtenerse como suma de tres términos que corresponden a las contribuciones del núcleo, citoplasma y membrana respectivamente.

Como ya se apuntó en el Apartado 2.4 el desplazamiento del núcleo sólo afecta a la contribución nuclear que está multiplicada por un término de fase que depende del desplazamiento. Así pues, la contribución nuclear se expresará en este caso como:

$$A_1(\rho) = e^{-2\pi i \bar{\rho} \bar{E}} (e^{i\phi_N} - e^{i\phi_C}) \frac{d_N^2}{4} \frac{J_1(\pi \rho d_N)}{\pi \rho d_N} \quad (2.26)$$

Como consecuencia la amplitud total estará afectada de un factor de fase, y la distribución de intensidad, también expresada en este caso por la ec. (2.16), presentará términos interferenciales dependientes del desplazamiento.

2.4.2.- La célula como objeto de amplitud.

Considerar a la célula como un objeto de amplitud supone despreciar los posibles efectos en la difracción derivados de las fases. Se supone pues:

$$\phi_N = \phi_C = \phi_M = 0 \quad (2.27)$$

Esto implica que en la ec. (1.21) el término de fase eikonal se hace igual a la unidad y, por tanto, la función de transmisión es real y depende únicamente del coeficiente de atenuación $A(x', y')$. Como consecuencia, si consideramos la ec. (1.24) tendremos que $\text{Re } \epsilon(x', y') \equiv 1$, y considerando la ec. (1.23), $\text{Im } \epsilon(x', y') > 0$. Así pues, la presencia de la célula no modificará la fase de la onda incidente pero, a diferencia del caso anterior, absorberá energía.

La función de transmisión definida en la ec. (1.39) se expresará ahora como:

$$t(r') = A(r') = \begin{cases} t_N & 0 \leq r \leq d_N/2 \\ t_C & d_N/2 \leq r \leq d_C/2 \\ t_M(r') & d_C/2 \leq r \leq d_T/2 \end{cases} \quad (2.28)$$

La sección eficaz definida en la ec. (1.57) depende de una función que es estrictamente real.

La respuesta en el plano de Fourier será:

$$\psi(r_0) = \frac{1}{i\lambda f} e^{ikf} e^{ikr_0^2/2f} \sum_{i=1}^3 A_i(\rho) \Big|_{\rho = r_0/\lambda f} \quad (2.29)$$

Sustituyendo la condición expresada por la ec. (2.21) en las expresiones (2.10), (2.11) y (2.12) obtendremos las tres con-

tribuciones a la amplitud total. La contribución del núcleo será:

$$A_1(\rho) = (t_N - t_C) \frac{d_N^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_N)}{\pi\rho d_N} \quad (2.30)$$

La contribución del citoplasma:

$$\begin{aligned} A_2(\rho) = & \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} \left\{ - \frac{d_C^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_C)}{\pi\rho d_C} - \frac{d_C^2}{2\pi\rho} \frac{J_2(\pi\rho d_C)}{\pi\rho d_C} + \right. \\ & \left. + \frac{d_C^4}{4} \frac{J_3(\pi\rho d_C)}{d_C} + \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} \frac{d_C^3}{4} (-0.25) \right\} \\ & \cdot \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(2k+1) \Gamma(k-1/2)}{\Gamma(k+5/2)} J_{2k+1}(\pi\rho d_C) \quad (2.31) \end{aligned}$$

Y finalmente, la contribución de la membrana celular:

$$\begin{aligned} A_3(\rho) = & t_C \frac{d_T^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} + \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} \left\{ \frac{d_C^2 d_T^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} + \right. \\ & \left. + \frac{d_T^3}{2\pi\rho} \frac{J_2(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} - \frac{d_T^3}{4} \frac{J_3(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} \right\} + \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} \cdot \\ & \cdot \frac{d_C d_T^2}{2\pi\rho} (-0.25) \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(2k+1) \Gamma(k-1/2)}{\Gamma(k+5/2)} J_{2k+1}(\pi\rho d_T) \quad (2.32) \end{aligned}$$

En este caso las tres contribuciones son reales. Cabe resaltar cómo ahora, en la contribución asociada al citoplasma, no aparece el término que dependía de la función de Airy. Esto se debe a que la función de transmisión (2.28) es continua y no existe

borde definido entre el citoplasma y la membrana que origine un fenómeno de difracción. La interpretación de estas tres expresiones es análoga a la realizada en el caso general.

La intensidad en el plano de Fourier se obtiene como:

$$I(\rho) = \Psi(\rho) \Psi^*(\rho) = 2 \left[\text{Re } \Psi(\rho) \right]^2 \quad (2.33)$$

de cuya interpretación numérica se podrá obtener las posibles variaciones del patrón de difracción respecto del obtenido al suponer la célula como objeto de fase puro o como objeto de fase y amplitud. Aspectos que serán comentados en posteriores capítulos.

2.4.2.1.- Efecto del desplazamiento del núcleo.

Al sustituir en la ec. (2.13) los factores de fase por cero obtenemos la siguiente expresión para la función de transmisión:

$$t(r', \theta) = \begin{cases} t_N - t_C & 0 \leq (r'^2 - E(r', \theta)) \leq (d_N/2)^2 \\ t_C & 0 \leq r' \leq d_C/2 \\ t_M(r') & 0 \leq r' \leq d_T/2 \end{cases} \quad (2.34)$$

Al igual que en los anteriores casos estudiados, la única contribución que sufre modificaciones es la contribución nuclear cuya expresión será ahora:

$$A_1(\rho) = e^{-2\pi i \bar{\rho} \bar{E}} (t_N - t_C) \frac{d_N^2}{4} \frac{J_1(\pi \rho d_N)}{\pi \rho d_N} \quad (2.35)$$

Las distribuciones de amplitud e intensidad se ven afectadas por el término de fase dependiente del desplazamiento en igual forma que en los apartados 2.3 y 2.1.1.

2.5.- APROXIMACIONES PARA VALORES DE FASE PEQUEÑOS.

En todos los casos hasta ahora estudiados hemos supuesto que las fases asociadas a cada parte de la célula, ϕ_N , ϕ_C y ϕ_M , eran constantes no despreciables. Recuérdese que según la Óptica Geométrica la fase asociada a un objeto depende del espesor Δ y del índice de refracción ($\phi = 2\pi/\lambda \Delta(n^2 - 1)$). En este apartado vamos a considerar que Δ es muy pequeño y que, por ello, las fases tomarán valores menores que la unidad (Chevalier, M. et al., 1985).

2.5.1.- Caso general.

Teniendo en cuenta la hipótesis anterior, la función de transmisión definida como:

$$t(r') = A(r') e^{i\phi(r')}$$

puede ahora escribirse como:

$$t(r') = A(r') (1 + i\phi(r')) \quad (2.36)$$

al considerar que la fase toma valores menores que la unidad. En esta aproximación puede hacerse uso del desarrollo en serie de Taylor obteniendo la expresión arriba indicada para la función de transmisión.

En la ec. (2.36) el primer término del lado derecho representa la atenuación que sufre el haz incidente al atravesar la célula. El segundo término representa el haz propiamente difractado por el objeto tal y como se ha constatado en la ec. (2.19).

La respuesta en el plano de Fourier asociada a esta función de transmisión será ahora:

$$\begin{aligned} \psi(r_0) &= \frac{1}{i\lambda f} e^{ikf} e^{ikr_0^2/2f} \beta \left\{ t(r') \right\} = \\ &= \frac{1}{i\lambda f} e^{ikf} e^{ikr_0^2/2f} \left\{ \beta \left[A(r') \right] + i\beta \left[A(r') \phi(r') \right] \right\} \end{aligned} \quad (2.37)$$

donde $A(x')$ y $\phi(x')$ son las funciones definidas en las ecs. (1.30) y (1.31).

La parte real de la transformada de Bessel-Fourier será:

$$\Re\{A(x')\} = 2\pi \sum_{i=1}^3 A_i(\rho) \Big|_{\rho=r_0/\lambda f} \quad (2.38)$$

donde $A_1(\rho)$, $A_2(\rho)$ y $A_3(\rho)$ (partes reales de las contribuciones del núcleo, citoplasma y membrana respectivamente) coinciden con las expresiones (2.30), (2.31) y (2.32) obtenidas en el caso de amplitud.

La parte imaginaria de la transformada de Bessel-Fourier será:

$$\Im\{A(x') \phi(x')\} = 2\pi \sum_{i=1}^3 B_i(\rho) \Big|_{\rho=r_0/\lambda f} \quad (2.39)$$

donde la parte imaginaria de la contribución nuclear es:

$$B_1(\rho) = (t_N \phi_N - t_C \phi_C) \frac{d_N^2}{4} \frac{J_1(\pi \rho d_N)}{\pi \rho d_N} \quad (2.40)$$

La parte imaginaria de la contribución citoplasmática es así expresada por:

$$\begin{aligned} B_2(\rho) = & t_C (\phi_C - \phi_M) \frac{d_C^2}{4} \frac{J_1(\pi \rho d_C)}{\pi \rho d_C} + \phi_M \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} \cdot \\ & \cdot \left(-\frac{d_C^4}{4} \frac{J_1(\pi \rho d_C)}{\pi \rho d_C} - \frac{d_C^3}{2\pi \rho} \frac{J_2(\pi \rho d_C)}{\pi \rho d_C} + \frac{d_C^4}{4} \frac{J_3(\pi \rho d_C)}{\pi \rho d_C} \right) - \\ & - \phi_M \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} \frac{d_C^3}{2\pi \rho} (-0.25) \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(2k+1) \Gamma(k-1/2)}{\Gamma(k+5/2)} J_{2k+1}(\pi \rho d_C) \end{aligned} \quad (2.41)$$

Por último, la parte imaginaria de la contribución asociada a la membrana es:

$$\begin{aligned}
 B_3(\rho) = & \phi_M t_C \frac{d_T^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} + \phi_M \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} \cdot \\
 & \cdot \left\{ \frac{d_C^2 d_T^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} + \frac{d_T^3}{2\pi\rho} \frac{J_2(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} - \frac{d_T^3}{4} \frac{J_3(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} \right\} + \\
 & + \phi_M \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} \frac{d_C d_T^2}{2\pi\rho} (-0.25) \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(2k+1) \Gamma(k-1/2)}{\Gamma(k+5/2)} J_{2k+1}(\pi\rho d_C)
 \end{aligned} \tag{2.42}$$

Si comparamos estas expresiones con las obtenidas en el caso general (ecs. (2.10), (2.11) y (2.12)) observamos que se diferencian en la dependencia con las fases asociadas a cada zona de la célula. Mientras que en el caso general ésta era exponencial, cuando se consideran fases mucho menores que la unidad la dependencia es lineal. La interpretación de estas tres expresiones es análoga a la hecha en el Apartado 2.2.

La distribución de la amplitud de difracción será:

$$v(x_0) = \frac{2\pi}{i\lambda f} e^{ikf} e^{ikx_0^2/2f} \left[\sum_{i=1}^3 A_i(\rho) + i \sum_{i=1}^3 B_i(\rho) \right] \tag{2.43}$$

Y la distribución de intensidad en el plano de Fourier será por tanto:

$$I(x_0) = v(x_0) v^*(x_0) = \frac{4\pi^2}{\lambda^2 f^2} \left\{ \left[\sum_{i=1}^3 B_i(\rho) \right]^2 + \left[\sum_{i=1}^3 A_i(\rho) \right]^2 \right\} \tag{2.44}$$

2.5.2.- Caso de fase.

Si la función de transmisión anteriormente definida para un objeto de fase era:

$$t(r') = e^{i\phi(r')} \quad (2.45)$$

al considerar fases mucho menores que la unidad, puede desarrollarse la expresión en serie de Taylor, como se hizo en el caso anterior, obteniéndose:

$$t(r') = 1 + i \phi(r') \quad (2.46)$$

Nótese que el módulo de la función de transmisión definida en (2.45) es:

$$|t(r')|^2 = 1$$

mientras que en la función aproximada toma el valor:

$$|t(r')|^2 \approx 1$$

si se desprecian términos de segundo grado ($\phi^2(r')$).

La expresión (2.46) se puede analizar considerando que el primer sumando del lado derecho representa el haz incidente que no sufre modificaciones debidas a la presencia del objeto, y el segundo representa el haz propiamente difractado por el objeto, tal como se constató en la ec. (2.19).

En este caso particular la amplitud de difracción se calcula como:

$$\psi(r_0) = \frac{1}{i\lambda f} e^{ikf} e^{ikr_0^2/2f} \beta \left\{ t(r') \right\}$$

Sustituyendo $t(r')$ por la ec. (2.46) tenemos que:

$$\Psi(x_0) = \frac{1}{i\lambda f} e^{ikf} e^{ikr_0^2/2f} \{ \beta(1) + i \beta(\phi(x')) \}$$

Para calcular $\beta(1)$ partimos de la expresión general de la transformada de Bessel-Fourier:

$$\beta(g(x)) = 2\pi \int_0^\infty x J_0(2\pi x \rho) g(x) dx$$

que en el caso en que $g(x) = e^{-px}$ se resuelve obteniendo (Oberhettinge, P., 1972):

$$\int_0^\infty x e^{-px} J_0(ax) dx = \frac{p}{(a^2 + p^2)^{3/2}} ; \text{Re}(p) > 0$$

en nuestro caso $p = 0$, y por tanto:

$$\int_0^\infty x J_0(2\pi x \rho) dx = \begin{cases} 0 & ; \rho \neq 0 \\ +\infty & ; \rho = 0 \end{cases}$$

Es decir:

$$\beta(1) = 2\pi \delta(\rho) = \begin{cases} 0 & ; \rho \neq 0 \\ +\infty & ; \rho = 0 \end{cases}$$

Así la distribución de amplitud será:

$$\Psi(x_0) = \frac{1}{i\lambda f} e^{ikf} e^{ikr_0^2/2f} 2\pi \left\{ \delta(\rho) + i \beta(\phi(x')) \right\} \quad (2.47)$$

La función $\phi(x')$ está definida en la ec. (1.39) y su transformada de Bessel-Fourier será:

$$\delta(\phi(x')) = 2\pi \sum_{i=1}^3 A_i(\rho)$$

donde la contribución nuclear es:

$$A_1(\rho) = (\phi_N - \phi_C) \frac{d_N^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_N)}{\pi\rho d_N} \Big|_{\rho = r_0/\lambda f} \quad (2.48)$$

La contribución citoplasmática es:

$$A_2(\rho) = (\phi_C - \phi_M) \frac{d_C^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_C)}{\pi\rho d_C} \Big|_{\rho = r_0/\lambda f} \quad (2.49)$$

Y por último, la contribución de la membrana es:

$$A_3(\rho) = \phi_M \frac{d_T^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} \Big|_{\rho = r_0/\lambda f} \quad (2.50)$$

Estas expresiones son equivalentes a las obtenidas en el caso de fase. Al igual que en el apartado anterior, la dependencia con la fase es ahora lineal.

La distribución de la intensidad en el plano de Fourier se calcula como:

$$I(r_0) = \psi(r_0) \psi^*(r_0) = \frac{4\pi^2}{\lambda^2 f^2} \left\{ \delta(\rho) \cdot \delta(0) + \left[\sum_{i=1}^3 A_i(\rho) \right]^2 \right\} \quad (2.51)$$

donde $\delta(\rho) \cdot \delta(0)$ implica la existencia de un spot luminoso en el centro de la figura de difracción superpuesto con la distribución de intensidad debida al segundo sumando que aparece en la expresión (2.51).

BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 2.

- 1.- ABRAMOWITZ, M. & STEGUN, I. : "Handbook of Mathematical Functions". (Ed. Dover Publications, N.Y., 1972):
 - i) Sección 9, Fórmula 9.1.30
 - ii) Sección 9, Fórmula 9.1.27
 - iii) Sección 11, Fórmula 11.1.1
- 2.- CALVO, M.L., CHEVALIER, M. & CARRERAS, C.: "Optical Image Processing to determine the Optical Properties of Cellular Membranes". Applied Optics, 23, pp. 234 (1984).
- 3.- CATHEY, W.T.: "Optical Information Processing and Holography". (Ed. John Wiley & Sons, N.Y., 1974):
 - i) Capítulo 1
 - ii) Capítulo 5
- 4.- CHEVALIER, M., CALVO, M.L. & CARRERAS, C.: "Modelo teórico para la función de transmisión de una célula biológica y Transformada de Fourier". Rev. Real Ac. CC. Ex. Fis. y Nat., Tomo LXXVII, Cuaderno 4º, pp. 831-5 (1983).
- 5.- CHEVALIER, M., CALVO, M.L. & CARRERAS, C.: "Influence of small phase variations in the diffraction pattern of a biological cell". Proc. SPIE The Int. Soc. Opt. Eng., (1985), volumen en prensa.
- 6.- OBERHETTINGER, F.: "Tables of Bessel Transforms". (Ed. Springer-Verlag, Berlin, 1972).
- 7.- PAPOULIS, A.J.: "Systems and Transforms with applications in Optics". (Ed. McGraw-Hill, N.Y., 1968). Capítulo 5.

CAPITULO 3

ANALISIS NUMERICO

3.1.- INTRODUCCION.

Una vez estudiada analíticamente la respuesta en el plano de Fourier, en este capítulo se lleva a cabo el análisis numérico de las expresiones obtenidas para las distribuciones de amplitud compleja así como para la distribución de intensidad difractada.

Este análisis nos permitirá obtener resultados cuantitativos pudiendo, además, determinar cómo influyen los distintos parámetros en el patrón de difracción asociado a la función de transmisión definida en el capítulo anterior (Catsimpoolas, N., 1982).

La complejidad de las expresiones analíticas no permite, en la mayoría de los casos, determinar la influencia de cada una de las partes de la célula en el patrón de difracción. El estudio numérico, sin embargo, nos proporciona esta información. Este estudio se ha llevado a cabo dando valores particulares a los diferentes parámetros que caracterizan ópticamente a la célula (Cap. 1, Sección 4). Con el fin de que el comportamiento óptico de nuestro modelo sea de la mayor utilidad, se han asignado valores a los parámetros próximos a los presumidos para una célula viva, inmersa en su entorno biológico real (Volkenshtein, M.V., 1983).

La potencia del método de cálculo ha permitido obtener una enorme cantidad de resultados, que corresponden a células con diferentes funciones de transmisión. La comparación de los distintos patrones de difracción con los que puedan ser obtenidos experimentalmente, conducirá a un conocimiento bastante exacto del comportamiento óptico de la célula real en cuestión.

En el Capítulo 4 se discutirán, a título de ejemplo, algunos resultados de este tipo.

3.2.- CONDICIONES GENERALES.

De entre los parámetros que caracterizan una célula biológica, hay una serie de ellos a los que asignaremos siempre los mismos valores, independientemente de la situación concreta que se esté analizando. Estos son:

- Diámetro del núcleo: $d_N = 2 \times 10^{-5}$ m.
- Diámetro del citoplasma: $d_C = 7.9 \times 10^{-5}$ m.
- Diámetro total de la célula: $d_T = 8 \times 10^{-5}$ m.

que corresponden a tamaños promedio de las células parabasales utilizadas en el estudio experimental. Estos valores fueron obtenidos con un microscopio Zeiss Universal por el método de contraste interferencial.

- Factor de transmisión del núcleo: $t_N = 0.8$
- Factor de transmisión de la membrana: $t_M = 1.0$

que implica suponer al núcleo de la célula como la parte que absorbe mayor cantidad de energía y al borde más exterior, como la zona más transparente. En cualquier caso, estos valores indican que la célula es un objeto que absorbe débilmente la radiación.

Como se apreciará, al factor de transmisión del citoplasma no se le da ningún valor fijo, considerándolo como variable en el estudio.

Si los valores arriba indicados se sustituyen en la Eq. (1.28), que relaciona el factor de atenuación con la permeabilidad dieléctrica $\epsilon(x',y')$ para medios que absorben débilmente la radiación, se obtiene:

- para el núcleo: $k\Delta/2 \text{Im}\epsilon(x',y') = 0.2$
- para el borde más exterior de la membrana:
 $k\Delta/2 \text{Im}\epsilon(x',y') = 0.0$

Las constantes del sistema óptico son:

- Longitud de onda de la radiación incidente: $\lambda = 632.8$ nm, que corresponde a un laser de He-Ne.

- Distancia focal: $f = 1.8 \times 10^{-3}$ m, que corresponde a un objetivo de microscopio de 100x.

La elección de un objetivo de microscopio como lente transformadora equivale a realizar el análisis de Fourier de la célula "in vivo" (Seger, G. et al., 1977).

Hay que señalar, sin embargo, que la obtención analítica de la Transformada de Fourier se ha realizado sin considerar la apertura finita de la lente transformadora. En condiciones reales, la respuesta de Fourier que se obtendría estaría convolucionada con la función pupila de la lente (Hutzler, P.I.S., 1977).

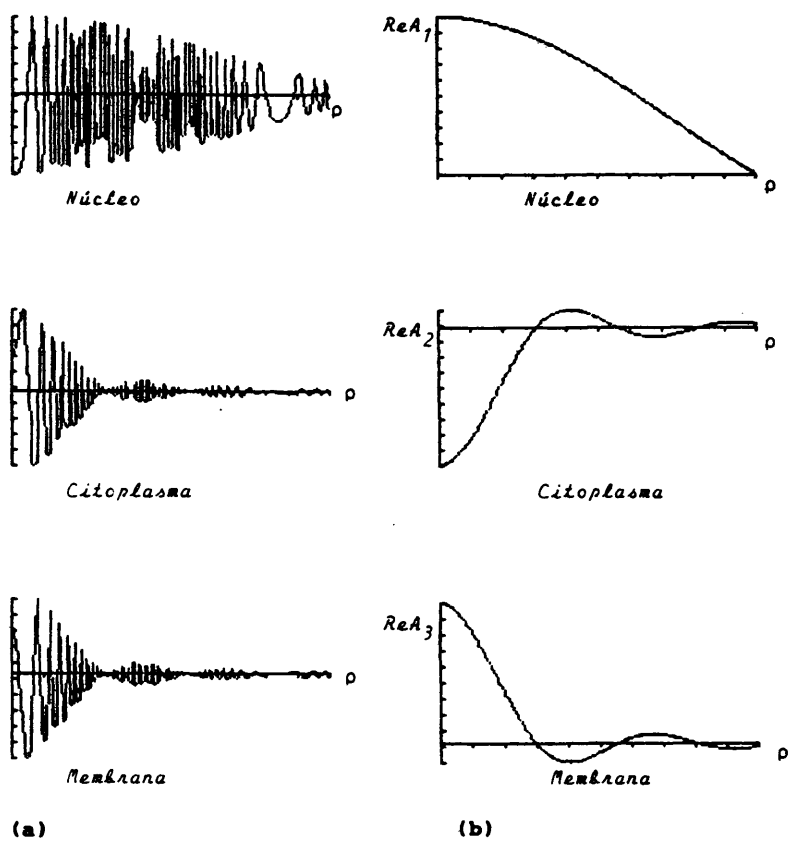
En todos los casos se evalúan las amplitudes de difracción asociadas a cada zona de la célula, la amplitud total y la distribución de intensidad. En los resultados gráficos hay que señalar que, cuando se trata de amplitudes, se representan las partes reales sobre el eje de ordenadas, sin considerar el factor de fase asociado a la onda que multiplica a la amplitud total, Eq. (2.2), salvo el factor $1/i\lambda f$, lo que implica un desfase de $\pi/2$ en la parte real de las amplitudes. Si se considera el factor de fase asociado a la onda, las amplitudes que se obtienen presentan una fuerte oscilación, como puede verse en la Graf. 1a, que a su vez estaría modulada por la amplitud de la Transformada de Fourier de que se tratase. Esta oscilación enmascara la amplitud de la contribución en estudio (Graf. 1b). En abscisas, la variable es, en todos los casos, la frecuencia espacial radial, ρ , que toma valores en el intervalo comprendido entre 0 y 50 mm^{-1} . (Los intervalos indicados en las gráficas corresponden a 5 mm^{-1} ; la escala de las ordenadas se adapta de manera que su totalidad corresponde a la diferencia entre los valores máximo y mínimo de la función que se representa).

El estudio numérico se ha realizado en un microordenador SHARP MZ-80B en lenguaje BASIC. Los programas utilizados en el cálculo se muestran en el Apéndice D.

3.3.- CASO GENERAL.

3.3.1.- Núcleo centrado.

Se han evaluado las partes reales de las Eqs. (2.10),



Graf. 1.- Parte real de la amplitud asociada a las contribuciones de cada una de las zonas de la célula:
 (a) Considerando el factor de fase asociado a la onda ($\exp(ikf) \exp(ikn_0^2/2f)$)
 (b) Sin considerarlo.

(2.11) y (2.12), que son, respectivamente, las contribuciones asociadas al núcleo, citoplasma y membrana, así como la Eq. (2.9) que representa la amplitud total. La distribución de intensidad en el plano de Fourier se obtiene a partir de esta última según la relación:

$$I(r_0) = \psi(r_0) \psi^*(r_0)$$

En las expresiones (2.11) y (2.12) puede observarse la dependencia de las contribuciones del citoplasma y de la membrana con una serie de funciones de Bessel de orden impar y argumentos proporcionales a los diámetros asociados a cada una de estas partes. Un primer paso en su estudio numérico lo ha constituido el definir una cota al número de términos que tomamos en la serie (en el Apéndice A se discute su convergencia), con la condición extra de que la cota que se tome sea tal que tanto la amplitud total como la intensidad de difracción (que también dependen de estas series) respondan a las características de un objeto que presenta simetría circular. Este primer estudio se ha trasladado al Apéndice C.

a) Análisis de la contribución del núcleo:

La expresión analítica estudiada es:

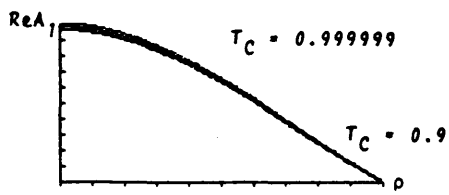
$$\text{Re } A_1(r_0) = (2\pi/\lambda f) (t_N \text{ sen } \phi_N - t_C \text{ sen } \phi_C) \frac{d_N^2}{4} \frac{J_1(\pi \rho d_N)}{\pi \rho d_N} \Big|_{\rho = r_0/\lambda f}$$

y los resultados obtenidos son los siguientes:

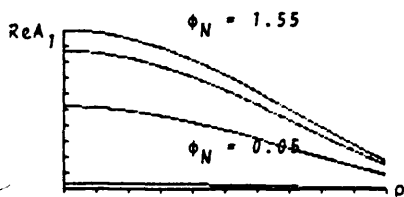
- En el intervalo de frecuencias espaciales sobre el que se ha realizado el estudio, la contribución del núcleo toma siempre valores positivos. La primera frecuencia de corte aparecería en 61 mm^{-1} ($d_N = 0.02 \text{ mm}$) que cae fuera de la región estudiada; esta contribución toma su valor máximo en el origen, Graf. 2.

Las variaciones con los parámetros de los que depende se pueden resumir como sigue:

- Esta contribución se mantiene constante cuando varía el factor de transmisión del citoplasma, Graf. 2a.
- Aumenta con la fase del núcleo, Graf. 2b.



(a)
 $\phi_N = 1.05 \text{ rad.}$



(b)
 $T_C = 0.999$

Graf. 2.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud asociada al núcleo.

b) Análisis de la contribución del citoplasma:

La expresión estudiada, en este caso, es la parte real de la Eq. (2.11), que puede escribirse en la forma:

$$\text{Re } A_2(r_0) = (2\pi/\lambda f) \{ (\text{sen } \phi_C - \text{sen } \phi_M) C_1(r_0) + C_2(r_0) \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} \text{sen } \phi_M \} \quad (3.3.1)$$

donde C_1 y C_2 son funciones independientes de las fases y de los factores de transmisión.

El predominio de uno de los dos sumandos sobre el otro es el factor que rige el comportamiento de esta contribución, y este predominio va a depender del valor que tome el factor de transmisión asociado al citoplasma, t_C . Para pequeñas variaciones de éste, en torno a la unidad, el factor que multiplica al segundo sumando puede tomar valores que difieren en varios órdenes de magnitud. De acuerdo con esto, los resultados son:

- Cuando $t_C \approx t_M$ ($t_C = 0.999999$), el factor $(t_M - t_C)/(d_t - d_C)^2$ vale 1 mm^{-2} , y como consecuencia, predomina el primer sumando (función de Airy). Los resultados muestran un comportamiento oscilatorio, Graf. 3a, independientemente del valor que tome la fase ϕ_M asociada a la membrana, como corresponde a la amplitud de difracción asociada a un objeto con simetría circular. Los valores a los que aparecen las frecuencias de corte están relacionados con el diámetro del citoplasma, d_C . En la Tabla I se indican estos valores.

TABLA I

Frecuencias de corte de la parte real de la amplitud asociada a la contribución del citoplasma para $t_C = 0.999999$

<u>Frecuencias espaciales de corte</u>	<u>Diámetros</u>
$\rho \text{ (mm}^{-1}\text{)}$	$d_C \text{ (mm)}$
15.45	0.079
28.27	0.078
41.00	0.079

En la Graf. 3a pueden apreciarse dos mínimos y dos máximos en el intervalo estudiado. El mínimo más importante se produce en el origen de frecuencias.

- Cuando $t_C = 0.999$, el factor $(t_M - t_C)/(d_T - d_C)^2$ vale 10^3 mm^{-2} , se comienza a perder el carácter oscilatorio de esta contribución y la función toma valores negativos para $\rho < 43.8 \text{ mm}^{-1}$. En la Graf. 3b se muestran estos resultados.

- Cuando $t_C < 0.999$, dicho factor toma valores del orden de 10^5 mm^{-2} , con lo cual la influencia del segundo sumando es muy importante y hace que la función crezca ahora muy suavemente desde el origen, donde toma su valor mínimo, Graf. 3c.

La dependencia de la contribución del citoplasma con t_C y ϕ_M se resume en:

- Cuando t_C disminuye, la función toma valores más pequeños, Graf. 3d.
- Cuando ϕ_M aumenta, la amplitud de la oscilación se hace más negativa. Este comportamiento aparece en las Grafts. 3a, 3b y 3c, en las que se representa conjuntamente esta contribución para distintos valores de ϕ_M , en tres casos diferentes. La primera de ellas corresponde a $t_C = 0.999999$, la segunda a $t_C = 0.999$ y la tercera, a $t_C = 0.9$, y ponen de manifiesto que los fenómenos más arriba analizados son independientes de la fase asociada a la membrana.

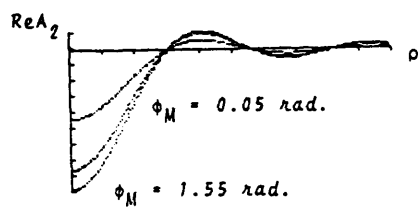
b) Análisis de la contribución de la membrana:

La parte real de la contribución de la membrana, Eq. (2.12), puede expresarse, al igual que en el caso anterior, de la siguiente forma:

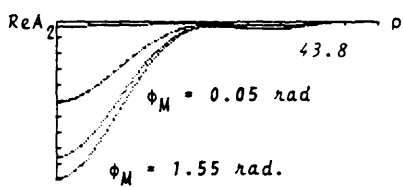
$$\text{Re } A_3(r_0) = (2\pi/\lambda f) \text{ sen } \phi_M \{M_1(r_0) + M_2(r_0) \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2}\} \quad (3.3.2)$$

donde M_1 y M_2 son funciones definidas con el mismo criterio que C_1 y C_2 en la Eq. (3.3.1).

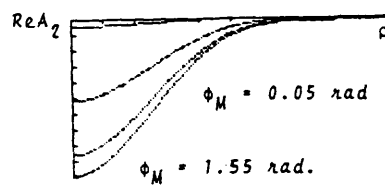
Las consideraciones hechas en el estudio de la contribución del citoplasma sobre la influencia del factor



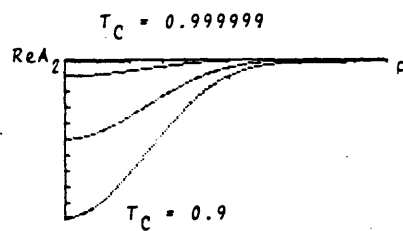
(a) $T_C = 0.999999$



(b) $T_C = 0.999$



(c) $T_C = 0.9$



(d) $\phi_M = 0.05 \text{ rad.}$

Graf. 3.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud asociada al citoplasma.

$(t_M - t_C)/(d_T - d_C)^2$ son válidas para el análisis de esta contribución, por lo que los resultados son similares:

- Para $t_C = t_M$ ($t_C = 0.999999$) el comportamiento asociado a esta función es oscilatorio. En el intervalo estudiado aparecen dos máximos y dos mínimos, produciéndose el máximo más importante, a diferencia con el citoplasma, en el origen de frecuencias. Ambas contribuciones se encuentran, pues, en oposición de fase. En la Tabla II aparecen los valores de las frecuencias espaciales de corte correspondientes a la Graf. 4c.

TABLA II

Frecuencias de corte asociadas a la parte real de la amplitud de la contribución de la membrana para $t_C = 0.999999$

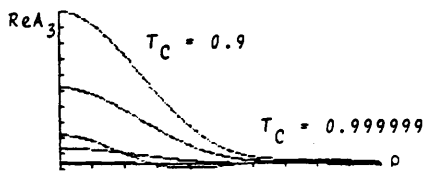
<u>Frecuencias espaciales de corte</u>	<u>Diámetros</u>
ρ (mm^{-1})	d_T (mm)
15.26	0.0799
27.91	0.0799
40.48	0.0800

- Para $t_C = 0.999$ comienza a desaparecer este comportamiento, obteniéndose que, en el intervalo de frecuencias estudiado, la función toma valores positivos siempre que $\rho < 42.59$. Por tanto, para valores de t_C que supongan un 99.9% de t_M , la amplitud de difracción asociada a esta contribución ya no es identificable con la que se obtendría para un objeto de geometría circular. Obsérvese la Graf. 4d.

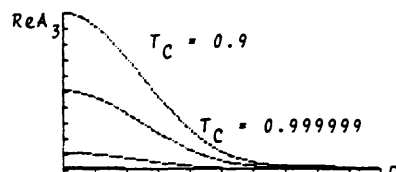
- Para $t_C < 0.999$ la función decrece desde el origen, donde toma su máximo valor, hasta anularse sin presentar valores negativos. Este resultado aparece en la Graf. 4e.

La dependencia de la parte real de la amplitud de difracción de la membrana con las variables t_C y ϕ_M se puede resumir en los siguientes aspectos:

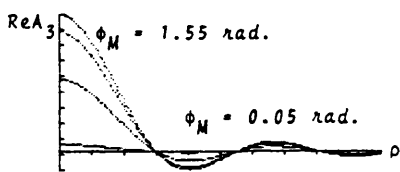
- Estando fija la fase de la membrana, ϕ_M , esta contribución aumenta cuando t_C decrece. En las Grafs. 4a y



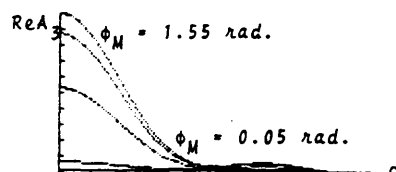
(a)
 $\phi_M = 0.05$ rad.



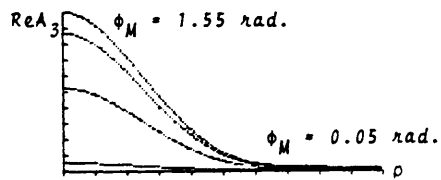
(b)
 $\phi_M = 1.55$ rad.



(c)
 $T_C = 0.999999$



(d)
 $T_C = 0.999$



(e)
 $T_C = 0.9$

Graf. 4.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud asociada a la membrana.

4b se representan conjuntamente las partes reales de la amplitud asociada a la membrana para distintos valores de t_C . La primera de ellas para $\phi_M = 0.05$ rad. y la segunda para $\phi_M = 1.55$ rad.

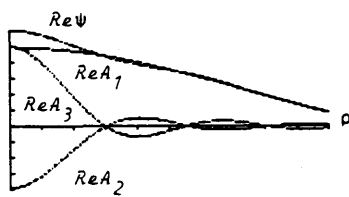
- Esta contribución aumenta con ϕ_M , estando fijo el factor de transmisión del citoplasma. Este fenómeno aparece en las Grafs. 4c, 4d y 4e, en las que se representan las contribuciones de la membrana para distintos valores de ϕ_M .

Conclusiones generales sobre las tres contribuciones:

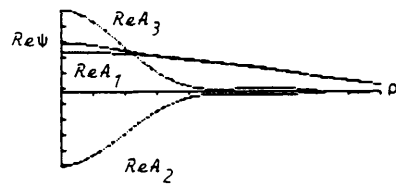
- La contribución del núcleo es la más extendida, Grafs. 5a y 5b.
- Tanto la contribución del citoplasma como la de la membrana presentan un comportamiento desigual, según los valores que tome t_C . Así, valores de t_C próximos a t_M hacen que sea importante la contribución que corresponde a la amplitud de difracción de un objeto circular, mientras que valores más pequeños de t_C , que supone en la práctica dar mayor importancia al comportamiento parabólico definido para la membrana, hacen que estas dos contribuciones se comporten como si no existiera un borde difractante.
- Como se puede apreciar en las Grafs. 5a, 5b y 5c, ambas contribuciones aparecen como si fueran simétricas respecto al eje de frecuencias, aunque los valores numéricos que toman son, en valor absoluto, ligeramente diferentes.

d) Análisis de la distribución de amplitud:

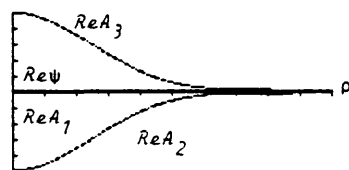
Como expresa la Eq. (2.9) la distribución de amplitud en el plano de Fourier se obtiene como suma de las amplitudes asociadas a cada parte de la célula, lo que nos permite realizar una evaluación numérica de la misma, como suma de las partes reales de cada una de las contribuciones.



(a) $T_C = 0.999999$



(b) $T_C = 0.999$



(c) $T_C = 0.9$

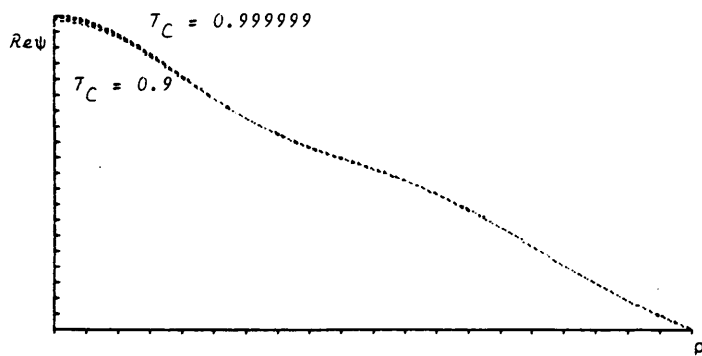
Graf. 5.- Representaciones conjuntas de las amplitudes asociadas a las diferentes contribuciones y de la amplitud total, para diversos valores de T_C : $\phi_M = 0.05$ rad. y $\phi_N = 1.55$ rad.

Por esta razón, la amplitud total de difracción, reflejará la mayor o menor influencia que tiene cada una de las regiones consideradas en la célula. Así, se puede ver que:

- Cuando $t_C = t_M$ y la fase asociada a la membrana es pequeña, la contribución del núcleo predomina sobre las otras dos, salvo en el origen, Graf. 5a. Este predominio aumenta con la fase asociada al núcleo. Como consecuencia, la distribución de amplitud responde a una función que oscila muy suavemente, decreciendo en el intervalo estudiado sin tomar ningún valor negativo, Graf. 6a.

- El hecho ya mencionado de que los valores que toman las contribuciones del citoplasma y de la membrana sean muy similares en valor absoluto, pero de distinto signo, hace que, aunque los correspondientes al núcleo sean muy pequeños frente a ellos, la amplitud total oscile solamente de manera suave (dependiendo del valor de ϕ_M) y sea positiva en todo el intervalo estudiado. Este resultado es independiente del valor de t_C , Graf. 6.

- La parte real de la amplitud total solamente se manifiesta como una función oscilante, con puntos de corte o ceros, cuando la fase del núcleo es muy pequeña ($\phi_N = 0.05$ rad.) independientemente del valor que tome el factor de transmisión asociado al citoplasma, Graf. 7a. Estas oscilaciones se hacen mayores cuando aumenta la fase asociada a la membrana (excepto cuando ϕ_N y ϕ_M valen 0.05 rad), Graf. 7c. La amplitud total, presenta, en este caso, dos máximos y dos mínimos, estando en el origen el máximo más importante. La anchura de los máximos y mínimos varía con los valores de t_C y ϕ_M de forma que, cuando t_C y ϕ_M aumentan, el máximo principal y el segundo máximo son más estrechos, mientras que los dos mínimos se ensanchan. En la Tabla III aparecen las frecuencias de corte para distintos valores de t_C y ϕ_M y se puede ver cómo en ningún caso corresponden a las frecuencias características asociadas a las dimensiones del objeto difractante, sino a dimensiones mayores.



Graf. 6.- Partes reales de la distribución de amplitud total de difracción para diferentes valores del factor de transmisión del citoplasma:
 $\phi_m = 0.05$ rad.

TABLA III

Frecuencias espaciales de corte asociadas a la parte real de la amplitud total

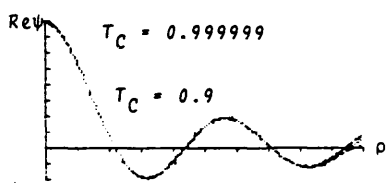
<u>Frecuencias</u>		<u>Diámetros</u>		<u>Frecuencias</u>		<u>Diámetros</u>			
$\rho(\text{mm}^{-1})$		$d(\text{mm})$		$\rho(\text{mm}^{-1})$		$d(\text{mm})$			
ϕ_M	$t_C = 0.999999$				$t_C = 0.9$				ϕ_M
0.55	12.361	0.099	12.421	0.098	0.55	12.421	0.098		
	21.901	0.102	21.721	0.103		21.721	0.103		
	36.351	0.089	36.391	0.089		36.391	0.089		
1.55	11.241	0.108	11.261	0.108	1.55	11.261	0.108		
	21.991	0.102	21.901	0.102		21.901	0.102		
	35.561	0.091	31.571	0.103		31.571	0.103		

En resumen, la parte real de la amplitud total presenta las siguientes dependencias con los parámetros:

- Para ϕ_N y ϕ_M fijos, el comportamiento de la amplitud de difracción es independiente de t_C , Graf. 7a.
- Para t_C y ϕ_M fijos, la distribución de amplitud toma valores mayores cuanto mayor es ϕ_N , haciéndose, al mismo tiempo, menos oscilante, Graf. 7b.
- Para t_C y ϕ_N fijos, se aprecia cómo al aumentar ϕ_M aumentan las oscilaciones, Grafts. 7c y 7d.

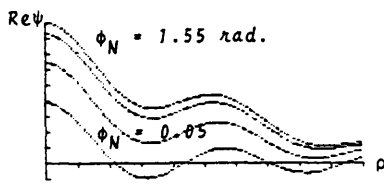
e) Análisis de la distribución de intensidad:

La distribución de intensidad ha sido evaluada como se indica al principio de este apartado. Los resultados muestran que esta distribución presenta siempre un máximo central y tres máximos secundarios. Con objeto de realizar un estudio cuantitativo de estos máximos secundarios, se ha suprimido la representación del máximo central, aumentando considerablemente la magnitud de los secundarios para, de esta forma, poder estudiar su evolución



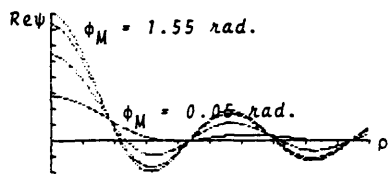
(a)

$\phi_N = 0.05 \text{ rad.}, \phi_M = 1.55 \text{ rad.}$



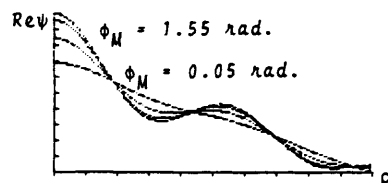
(b)

$T_C = 0.999999, \phi_M = 1.55 \text{ rad.}$



(c)

$T_C = 0.999, \phi_N = 0.05 \text{ rad.}$



(d)

$T_C = 0.999, \phi_N = 1.55 \text{ rad.}$

Graf. 7.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud total.

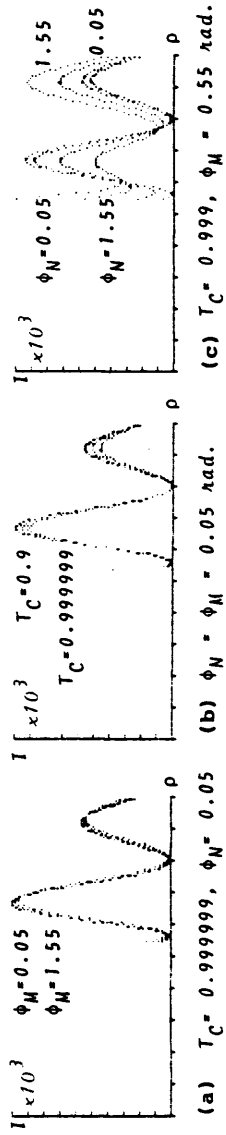
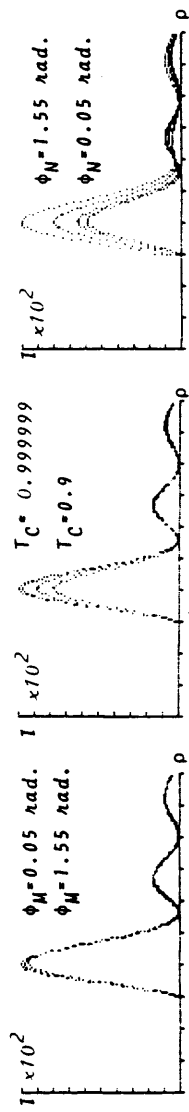
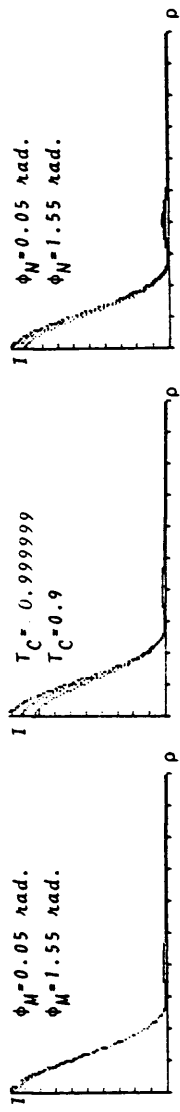
con los distintos parámetros. La dependencia que presenta la distribución de intensidad con éstos es la siguiente:

- Para ϕ_N y t_C fijos, a medida que aumenta la fase asociada a la membrana, los máximos secundarios toman valores ligeramente más pequeños, de forma que la distribución de energía, independientemente del valor de ϕ_M , es la siguiente: El primer máximo contiene el 2% de la energía, el segundo, el 0.3% y el tercero el 0.2%. En la Graf. 8a se muestra este resultado.

- Para ϕ_N y ϕ_M fijos, cuando disminuye t_C se observa que los valores que toman los máximos secundarios son más pequeños. Este es un resultado lógico ya que cuanto menor es t_C , el citoplasma de la célula (que es la parte más extensa) absorbe un mayor porcentaje de la energía incidente. El valor que toma el máximo central, por ejemplo, para $t_C = 0.9$, es el 80% del que toma para $t_C = 0.999999$. En la Graf. 8b se representan conjuntamente las distribuciones de intensidad asociadas a diferentes valores de t_C .

- Para t_C y ϕ_M fijos, se puede apreciar cómo a medida que aumenta la fase del núcleo, ϕ_N , hay una redistribución de la energía de forma que el máximo central se hace más pequeño, el primer máximo secundario aumenta, el segundo disminuye y el tercero crece, de tal suerte que para ciertos valores de los parámetros este tercer máximo secundario se hace mayor que el segundo. En la Tabla IV aparecen los valores que ponen de manifiesto este fenómeno y en la Graf. 8c se muestra su comportamiento.

Las frecuencias a las que aparecen los mínimos varían con los valores que toman los parámetros, siendo la variación más importante la debida a ϕ_N , Tabla V, modificándose las anchuras de los máximos secundarios de la siguiente manera: Cuando aumenta ϕ_N se ensancha el primero y el tercero y se estrecha el segundo.



Graf. 8.- Representaciones conjuntas de la distribución de intensidad.

TABLA IV

Valores normalizados de los máximos de la distribución de intensidad

$t_C =$	0.999999	0.999	0.9	
Max. pal.	1.	1.	1.	$\phi_M = 0.05$ rad.
1 ^{er} max.	0.3913	0.0391	0.0399	
2 ^a max.	0.0019	0.0020	0.0022	
3 ^{er} max.	0.0037	0.0038	0.0040	
Max. pal.	1.	1.	1.	$\phi_M = 1.55$ rad.
1 ^{er} max.	0.0024	0.0392	0.0394	
2 ^a max.	0.0020	0.0020	0.0023	
3 ^{er} max.	0.0037	0.0036	0.0036	

TABLA V

Variación de los valores de las frecuencias espaciales asociadas a los mínimos con ϕ_N para $t_C = 0.999999$ y $\phi_M = 0.05$ rad.

ϕ_N (rad.)	0.05	0.55	1.05	1.55
1 ^{er} min.	14.95	14.95	14.7	14.2
2 ^a min.	28.2	28.45	29.2	30.2
3 ^{er} min.	40.2	39.95	39.45	38.7

Los valores de los parámetros para los cuales se obtienen las frecuencias asociadas a las dimensiones del objeto son (recuérdese que éstas permanecen constantes en todo el cálculo):

- Para $\phi_N = 0.05$ rad. y cualquier valor que tome el factor de transmisión de t_C o la fase asociada a la membrana, los valores de las frecuencias se corresponden con el diámetro total de la célula.
- Para valores de ϕ_N mayores, las frecuencias corresponden a dimensiones mayores.

De estos dos últimos resultados se deduce una importante consecuencia, pues se pone de manifiesto que el patrón de difracción contiene información relativa a las propiedades ópticas de una célula biológica, siendo sensible a la variación de los parámetros que rigen su comportamiento como objeto de amplitud y fase difractante: t_N , t_C , t_M y ϕ_N , ϕ_C y ϕ_M . Este resultado implica la validez del método difraccional para extraer información de una célula. La calidad de la información obtenida estará, consecuentemente, relacionada con la sensibilidad del detector utilizado en el registro. Sobre este punto se volverá más adelante.

3.3.2.- Efecto debido al desplazamiento del núcleo respecto al centro de simetría.

Como se dedujo en el Capítulo 2, Sección 2.3, cuando el núcleo se encuentra desplazado con respecto al centro de simetría de la célula, aparece un factor de fase que depende del producto escalar del vector desplazamiento \vec{E} por el vector de la variable radial asociada al plano de difracción. Este factor aparece multiplicando a la amplitud de difracción asociada a la contribución del núcleo.

Las amplitudes de difracción correspondientes a las contribuciones del citoplasma y de la membrana permanecen sin modificarse, razón por la cual, en este apartado, solo serán analizadas las partes reales de la Eq. (2.15), que corresponde a la amplitud asociada a la contribución del núcleo, y de la Eq. (2.14), que corresponde a la amplitud total. Asimismo, se estudia la distribución de intensidad de difracción, Eq. (2.16).

Este estudio se ha realizado para cinco valores distintos del módulo del vector desplazamiento, que corresponden a cinco

posiciones diferentes del núcleo. Dichos valores son: 0.005 mm, 0.01 mm, 0.015 mm, 0.02 mm y 0.025 mm, el último de los cuales representa la posición en la cual el borde del núcleo coincide con el borde del citoplasma-membrana. Los resultados se comparan con los del Caso General, que corresponden a $|\bar{E}| = 0$ mm.

a) Análisis de la contribución del núcleo.

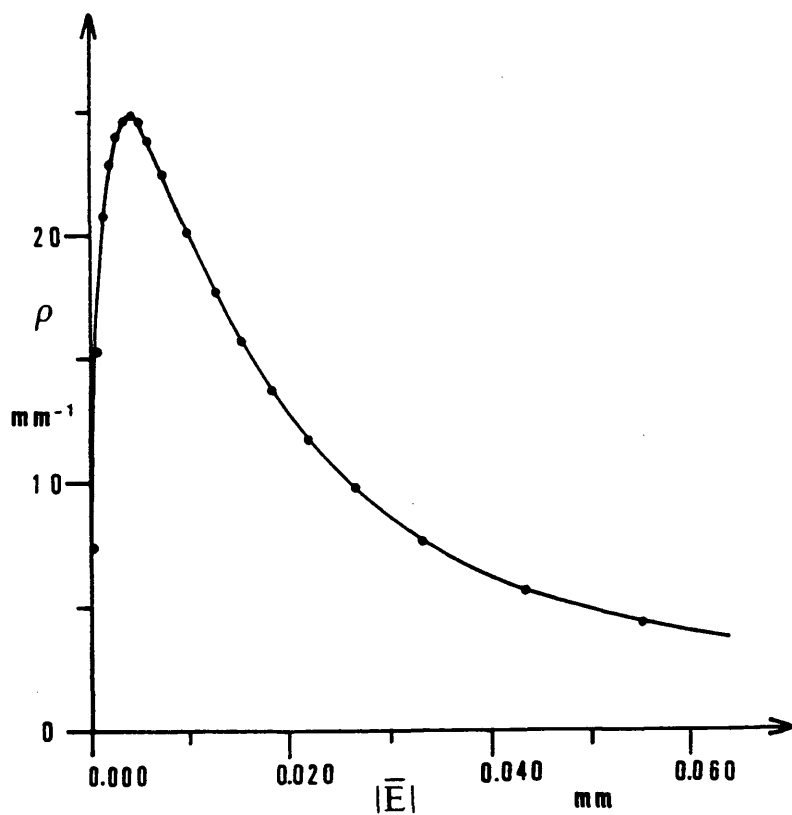
La expresión analizada es la parte real de la Eq. (2.15), es decir:

$$\text{Re } A_1'(r_0) = (2\pi/\lambda f) (t_N \text{ sen } (\phi_N - 2\pi\bar{\rho}\bar{E}) - t_C \text{ sen } (\phi_C - 2\pi\bar{\rho}\bar{E}))$$
$$\frac{d_N^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_N)}{\pi\rho d_N} = |A_1(r_0)| \cos(2\pi\bar{\rho}\bar{E} - \zeta)$$

donde $-2\pi\bar{\rho}\bar{E}$ es el factor de fase debido al desplazamiento y ζ es la fase de la amplitud asociada a la contribución del núcleo cuando no está desplazado, independiente de ρ . Las frecuencias de oscilación de las funciones sinusoidales son, en ambos casos, iguales a $|\bar{E}|$.

Cuando el núcleo se encuentra centrado, la amplitud asociada a su contribución es positiva en todo el intervalo, tomando su máximo valor en el origen. En el caso presente, y como puede observarse en la expresión de $\text{Re } A_1(r_0)$, la fase de la amplitud depende ahora de ρ y de $|\bar{E}|$ y, como consecuencia, el máximo de la función no corresponde al origen de frecuencias espaciales. En la Graf. 9 se representa $|\bar{E}|$ en función del valor de la frecuencia espacial asociada al máximo de la función. Se observa que la frecuencia a la que aparece el máximo central, primero aumenta con \bar{E} hasta que éste alcanza el valor de 0.003 mm, y después, disminuye.

En la Tabla VI se dan los valores de las frecuencias espaciales a los que aparecen los máximos, mínimos y ceros, para los distintos desplazamientos, en el intervalo comprendido entre 0 y 50 mm^{-1} . En ella se observa cómo la función se hace oscilatoria, debido al factor de fase introducido. Las frecuencias de



Graf. 9.- Frecuencia espacial del máximo de la parte real de la amplitud asociada a la contribución del núcleo en función del desplazamiento del mismo.

TABLA VI

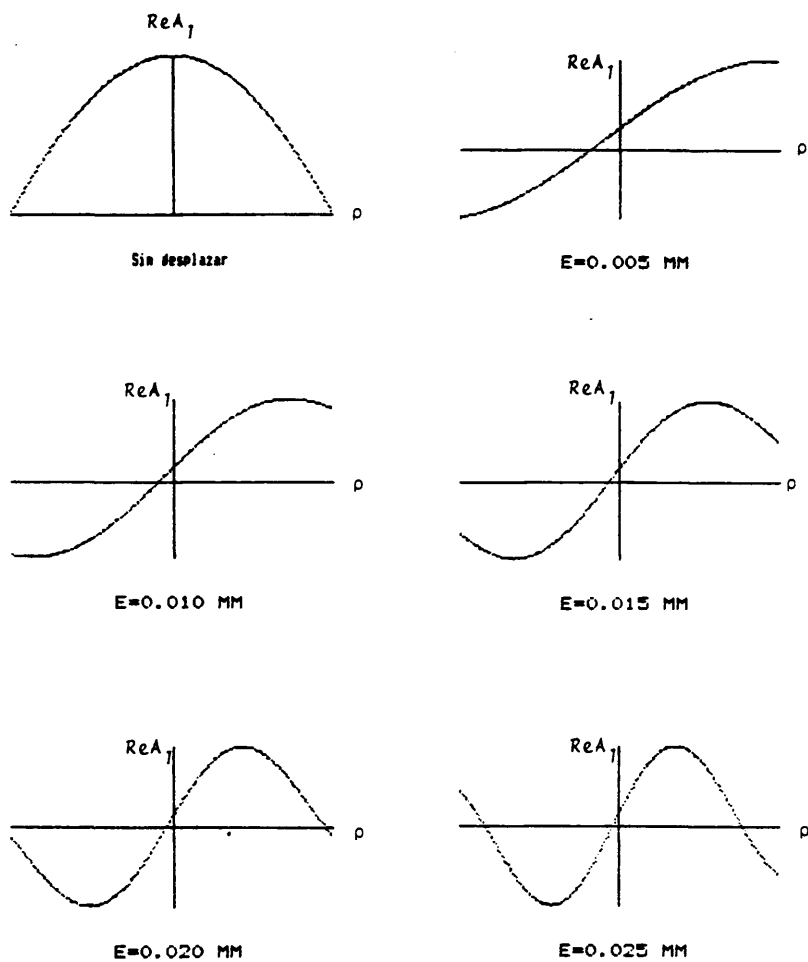
Variación de las frecuencias a las que aparecen los máximos, mínimos y ceros de la parte real de la amplitud de la contribución del núcleo para $t_c = 0.999$

Ē (mm)		ρ (mm ⁻¹)	
		$\phi_N = 0.05$ rad.	$\phi_N = 1.55$ rad.
0.00001	Max.	0.45	0.00
0.00005	Max.	2.2	0.45
0.0005	Max.	15.45	3.95
0.005	Max.	23.45	14.45
0.01	Max.	17.95	11.45
	Cero	47.7	39.2
	Min.	-	48.45
0.015	Max.	13.45	8.45
	Cero	31.7	26.2
	Min.	42.2	37.7
0.02	Max.	10.7	6.7
	Cero	23.7	19.7
	Min.	33.7	29.95
	Cero	48.7	44.7
0.025	Max.	8.7	5.45
	Cero	18.95	17.7
	Min.	27.7	24.7
	Cero	38.95	35.7
	Max.	-	43.2

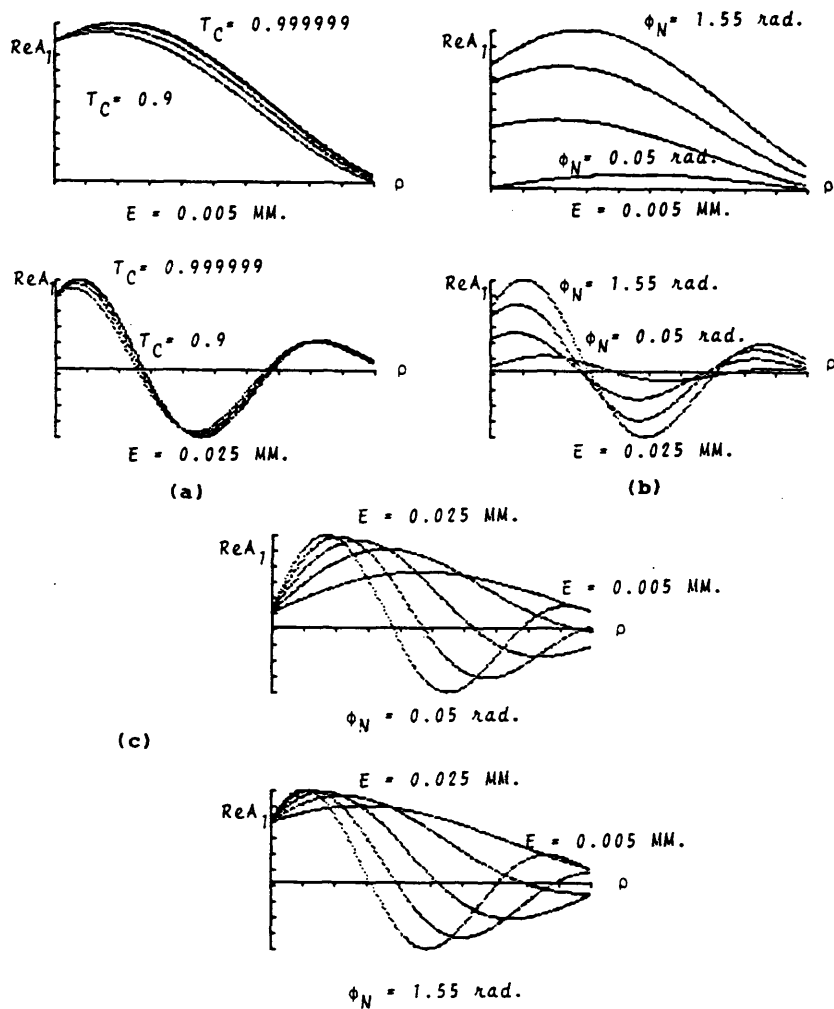
corte y los máximos y mínimos secundarios, aparecen para valores tanto menores de ρ cuanto mayor es la fase del núcleo.

Ante estos resultados parece interesante ampliar el intervalo de estudio a la región de las frecuencias negativas, con el fin de estudiar la simetría de la función con respecto al origen de frecuencias. El intervalo examinado va ahora desde -25 mm^{-1} a 25 mm^{-1} . En la Graf. 10 se han representado las partes reales de la amplitud asociada a esta contribución, para cada uno de los valores dados del desplazamiento. En todas las figuras se puede comprobar cómo la parte real de la amplitud del núcleo pierde la simetría respecto al eje de ordenadas. Estos fenómenos se producen independientemente de los valores que tengan el factor de transmisión del citoplasma, t_C , y la fase del núcleo, ϕ_N .

En la Graf. 11a se representan conjuntamente las amplitudes de la contribución del núcleo para distintos valores del parámetro t_C y dos valores fijos del desplazamiento: 0.005 mm y 0.025 mm , y en ambas se observa cómo los valores absolutos de los máximos y mínimos aumentan cuando aumenta t_C , para un valor fijo de ϕ_N . De la misma forma, fijando t_C , se observa cómo estos valores absolutos aumentan con la fase del núcleo, Graf. 11b. En la Graf. 11c se representan conjuntamente las amplitudes de la contribución del núcleo para distintos valores del desplazamiento. En ellas se muestra cómo la amplitud asociada a esta contribución aumenta en oscilación cuanto mayor es el desplazamiento, así como que el máximo principal aumenta con $|\bar{E}|$. En las Tablas VII y VIII aparecen las variaciones relativas de máximos y mínimos con la fase del núcleo y con t_C , respectivamente.



Graf. 10.- Representación de la parte real de la amplitud asociada al núcleo para distintos valores del desplazamiento E . $T_C = 0.999999$ y $\phi_N = 0.05$ rad.



Graf. 11.-Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud asociada al núcleo:

(a) $\phi_N = 0.05 \text{ rad}$; (b) $T_C = 0.999999$; (c) $T_C = 0.999999$

TABLA VII

Variación relativa de los valores de los máximos y mínimos de la parte real de la amplitud de la contribución del núcleo con ϕ_N para $|\bar{E}| = 0.015$ mm y $t_C = 0.999$

ϕ_N (rad)	0.05	0.55	1.05	1.55
Máximos	0.1507	0.4174	0.7326	1.0000
Mínimos	- 0.1166	- 0.4619	- 0.7900	- 1.0000

TABLA VIII

Variación relativa de los valores de los máximos y mínimos de la parte real de la amplitud de la contribución del núcleo con t_C para $\phi_N = 1.05$ rad. y $|\bar{E}| = 0.015$

t_C	0.999999	0.999	0.99	0.95	0.9
Máximos	1.0000	0.9993	0.9936	0.9682	0.9377
Mínimos	- 1.0000	- 1.0000	- 0.9969	- 0.9862	- 0.9739

Nota: Los valores de los máximos y mínimos están normalizados separadamente.

b) Análisis de la distribución de la amplitud total de difracción.

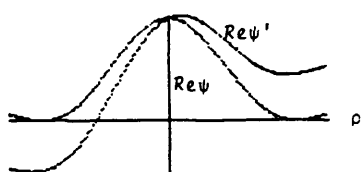
Las conclusiones obtenidas al analizar la parte real de la distribución de amplitud total cuando el núcleo está centrado ponían de manifiesto la fuerte influencia de la contribución del núcleo. Así, como consecuencia de que esta contribución no se presentaba como una función oscilatoria en el intervalo estudiado, la distribución de amplitud se comportaba como una función que oscilaba suavemente en ese mismo intervalo. Para este comportamiento había una excepción: $\phi_N = 0.05$ rad. y $\phi_M > 0.55$ rad. (Apartado 3.3.1.d).

En el caso que aquí estudiamos, la influencia de la contribución del núcleo sigue siendo muy importante sobre todo cuando ϕ_M es pequeño frente a ϕ_N . Como consecuencia, para $|\bar{E}|$ igual a 0.01 mm y 0.015 mm, valores del desplazamiento para los que la amplitud asociada al núcleo presenta una sola frecuencia de corte, la distribución de amplitud total presenta, también, una sola frecuencia de corte. Para $|\bar{E}|$ igual a 0.02 mm y 0.025 mm, la contribución del núcleo presenta dos frecuencias de corte e, igualmente, la distribución de amplitud total.

En la Tabla IX aparecen las frecuencias asociadas a máximos y mínimos y los valores de las frecuencias de corte para $|\bar{E}| = 0.005$ mm. En la misma Tabla, aparecen también los valores de las frecuencias asociados a estos puntos, para la amplitud total en el caso en que el núcleo está centrado, al objeto de poder comparar el comportamiento de ambas funciones. En esta Tabla es posible observar cómo $\text{Re } \psi'$ es tanto más oscilatoria cuanto mayor es ϕ_M y menor es ϕ_N . Este comportamiento es el mismo cualquiera que sea el valor que tome el factor de transmisión t_c .

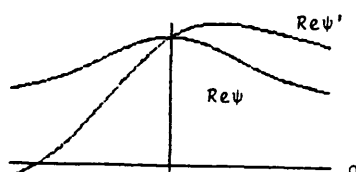
En la Graf. 12, se han representado las partes reales de la amplitud, $\text{Re } \psi'$, para el desplazamiento arriba indicado, conjuntamente con las amplitudes correspondientes al caso en que el núcleo no está desplazado, $\text{Re } \psi$, considerando los valores de los parámetros que aparecen en la Tabla IX, en el intervalo comprendido entre -25 mm^{-1} y 25 mm^{-1} . Todas ellas ponen en evidencia la pérdida de simetría de la función respecto al origen de coordenadas, así como que la amplitud asociada al caso en que el núcleo está desplazado es mayor que la asociada al núcleo sin desplazar, en la zona de frecuencias positivas, mientras que es menor en la de frecuencias negativas.

La parte real de la amplitud asociada a este desplazamiento sólo se comporta como una función muy oscilante cuando $\phi_N = 0.05$ rad. y $\phi_M > 1.05$ rad., tal y como puede observarse en la Tabla IX. En este caso, la amplitud presenta dos máximos, dos mínimos y cuatro ceros en el intervalo comprendido entre 0 y 50 mm^{-1} .



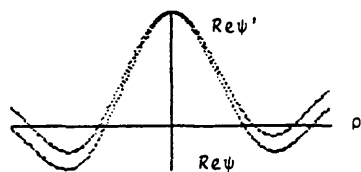
(a)

$$\phi_N = \phi_M = 0.05 \text{ rad.}$$



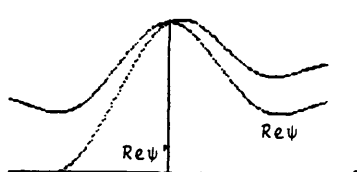
(b)

$$\phi_N = 1.55 \text{ rad; } \phi_M = 0.05 \text{ rad}$$



(c)

$$\phi_N = 0.05 \text{ rad; } \phi_M = 1.55 \text{ rad.}$$



(d)

$$\phi_N = \phi_M = 1.55 \text{ rad.}$$

Graf. 12.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud total en los casos de núcleo centrado (ψ) y núcleo desplazado (ψ'), para

$$E = 0.005 \text{ MM ; } T_C = 0.999999$$

TABLA IX

Variación de las frecuencias espaciales a las que aparecen los máximos, mínimos y ceros de la parte real de la distribución de amplitud con ϕ_N y ϕ_M para $|\bar{E}| = 0.005 \text{ mm}$ y $t_C = 0.999999$

ϕ_N	0.05 (rad.)		ϕ_M	1.55 (rad.)		
	Re ψ'	Re ψ		Re ψ'	Re ψ	
0.05 (rad.)	Max. pal.	2.20	0.00	Max. pal.	0.45	0.00
	Min.	18.45	20.45	Cero	12.70	11.20
	Max.	29.70	33.45	Min.	15.95	16.20
	Min.	-	46.20	Cero	19.20	21.95
				Max.	28.20	28.45
				Cero	38.70	35.45
				Min.	41.70	41.20
				Cero	44.95	47.20
1.55 (rad.)	Max. pal.	7.45	0.00	Max. pal.	1.95	0.00
				Min.	16.45	17.20
				Max.	25.45	26.45
				Min.	-	44.20

La Tabla IX muestra también cómo se modifican las frecuencias de corte (ceros). En consecuencia, los mínimos de la distribución de amplitud asociada al núcleo desplazado se estrechan, mientras que el máximo se ensancha. En el resto de los casos, la parte real de la distribución de amplitud oscila suavemente tomando valores positivos en el intervalo comprendido entre 0 y 50 mm^{-1} .

La frecuencia espacial a la que se desplaza el máximo principal es tanto mayor cuanto mayor es la fase del núcleo y menor es la de la membrana.

En la Tabla X se indican las frecuencias espaciales a las que aparecen los máximos, mínimos y ceros de la parte real de la distribución de amplitud para $|\bar{E}| = 0.01 \text{ mm}$. Estos resultados son totalmente equivalentes para $|\bar{E}| = 0.015 \text{ mm}$, ya que en ambos casos, la amplitud tiene un solo punto de corte. Para es-

tos dos desplazamientos la parte real de la amplitud presenta en la mayoría de los casos un máximo, un cero y un mínimo, en el intervalo comprendido entre 0 y 50 mm^{-1} . Al igual que antes, la frecuencia espacial a la que aparece el máximo principal no se corresponde con el origen sino que está desplazada. El desplazamiento de esta frecuencia espacial se rige por los mismos criterios que los señalados más arriba. En la Graf. 13 se hace una representación análoga a la de la Graf. 12.

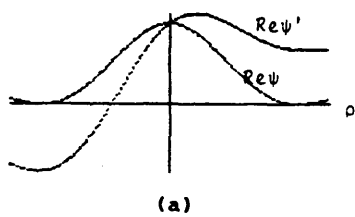
Al igual que cuando el desplazamiento es $|\bar{E}| = 0.005 \text{ mm}$ la amplitud es fuertemente oscilatoria para $\phi_N = 0.05 \text{ rad.}$ y $\phi_M > 0.55 \text{ rad.}$ Pero a diferencia del caso anterior, la excepción sólo se presenta cuando $t_C < 0.99$.

TABLA X

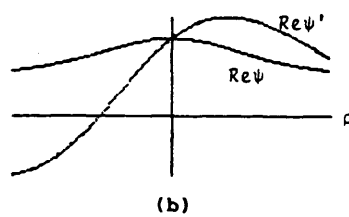
Variación de las frecuencias espaciales a las que aparecen los máximos, mínimos y ceros de la parte real de la distribución de amplitud con ϕ_N y ϕ_M para $|\bar{E}| = 0.01 \text{ mm}$ y $t_C = 0.999999$

ϕ_N	0.05 (rad.)		ϕ_M		1.55 (rad.)	
	Re ψ'	Re ψ	Re ψ'	Re ψ	Re ψ'	Re ψ
0.05 (rad.)	Max. pal.	4.2	0.00	Max. pal.	8,7	0.00
	Cero	45.45	-	Cero	39.2	11.2
	Min.		20.45	Min.	47.95	16.2
	Max.		33.45	Cero		21.95
	Min.		46.2	Max.		28.45
				Cero		35.45
1.55 (rad.)	Max. pal.	0.95	0.00	Max. pal.	3.45	0.00
	Min.	15.95		Min.	-	17.2
	Max.	27.7		Max.	-	26.45
	Cero	37.2		Cero	-	37.45
	Min.	41.95		Min.	43.95	44.2
	Cero	47.45				

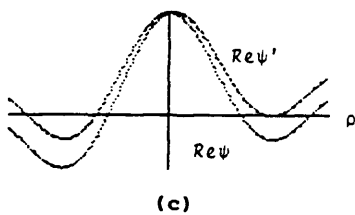
En la Tabla XI se da una relación de los máximos, mínimos y ceros para $|\bar{E}| = 0.02 \text{ mm}$. Con este desplazamiento para el núcleo, la amplitud presenta un máximo, un mínimo y dos ceros.



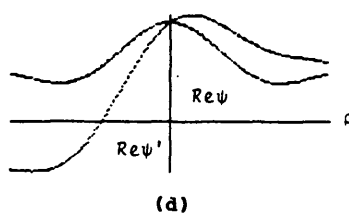
$$\phi_N = \phi_M = 0.05 \text{ rad.}$$



$$\phi_N = 1.55 \text{ rad.}; \phi_M = 0.05 \text{ rad.}$$



$$\phi_N = 0.05 \text{ rad.}; \phi_M = 1.55 \text{ rad.}$$



$$\phi_N = \phi_M = 1.55 \text{ rad.}$$

Graf. 13.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud total en los casos de núcleo centrado (ψ) y núcleo desplazado (ψ') para

$$E = 0.010 \text{ MH.}; T_C = 0.999999$$

El primer cero aparece a frecuencias mayores cuando aumenta ϕ_N y disminuye ϕ_M , mientras que el segundo, aparece a frecuencias mayores cuando aumenta ϕ_M , siendo el comportamiento con respecto a ϕ_N difícil de generalizar. La frecuencia espacial a la que se desplaza el máximo principal es menor cuando aumentan ϕ_M y ϕ_N , siempre que esta última sea menor que 1.05 rad.

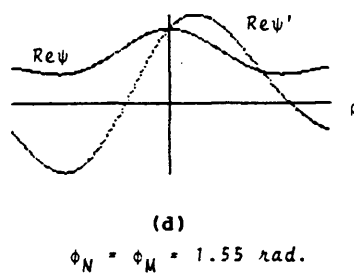
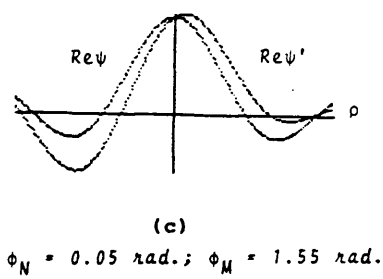
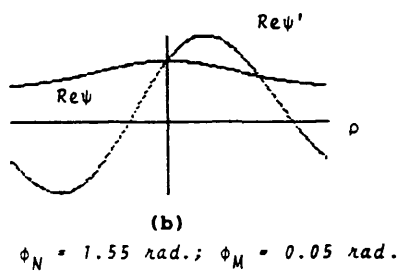
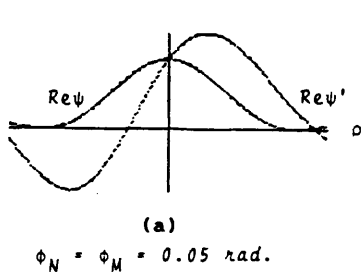
En este caso, la coincidencia de la amplitud total con la amplitud de la contribución del núcleo es muy notable. En la Graf. 14 se hace una representación análoga a las de las Graf. 12 y 13.

Como en todos los casos estudiados, la excepción se presenta para $\phi_N = 0.05$ rad. y $\phi_M > 0.55$ rad., y en este caso, para todo valor de t_C . La función presenta dos máximos, dos mínimos y tres frecuencias de corte. El máximo principal se presenta para frecuencias muy próximas al origen.

TABLA XI

Variación de las frecuencias espaciales a las que aparecen los máximos, mínimos y ceros de la parte real de la distribución de amplitud con ϕ_N y ϕ_M para $|\bar{E}| = 0.02$ mm y $t_C = 0.999999$

ϕ_N	0.05 (rad.)		ϕ_M		1.55 (rad.)	
	Re ψ'	Re ψ	Re ψ'	Re ψ	Re ψ'	Re ψ
0.05 (rad.)	Max. pal.	5.95	0.00	Max. pal.	1.7	0.00
	Cero	22.95	-	Cero	15.2	11.2
	Min.	34.7	20.45	Min.	17.95	16.2
	Cero	49.45	-	Cero	21.2	21.95
	Max.	-	33.45	Max.	26.45	28.45
	Min.	-	46.2	Cero	31.2	35.7
1.55 (rad.)	Max. pal.	5.95	0.00	Max. pal.	4.2	0.00
	Cero	19.45	-	Cero	18.7	-
	Min.	29.7	-	Min.	-	17.2
	Cero	44.7	-	Max.	-	26.4
				Min.	31.45	44.2
				Cero	45.7	-



Graf. 14.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud total en los casos de núcleo centrado (ψ) y núcleo desplazado (ψ') para

$$E = 0.020 \text{ MM.}; T_C = 0.999999$$

En la Tabla XII aparecen los valores de las frecuencias espaciales de los máximos, mínimos y ceros de la parte real de la amplitud total para $|\bar{E}| = 0.025$ mm. En este caso la amplitud presenta dos máximos, un mínimo y dos ceros, como consecuencia de la fuerte influencia de la contribución del núcleo. El máximo principal también aparece desplazado hacia frecuencias que evolucionan tal y como se indicó para $|\bar{E}| = 0.02$ mm. La frecuencia asociada al primer cero aumenta cuando aumenta ϕ_N , si esta fase es mayor que 0.55 rad., y cuando es menor, disminuye. Cuando aumenta ϕ_M toma valores menores si ϕ_M es menor que 0.55 rad.

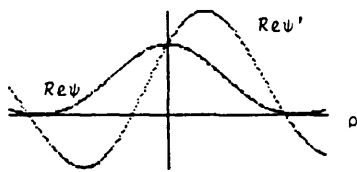
En la Graf. 15 se ha hecho una representación análoga a la de los casos anteriores.

TABLA XII

Variación de las frecuencias espaciales a las que aparecen los máximos, mínimos y ceros de la parte real de la distribución de amplitud con ϕ_N y ϕ_M para $|\bar{E}| = 0.025$ mm y $t_C = 0.999999$

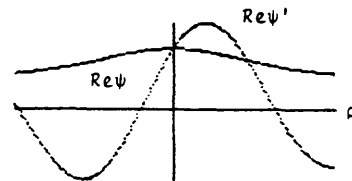
ϕ_N	0.05 (rad.)		ϕ_M	1.55 (rad.)		
	Re ψ'	Re ψ		Re ψ'	Re ψ	
0.05 (rad.)	Max. pal.	5.7	0.00	Max. pal.	4.95	0.00
	Cero	18.2	-	Cero	15.7	11.2
	Min.	26.7	20.45	Min.	24.45	16.20
	Cero	39.2	-	Cero	35.7	21.95
	Max.	46.7	33.45	Max.	42.95	28.45
	Min.		46.2	Cero		35.45
1.55 (rad.)	Max. pal.	1.95	0.00	Max. pal.	3.95	0.00
	Cero	13.95		Cero	14.95	-
	Min.	18.95		Min.	23.2	17.2
	Max.	29.2		Max.	-	26.45
	Min.	38.95		Cero	35.95	-
	Cero	45.45		Max.	44.95	44.2

La excepción en el comportamiento descrito aparece para $\phi_N = 0.05$ rad., $\phi_M > 0.05$ rad. y $t_C < 0.99$. En estos casos, la distribución de amplitud presenta dos máximos, dos mínimos y tres ceros.



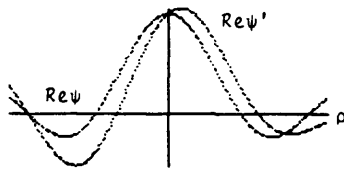
(a)

$$\phi_N = \phi_M = 0.05 \text{ rad.}$$



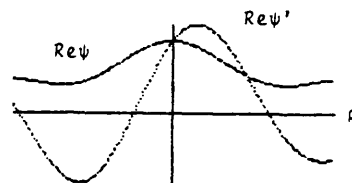
(b)

$$\phi_N = 1.55 \text{ rad.}; \phi_M = 0.05 \text{ rad.}$$



(c)

$$\phi_N = 0.05 \text{ rad.}; \phi_M = 1.55 \text{ rad.}$$



(d)

$$\phi_N = \phi_M = 1.55 \text{ rad.}$$

Graf. 15.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud total en los casos de núcleo centrado (ψ) y núcleo desplazado (ψ') para

$$E = 0.025 \text{ MM.}; T_C = 0.999999$$

c) Análisis de la distribución de intensidad total de difracción.

Los resultados obtenidos en el análisis de la distribución de intensidad se resumen en los siguientes aspectos:

- El patrón de difracción presenta en el intervalo comprendido entre 0 y 50 mm^{-1} un máximo principal y tres máximos secundarios para cualquier valor del desplazamiento. La excepción se presenta cuando éste es 0.025 mm y el valor de la fase del núcleo es 1.55 rad. , caso en que desaparece el segundo máximo secundario y, por tanto, la distribución de intensidad presenta un máximo principal y dos máximos secundarios.

En la Tabla XIII aparecen los valores normalizados de los máximos para diferentes desplazamientos y distintos valores de ϕ_N . Estos valores se mantienen aproximadamente constantes cuando varían ϕ_M y t_C . Puede apreciarse cómo, para valores elevados de ϕ_N , al aumentar el desplazamiento ($|\bar{E}| > 0.015 \text{ mm}$), el segundo máximo es mayor que el primero y que el tercero. Nótese que para fases pequeñas las variaciones del desplazamiento no afectan sensiblemente al patrón de difracción. Sin embargo, para ϕ_N grandes (1.55 rad.) aquellas variaciones dan lugar a redistribuciones de energía en dicho patrón.

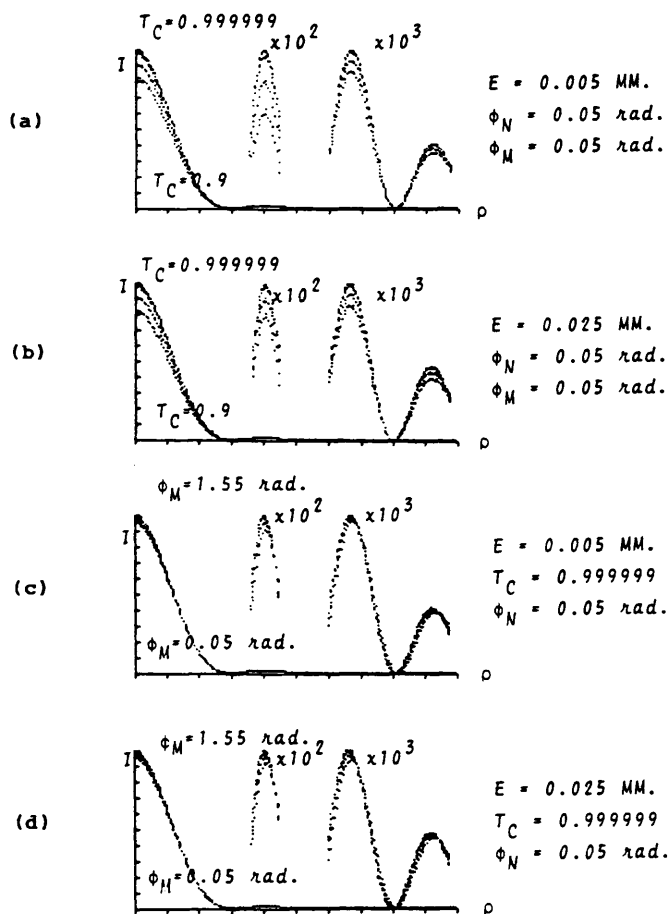
- Para valores fijos de los parámetros ϕ_N , ϕ_M y del desplazamiento $|\bar{E}|$, los valores de los máximos disminuyen cuando lo hace t_C . Estos resultados se ponen de manifiesto en las Grafs. 16a y 16b, donde se representan conjuntamente las distribuciones de intensidad para distintos valores de t_C manteniendo fijos los restantes parámetros.

- Fijados ϕ_N , t_C y $|\bar{E}|$, tanto el máximo principal como los máximos secundarios disminuyen cuando aumenta ϕ_M , aún cuando la disminución no es muy acusada. Este resultado se pone de manifiesto en las Grafs. 16c y 16d en las que se representan conjuntamente las distribuciones de intensidad asociadas a distintos valores del parámetro ϕ_M . Las frecuencias a las que aparecen los mínimos permanecen aproximadamente constantes cuando la fase de la membrana varía.

TABLA XIII

Valores normalizados de los máximos

\bar{E} (mm)		ϕ_N (rad.)	
		0.05	1.55
0.005	Max. pal.	1.000	1.000
	1 ^{er} max.	0.020	0.030
	2 ^a max.	0.004	0.008
	3 ^{er} max.	0.002	0.001
0.010	Max. pal.	1.000	1.000
	1 ^{er} max.	0.020	0.020
	2 ^a max.	0.005	0.010
	3 ^{er} max.	0.001	0.001
0.015	Max. pal.	1.000	1.000
	1 ^{er} max.	0.020	0.008
	2 ^a max.	0.005	0.010
	3 ^{er} max.	0.002	0.003
0.020	Max. pal.	1.000	1.000
	1 ^{er} max.	0.020	0.005
	2 ^a max.	0.005	0.006
	3 ^{er} max.	0.002	0.004
0.025	Max. pal.	1.000	1.000
	1 ^{er} max.	0.020	0.010
	2 ^a max.	0.004	-
	3 ^{er} max.	0.002	0.002



Graf. 16.- Representaciones conjuntas de la distribución de intensidad total de difracción.

- Por último, puede observarse en la Graf. 17 que, para valores fijos de los parámetros ϕ_M , t_C y $|\bar{E}|$:

- a) El máximo principal disminuye cuando aumenta ϕ_N .
- b) El primer máximo secundario disminuye cuando aumenta ϕ_N salvo para $|\bar{E}| = 0.005$ mm, en que para ϕ_N inferiores a 1.05 rad. aumenta y ϕ_N superiores disminuye.
- c) El segundo máximo aumenta cuando aumenta ϕ_N siempre que $|\bar{E}| < 0.02$ mm. Para desplazamientos superiores disminuye.
- d) El tercer máximo disminuye cuando aumenta ϕ_N si el desplazamiento es menor que 0.015 mm y mayor que 0.02 mm.
- e) Para desplazamientos pequeños, el primer mínimo aparece a frecuencias espaciales más bajas cuando aumenta ϕ_N y $|\bar{E}|$ es pequeño (~ 0.005 mm). Para valores superiores ocurre lo contrario.
- f) El comportamiento del segundo mínimo es el siguiente: Para valores de $|\bar{E}|$ inferiores a 0.02 mm, aparece a frecuencias más bajas cuando ϕ_N aumenta, mientras que para desplazamientos mayores, aparece a frecuencias superiores.

Comparando estos resultados con los obtenidos en el Caso General ($|\bar{E}| = 0.0$ mm), se observa que el comportamiento de la distribución de intensidad con respecto a ϕ_N es análogo cuando los desplazamientos son pequeños; pero presenta un comportamiento opuesto si los desplazamientos son grandes (Pernick, B. et al., 1978).

Comparación con el Caso General ($|\bar{E}| = 0$ mm).

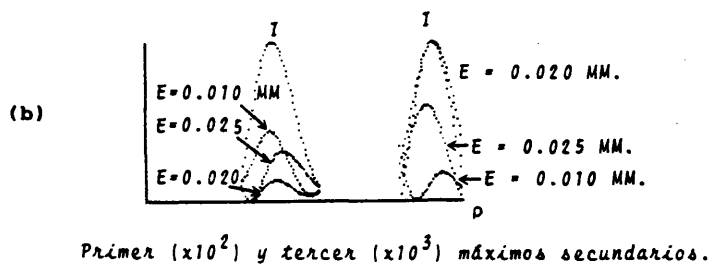
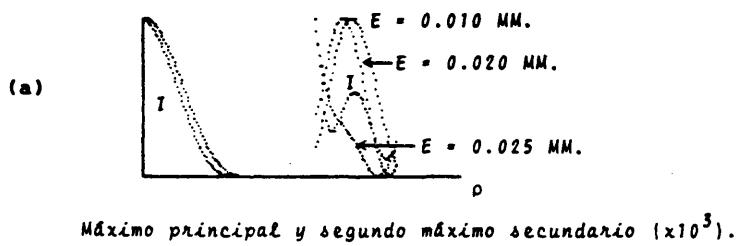
Un estudio comparativo de la distribución de intensidad asociada al caso en que el núcleo está centrado con el caso en que está desplazado, pone de manifiesto los siguientes fenómenos:

- El máximo principal y el de segundo orden, son mayores en la distribución asociada al núcleo desplazado, a excepción del caso en que $|\bar{E}| = 0.025$ mm, en el cual el segundo máximo es menor, llegando incluso a desaparecer para $\phi_N = 1.55$ rad. Esto puede apreciarse en la Graf. 18, donde se representan de forma conjunta la distribución de intensidad ligada al caso en que el núcleo no está desplazado y las distribuciones de intensidad asociadas a los desplazamientos 0.010, 0.020 y 0.025 mm, respectivamente. En la Graf. 18a, se representan el máximo principal y el segundo máximo secundario, pudiendo observarse cómo este último desaparece para $|\bar{E}| = 0.025$ mm.

- El primer y tercer máximos secundarios son menores que sus correspondientes en la distribución de intensidad asociada al núcleo centrado. En la Graf. 18b están representados el primer y tercer máximos secundarios.

- Las frecuencias espaciales asociadas al primer y tercer mínimos, se presentan siempre a valores mayores. Los desplazamientos de estas frecuencias espaciales son muy acusados cuando la fase del núcleo es grande. La frecuencia espacial asociada al segundo mínimo se presenta, en la mayoría de los casos, a valores menores.

- El máximo principal aparece desplazado en los casos siguientes: $|\bar{E}| > 0.015$ mm y $\phi_N > 0.55$ rad. Para $|\bar{E}| = 0.015$ mm, este desplazamiento se produce si $\phi_N = 1.55$ rad. Esto puede apreciarse en las Grafs. 21 y 22. En ellas se han representado conjuntamente ambas intensidades (la asociada al núcleo centrado, I, y la asociada al núcleo desplazado, I') para diferentes valores de las fases del núcleo y de la membrana en el intervalo comprendido entre -25 mm⁻¹ y 25 mm⁻¹. El máximo principal se desplaza en todos los casos a 0.45 mm⁻¹, salvo para $|\bar{E}| = 0.025$ mm y $\phi_N = 1.55$ rad, en que se presenta a 0.7 mm⁻¹.



Graf. 18.- Representaciones conjuntas de la distribución de intensidad en los casos de núcleo centrado (I) y de núcleo desplazado para diversos valores del desplazamiento E : $\phi_N = 1.55$ rad.; $\phi_M = 0.05$ rad.

- Las frecuencias espaciales a las que aparecen los máximos secundarios también sufren modificaciones, que pueden generalizarse como sigue: Para $|\bar{E}| < 0.020$ mm, las frecuencias asociadas al primer y segundo máximos son menores cuando el núcleo está desplazado, mientras que la asociada al tercer máximo es mayor. Para desplazamientos superiores o iguales a 0.020 mm, la frecuencia del primer máximo es mayor.

- En las Grafos. 19, 20, 21 y 22, puede observarse la pérdida de simetría de la figura de difracción para valores grandes de la fase del núcleo.

Como conclusión, podemos decir que la parte real de la amplitud asociada a la contribución del núcleo y la de la asociada a la amplitud total, pierden la simetría para todo valor de $|\bar{E}|$ y de ϕ_N , mientras que en la distribución de intensidad esto sólo ocurre cuando ϕ_N y $|\bar{E}|$ son grandes.

3.4.- CASO DE FASE.

3.4.1.- Núcleo centrado.

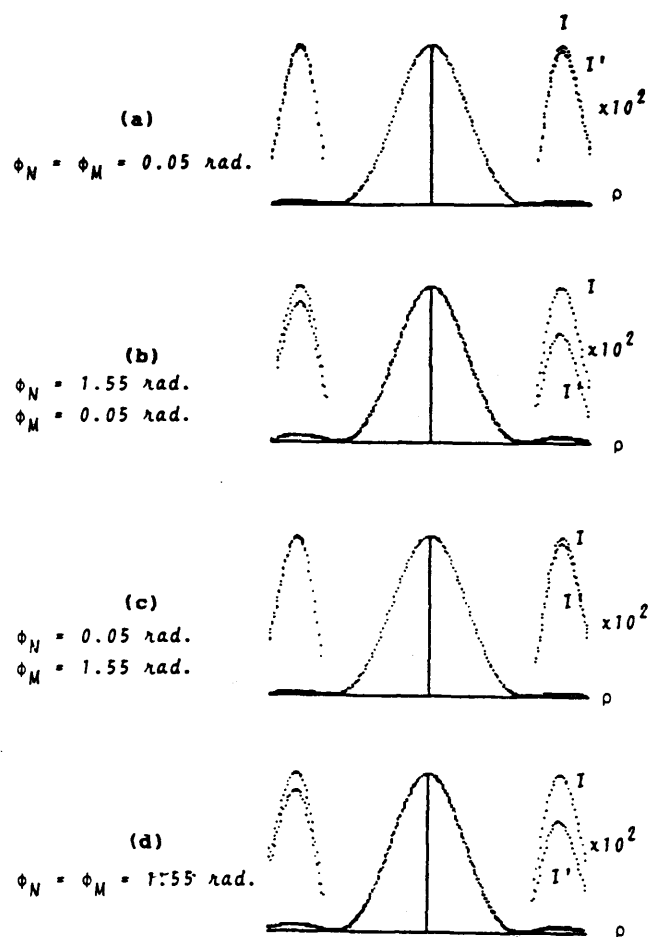
Las expresiones estudiadas en este apartado corresponden a las partes reales de las Eqs. (2.21), (2.22) y (2.23) que son, respectivamente, las amplitudes de las contribuciones del núcleo, citoplasma y membrana. Al igual que en el caso anterior, se analizan la parte real de la amplitud total, Eq. (2.20), y la distribución de intensidad en el plano de Fourier, Eq. (2.24).

a) Análisis de la parte real de la amplitud asociada a la contribución del núcleo:

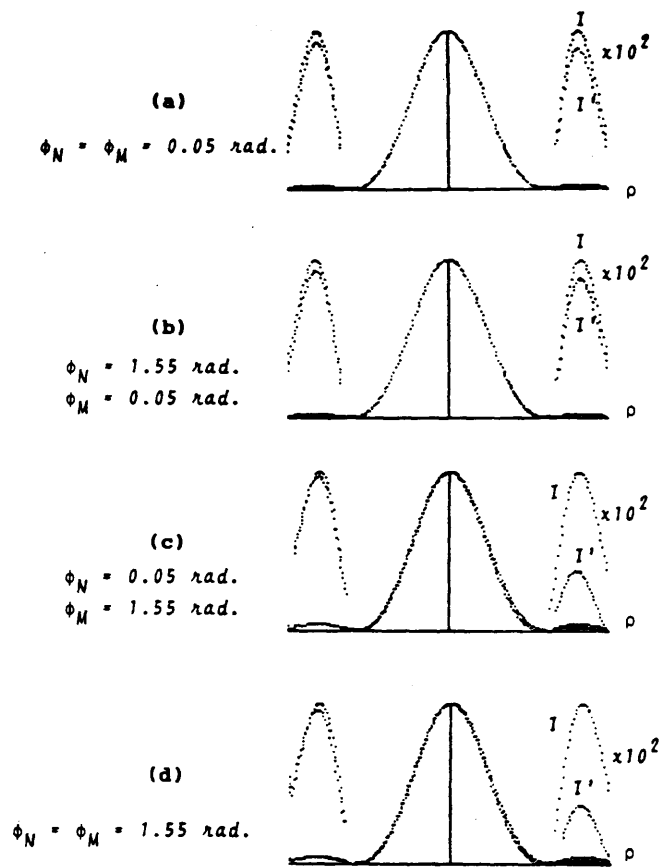
La parte real de la Eq. (2.21) se analiza considerando que la fase del citoplasma es ahora variable.

Los resultados obtenidos para ella se concretan en los siguientes puntos:

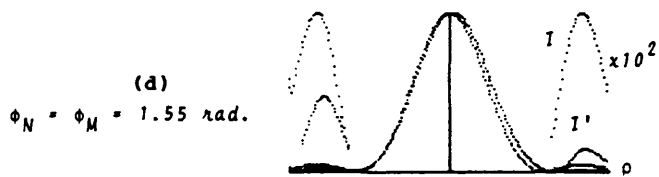
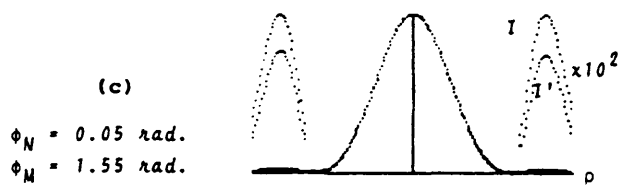
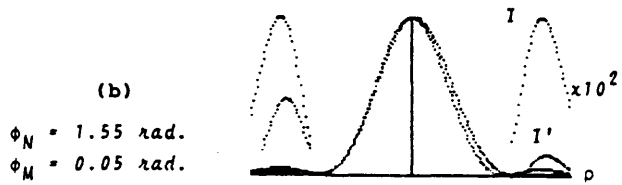
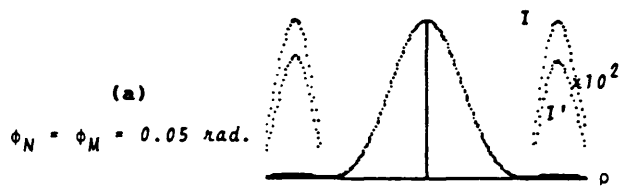
- Es nula cuando las fases del núcleo y del citoplasma son iguales.



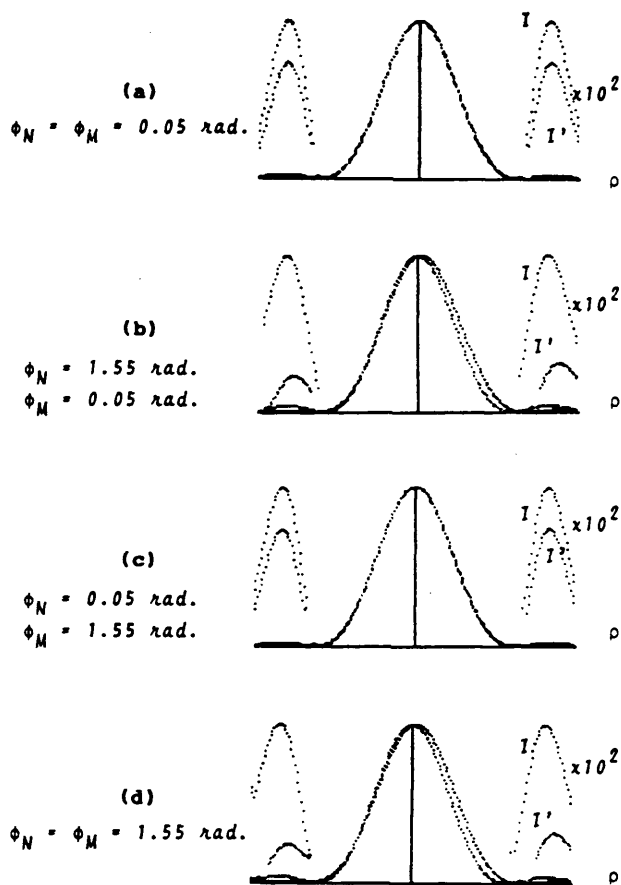
Graf. 19.- Representaciones conjuntas de la distribución de intensidad en los casos de núcleo centrado (I) y de núcleo desplazado (I') para $E = 0.005 \text{ MM.}; T_C = 0.999999$



Graf. 20.- Representaciones conjuntas de la distribución de intensidad en los casos de núcleo centrado (I) y de núcleo desplazado (I') para $E = 0.010 \text{ MM.}; T_c = 0.999999$



Graf. 21.- Representaciones conjuntas de la distribución de intensidad en los casos de núcleo centrado (I) y de núcleo desplazado (I') para
 $E = 0.020 \text{ MM.}; T_C = 0.999999$



Graf. 22.- Representaciones conjuntas de la distribución de intensidad en los casos de núcleo centrado (I) y de núcleo desplazado (I') para
 $E = 0.025 \text{ MM.}; T_C = 0.999999$

- Cuando son diferentes, se presenta como una función que no oscila en el intervalo estudiado ya que, al igual que en el caso anterior (Apartado 3.3.1.a), el primer cero aparece a 61 mm^{-1} , que se sitúa fuera de la zona analizada del espectro.

- Si la fase del núcleo es mayor que la del citoplasma, la contribución es positiva y decreciente, tomando su valor máximo en el origen. Por el contrario, si $\phi_N < \phi_C$, es negativa y creciente, presentando un mínimo en el origen.

- El intercambio entre los valores de las fases del núcleo y del citoplasma, conduce a la misma función cambiada de signo. Por tanto, la amplitud asociada a esta contribución es antisimétrica con respecto a ϕ_N y ϕ_C .

- Cuando aumenta la fase del núcleo, aumentan los valores que toma la función, como se muestra en la Graf. 23a.

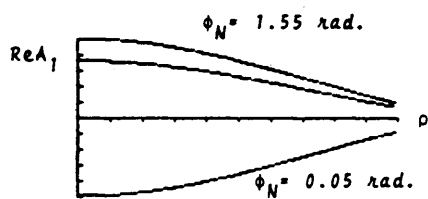
- Cuando aumenta la fase asociada al citoplasma, la función disminuye como se muestra en la Graf. 23b.

En la Tabla XIV se muestran las variaciones relativas del máximo o mínimo según varían respectivamente ϕ_N o ϕ_C .

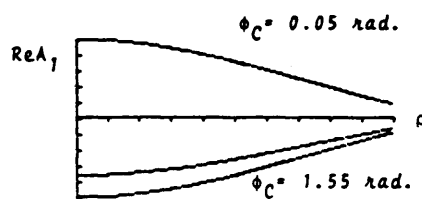
TABLA XIV

Variaciones relativas de los máximos/mínimos de la parte real de la amplitud de la contribución del núcleo

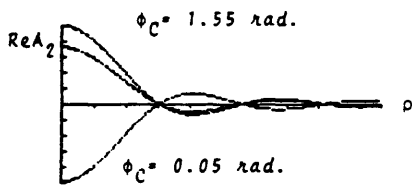
$\phi_N = 1.55 \text{ rad.} ; \phi_C =$	0.05	0.55	1.05	1.55 (rad.)
$\text{Re } A_1(\phi_C) / \text{Re } A_1(0.05) $	1.00	0.45	0.12	0.00
$\phi_C = 1.55 \text{ rad.} ; \phi_N =$	0.05	0.55	1.05	1.55 (rad.)
$\text{Re } A_1(\phi_N) / \text{Re } A_1(0.05) $	- 1.00	- 0.50	- 0.14	0.00



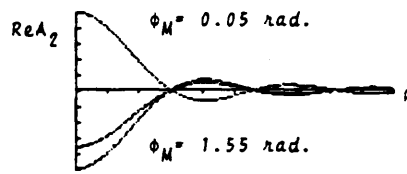
(a) Núcleo
 $\phi_C = 0.55 \text{ rad.}$



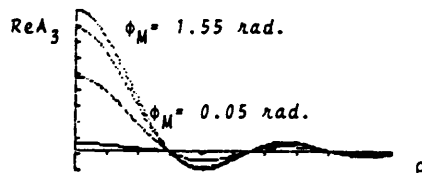
(b) Núcleo
 $\phi_N = 0.55 \text{ rad.}$



(c) Citoplasma
 $\phi_M = 0.55 \text{ rad.}$



(d) Citoplasma
 $\phi_C = 0.55 \text{ rad.}$



(e) Membrana

Graf. 23.- Variación de la parte real de la amplitud asociada a las diferentes zonas de la célula para diversos valores de las fases asociadas a las mismas.

b) Análisis de la parte real de la amplitud asociada a la contribución del citoplasma:

La expresión analizada en este caso corresponde a la parte real de la Eq. (2.22).

Los resultados obtenidos se concretan en los siguientes puntos:

- La contribución es nula cuando las fases asociadas al citoplasma y a la membrana son iguales.

- Cuando son diferentes, es una función oscilatoria en el intervalo estudiado. Las tres frecuencias de corte que aparecen se mantienen constantes cuando varían las fases de la membrana y del citoplasma. En la Tabla XV se muestran los valores de estas frecuencias, así como las dimensiones a las que están asociadas:

TABLA XV

Valores de las frecuencias de corte de la parte real de la amplitud del citoplasma

Frecuencias de corte ρ (mm^{-1})	Dimensiones (mm)
15.45	0.079
28.20	0.079
40.95	0.079

Como se puede observar las dimensiones obtenidas corresponden a la asignada al citoplasma (ver Apartado 3.2).

- Cuando la fase del citoplasma es mayor que la de la membrana, esta función presenta un máximo principal, un máximo secundario y dos mínimos. Las frecuencias a las que aparecen se mantienen constantes cuando varían las fases. Los valores absolutos de las amplitudes de los máximos y de los mínimos aumentan cuando lo hacen las fases del citoplasma y de la membrana (Graf. 23c).

- Cuando la fase de la membrana es mayor que la del citoplasma, la función presenta un mínimo en el origen, un mínimo secundario y dos máximos secundarios. Las frecuencias a las que aparecen los máximos y mínimos se mantienen constantes cuando varían las fases. Los valores absolutos de las amplitudes de los máximos y mínimos aumentan con ϕ_M y ϕ_C (Graf. 23d).

- La amplitud de esta contribución es antisimétrica respecto a los valores de las fases del citoplasma y de la membrana, es decir, cuando se intercambian dichos valores se invierte la forma de la función, convirtiéndose los máximos en mínimos y viceversa.

En la Tabla XVI se muestran los valores normalizados al valor máximo correspondiente en cada caso.

TABLA XVI

Valores normalizados de los máximos y mínimos de la parte real de la amplitud del citoplasma

$\phi_C = 0.05$ rad. $\phi_M = 0.55$ rad.		$\phi_C = 0.55$ rad. $\phi_M = 0.05$ rad.	
Min. pal.	- 1.00	Max. pal.	1.00
1 ^{er} max.	0.13	1 ^{er} min.	- 0.13
1 ^{er} min.	- 0.06	1 ^{er} max.	0.06
2 ^o max.	0.04	2 ^o min.	- 0.04

c) Análisis de la parte real de la amplitud asociada a la contribución de la membrana:

La expresión analizada en este caso es la parte real de la Eq. (2.23), que sólo depende de la fase de la membrana. Los resultados obtenidos son los siguientes:

- Es una función oscilante en el intervalo estudiado presentando un máximo principal en el origen, un máximo secundario y dos mínimos. Las frecuencias a las que aparecen éstos, así como

las frecuencias de corte, son independientes de la fase de la membrana. En la Tabla XVII se detalla una relación de las mismas.

TABLA XVII

Frecuencias de corte de la parte real de la amplitud de la membrana

ρ (mm ⁻¹)	d_T (mm)
15.20	0.080
27.95	0.080
40.45	0.080

- La parte real de la amplitud asociada a esta contribución aumenta en valor absoluto cuando lo hace la fase de la membrana (Graf. 23e).

Conclusiones sobre las tres contribuciones:

- Cuando se considera la célula como un objeto de fase puro, las tres contribuciones dependen única y exclusivamente de la función de Airy, cuyo argumento es proporcional a los diámetros de cada una de las regiones en las que se ha dividido la célula. En consecuencia, todas las funciones son oscilatorias y las frecuencias de corte están directamente relacionadas con las dimensiones de cada una de las zonas consideradas.
- Es de destacar la antisimetría que caracteriza a las contribuciones del núcleo y el citoplasma, como consecuencia de la forma analítica que presentan los respectivos factores que multiplican a la función de Airy.

d) Análisis de la parte real de la amplitud total:

Del análisis de la parte real de la amplitud total se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Cuando las fases del núcleo, citoplasma y membrana son iguales, la parte real de la amplitud total coincide con la parte real de la amplitud de la membrana.

- Cuando las fases del núcleo y del citoplasma son iguales, la parte real de la amplitud de la contribución del núcleo es nula y, por tanto, la amplitud se obtiene como suma de las contribuciones del citoplasma y de la membrana. En esta situación, la influencia del citoplasma es importante cuando ϕ_C es grande frente a ϕ_M y, por el contrario, la influencia de la contribución de la membrana es importante cuando ϕ_M es grande frente a ϕ_C .

En la Tabla XVIII aparece una relación de las frecuencias espaciales de corte asociadas a estos dos casos, que comparadas con las de las Tablas XV y XVII ponen de manifiesto cuál de las dos contribuciones es la más importante en cada caso.

TABLA XVIII

Frecuencias espaciales de corte asociadas a la parte real de la amplitud total, cuando la contribución del núcleo es nula

$\phi_C = 0.55 \text{ rad.}$ $\phi_M = 0.05 \text{ rad.}$	$\phi_C = 0.55 \text{ rad.}$ $\phi_M = 1.55 \text{ rad.}$
$\rho_1 = 15.45 \text{ mm}^{-1}$ $\rho_2 = 28.20 \text{ mm}^{-1}$ $\rho_3 = 40.95 \text{ mm}^{-1}$	$\rho_1 = 15.20 \text{ mm}^{-1}$ $\rho_2 = 20.20 \text{ mm}^{-1}$ $\rho_3 = 39.95 \text{ mm}^{-1}$

- Cuando las fases del citoplasma y de la membrana son iguales, la contribución del citoplasma es nula y, por tanto, la amplitud total se obtiene como suma de las amplitudes del núcleo y de la membrana. En este caso, la influencia del núcleo es grande cuando la fase de la membrana es pequeña frente a la fase del núcleo ($\phi_M = 0.05 \text{ rad.}$). Para valores superiores de la fase de la membrana la influencia de la amplitud asociada a la misma es mayor. Como consecuencia, en el primer caso, la parte real de la amplitud total oscila muy suavemente, mientras que en el segundo, su oscilación es muy pronunciada, presentando un máximo principal en el origen, un máximo secundario y dos mínimos. En la Tabla XIX se relacionan las frecuencias espaciales asociadas a los mismos.

TABLA XIX

Relación de las frecuencias espaciales asociadas a máximos, mínimos y ceros, cuando la contribución del citoplasma es nula

$\phi_N = 0.55 \text{ rad.}$ $\phi_M = 0.05 \text{ rad.}$	$\phi_N = 0.55 \text{ rad.}$ $\phi_M = 1.55 \text{ rad.}$
Max. pal. 0.00 mm^{-1}	Max. pal. 0.00 mm^{-1}
1 ^{er} min. 21.45 mm^{-1}	Cero 14.70 mm^{-1}
1 ^{er} max. 27.45 mm^{-1}	1 ^{er} min. 20.45 mm^{-1}
	Cero 28.95 mm^{-1}
	1 ^{er} max. 33.70 mm^{-1}
	Cero 39.45 mm^{-1}
	2 ^o min. 45.95 mm^{-1}

Además de estas tres situaciones especiales se pone de manifiesto que:

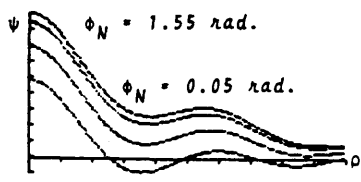
- La contribución del núcleo es importante siempre que la fase del citoplasma sea pequeña ($\phi_C = 0.05 \text{ rad.}$) frente a la fase del núcleo. En consecuencia, la parte real de la amplitud t_0 tal oscila muy suavemente tomando siempre valores positivos.

- La contribución del citoplasma es importante siempre que la fase de la membrana sea pequeña frente a la del citoplasma.

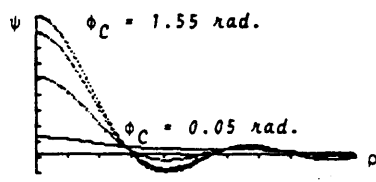
- La contribución de la membrana es importante cuando:
 $\phi_C - \phi_M = 0.05 \text{ rad.}$ y $\phi_C, \phi_M > 0.05 \text{ rad.}$

En estos dos últimos casos, la parte real de la amplitud total presenta un máximo en el origen, un máximo secundario y dos mínimos.

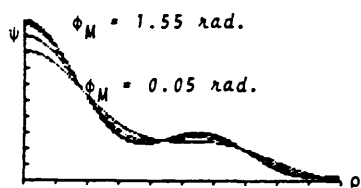
Los valores que toma la parte real de la amplitud total de difracción son mayores cuanto mayores son las fases asociadas a las tres zonas consideradas en la célula, como se pone de manifiesto en la Graf. 24. La figura 24a corresponde a la representación conjunta de las partes reales de la amplitud total para dife



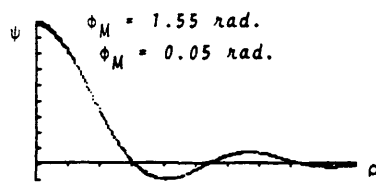
(a) $\phi_C = 0.05$; $\phi_M = 1.05$



(b) $\phi_N = 1.55$; $\phi_M = 0.55$



(c) $\phi_N = 1.55$; $\phi_C = 0.05$



(d) $\phi_N = 1.55$; $\phi_C = 1.05$

Graf. 24.- Variaciones de la parte real de la amplitud total de difracción ψ .

rentes valores de la fase del núcleo. En la figura 24b, las fases que se mantienen fijas son las del núcleo y la membrana. En las figuras 24c y 24d, cada curva corresponde a un valor diferente de la fase de la membrana. Con estas dos últimas representaciones se pone de manifiesto que la variación de la fase de la membrana sólo produce cambios importantes en la parte real de la amplitud total cuando la fase del citoplasma es pequeña.

e) Análisis de la distribución de intensidad total:

La distribución de la intensidad total de difracción presenta, al igual que en el caso precedente, un máximo principal, tres máximos secundarios y tres mínimos, en el intervalo estudiado.

Cuando las fases asociadas a cada región de la célula son iguales, la distribución de intensidad viene definida por la expresión analítica:

$$I(\rho) = (4\pi^2/\lambda^2 f^2) \left(\frac{J_1(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} \right)^2 \left(\frac{d_T^2}{4} \right)^2$$

que es independiente de las fases. Los valores de las frecuencias espaciales a los que aparece los máximos y mínimos están indicados en la Tabla XX.

TABLA XX

Valores de las frecuencias espaciales a las que aparecen los máximos y mínimos cuando las tres fases son iguales

$$(\phi_N = \phi_C = \phi_M)$$

(mm⁻¹)

Max. pal.	0.00
1 ^{er} min.	15.20
1 ^{er} max.	20.45
2 ^a min.	27.95
2 ^a max.	33.45
3 ^{er} min.	40.45
3 ^{er} max.	46.20

Estos valores de las frecuencias coinciden con los obtenidos para la parte real de la amplitud asociada a la contribución de la membrana (vease Tabla XVII).

- Cuando las fases de la membrana y del citoplasma son iguales ($\phi_M = \phi_C$), caso en que no existe contribución del citoplasma, la influencia de la contribución del núcleo sobre la figura de difracción, hace que el primer y tercer mínimos se presenten a frecuencias inferiores a las especificadas en la Tabla XX, mientras que el segundo mínimo aparece a frecuencias superiores. Esto sucede siempre que $\phi_N - \phi_M = \pm 1$ rad.

- Cuando las fases del núcleo y del citoplasma son iguales ($\phi_N = \phi_C$) y, por lo tanto, la contribución del núcleo es nula, la influencia de la contribución del citoplasma es importante cuando $\phi_C - \phi_M = \pm 1$ rad.

Es de destacar que cuando la célula se considera como un objeto de fase puro, la distribución de intensidad total asociada a la misma no está relacionada de forma biunívoca con un único trío de valores de las fases definidas para cada zona. Por el contrario, dado un trío de valores (ϕ_N, ϕ_C, ϕ_M), los tríos de fases que verifiquen que:

$$\left. \begin{aligned} \phi'_N &= \phi_N - \phi_C + \beta \\ \phi'_C &= \beta \\ \phi'_M &= \phi_M - \phi_C + \beta \end{aligned} \right\} \quad (3.4.1)$$

donde β es un parámetro que puede tomar cualquier valor real, tienen asociada la misma distribución de intensidad. Cuando las tres fases son iguales, estas expresiones se reducen a:

$$\phi'_N = \phi'_C = \phi'_M = \beta$$

de forma que, si se definiese un sistema de ejes triedro trirrectángulo, y asociásemos a cada uno de los ejes las fases del núcleo, citoplasma y membrana, respectivamente, estas últimas ecuaciones corresponderían a la diagonal principal, mientras que las (3.4.1) definirían dos rectas paralelas a la misma y equidistantes de ella, que contendrían a todos los posibles tríos de valores de las fases

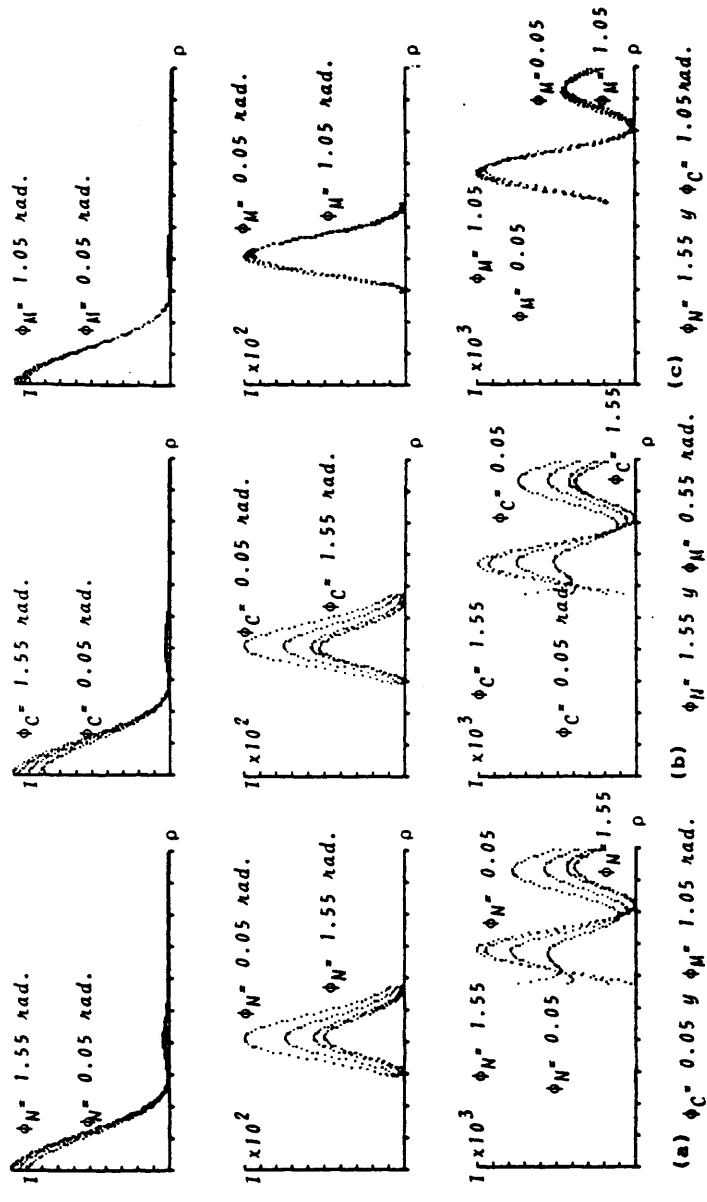
que dan lugar a una misma distribución de intensidad de difracción. Esta es simétrica con respecto al origen de coordenadas de este sistema; es decir:

$$I(\phi_N, \phi_C, \phi_M) = I(-\phi_N, -\phi_C, -\phi_M) \quad (3.4.2)$$

En la Graf. 25a se representan conjuntamente las distribuciones de intensidad total, para diferentes valores de la fase del núcleo. Como en casos anteriores, con objeto de poner de manifiesto las variaciones relativas de los máximos secundarios, se han representado éstos a una escala lo suficientemente ampliada, de forma que permita observar pequeñas variaciones de la intensidad. Los factores multiplicativos son: 100 para el primer máximo y 1000 para el segundo y tercero. Sobre ellas se puede ver cómo el máximo principal y el segundo máximo secundario aumentan con la fase del núcleo, siempre que ésta última sea menor que la fase del citoplasma; cuando es mayor, las amplitudes asociadas a estos dos máximos disminuyen. El primer y tercer máximos secundarios presentan el comportamiento contrario.

En la Graf. 25b, se hace una representación análoga a la anterior, pero ahora cada curva tiene un valor diferente de la fase del citoplasma. Sobre ella se puede ver cómo el máximo principal y el segundo máximo secundario disminuyen cuando aumenta ϕ_C , si $\phi_N < \phi_C$, mientras que el primer y tercer máximos secundarios tienen el comportamiento opuesto. Esto supone que, para la misma cantidad de energía neta contenida en el patrón de difracción, se produce una redistribución de la misma; sin embargo, la pérdida relativa de energía del máximo central de la mancha de difracción es muy pequeña.

En la Graf. 25c, cada distribución de intensidad corresponde a un valor distinto de la fase de la membrana. Puede observarse cómo el máximo principal y el segundo máximo secundario aumentan con ϕ_M , siempre que ésta sea menor o igual que la fase del citoplasma. El primer y tercer máximos secundarios presentan el comportamiento contrario. Es de destacar que las variaciones en los valores de la fase de la membrana celular no dan lugar a cambios drásticos de comportamiento en la distribución de intensidad del patrón de difracción. Nótese que las variaciones de los niveles de intensidad son mínimas.



Graf. 25.- Variaciones de la distribución de intensidad total con: (a) ϕ_N ; (b) ϕ_C ; (c) ϕ_M

3.4.2.- Efecto del desplazamiento del núcleo respecto del centro de simetría.

Al igual que en el Caso General, el desplazamiento del núcleo con respecto al centro de simetría solamente afecta a la amplitud de su contribución. Por ello, en este Apartado se estudian numericamente la parte real de la Eq. (2.26), que es la expresión analítica de dicha contribución, la amplitud total de difracción y la distribución de intensidad en el plano de Fourier.

a) Análisis de la parte real de la amplitud asociada a la contribución del núcleo:

La parte real de la amplitud de la contribución del núcleo es, en este caso:

$$\begin{aligned} \text{Re } A_1'(\rho) &= (2\pi/\lambda f) (\sin(\phi_N - 2\pi\bar{\rho}\bar{E}) - \sin(\phi_C - 2\pi\bar{\rho}\bar{E})) \frac{d_N^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_N)}{\pi\rho d_N} = \\ &= |A_1(\rho)| \cos(2\pi\bar{\rho}\bar{E} - \zeta) \quad (\rho = r_0/\lambda f) \end{aligned}$$

Como se puede observar, la dependencia con el desplazamiento es análoga a la obtenida en el Caso General. Por tanto, la interpretación de esta expresión es equivalente a la que se indica en el Apartado 3.3.2.a.

Las conclusiones a las que se llega en este estudio son las siguientes:

- El comportamiento de esta contribución con respecto a las fases del núcleo y citoplasma no varía por estar el núcleo desplazado (vease Apartado 3.4.1.a).

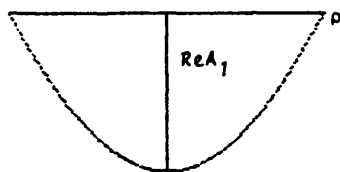
- El desplazamiento del núcleo altera la forma de la parte real de su contribución, haciendo que ésta sea ahora una función oscilatoria en el mismo intervalo. La frecuencia de la oscilación aumenta con el desplazamiento. Así, para $|\bar{E}| = 0.010$ mm y 0.015 mm, la función presenta un máximo, un mínimo y un cero. Para $|\bar{E}| = 0.020$ mm y 0.025 mm, se obtienen dos máximos, un mínimo y dos ceros.

- La parte real de la amplitud del núcleo pierde su simetría con respecto al eje de ordenadas, presentando el máximo o mínimo (según sea $\phi_N < \phi_C$ o viceversa) desplazado del origen. En la Graf. 26 se representan las partes reales de las amplitudes de la contribución del núcleo, para distintos valores del desplazamiento. Las figuras correspondientes a 26a ponen de manifiesto este fenómeno para $\phi_N < \phi_C$ y las de la 26b, para $\phi_N > \phi_C$. En todas ellas el intervalo representado es el comprendido entre -25 mm^{-1} y 25 mm^{-1} . Si comparamos estos resultados con los obtenidos en el Caso General (Graf. 10) se observa cómo ahora los desplazamientos del máximo principal son mucho menos acusados. En la Tabla XXI aparecen los valores de las frecuencias espaciales a las que se producen los máximos, mínimos y ceros, en función del desplazamiento. Al intercambiar los valores de las fases del núcleo y del citoplasma, los valores de las frecuencias que aparecen en la Tabla no varían; sin embargo, la distribución de amplitud cambia: donde había un mínimo aparece un máximo y viceversa.

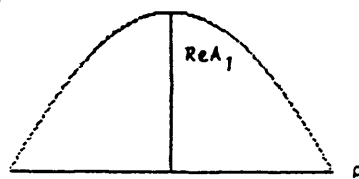
- El desplazamiento del máximo/mínimo central es tanto mayor cuanto mayores son las fases del núcleo y del citoplasma. Lo mismo ocurre para los valores de las frecuencias espaciales a las cuales aparecen los máximos, mínimos y ceros.

- El desplazamiento del mínimo central (o del máximo, en su caso) y de los valores de las frecuencias espaciales asociadas al resto de los puntos críticos, es tanto menor cuanto mayor es $|\bar{E}|$ (ver Tabla XXI).

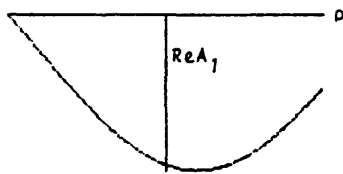
En la Graf. 27 se representan conjuntamente las partes reales de la contribución del núcleo para distintos valores del desplazamiento. En la figura 27a, ϕ_N es mayor que ϕ_C , y en la 27b, es menor. Puede observarse cómo cuanto mayor es $|\bar{E}|$, mayor es la amplitud de la oscilación.



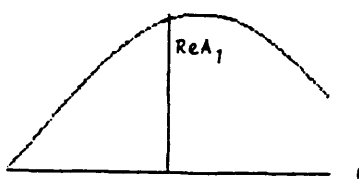
Sin desplazar



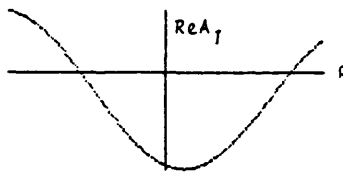
Sin desplazar



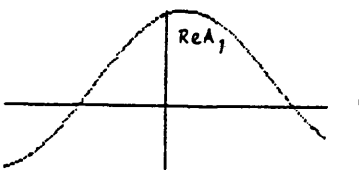
$E = 0.005 \text{ mm}$



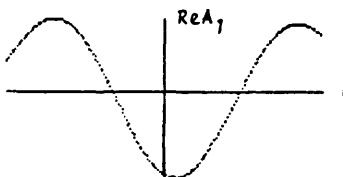
$E = 0.005 \text{ mm}$



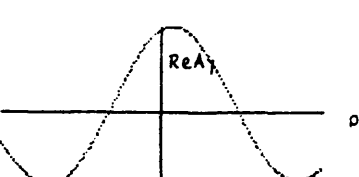
$E = 0.015 \text{ mm}$



$E = 0.015 \text{ mm}$



$E = 0.025 \text{ mm}$

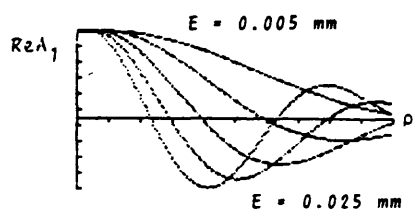


$E = 0.025 \text{ mm}$

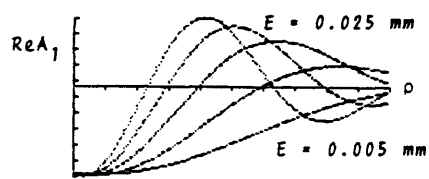
(a) $\phi_N < \phi_C$

(b) $\phi_N > \phi_C$

Graf. 26 .- Representación de la parte real de la amplitud asociada al núcleo para distintos valores del desplazamiento E.



(a)



(b)

Graf. 27.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud asociada al núcleo para distintos valores del desplazamiento E :
 (a) $\phi_N > \phi_C$; (b) $\phi_N < \phi_C$

TABLA XXI

Valores de las frecuencias espaciales asociadas a los máximos, mínimos y ceros de la amplitud de la contribución del núcleo, en función del desplazamiento, para $\phi_N = 0.05$ rad. y $\phi_C = 0.55$ rad.

$ \bar{E} $ (mm)		(mm ⁻¹)
0.0005	Min. pal.	0.00
0.005	Min. pal.	4.70
0.010	Min. pal.	3.70
	Cero	29.70
	Max.	42.20
0.015	Min. pal.	2.95
	Cero	19.95
	Max.	32.20
0.020	Min. pal.	2.20
	Cero	14.95
	Max.	25.70
	Cero	39.95
	Min.	47.45
0.025	Min. pal.	1.95
	Cero	11.95
	Max.	20.95
	Cero	31.95
	Min.	39.70

b) Análisis de la parte real de la amplitud total:

Los resultados obtenidos en el análisis de la parte real de la amplitud total cuando el núcleo permanecía centrado (Apartado 3.4.1.d), ponían de manifiesto que esta función presentaba siempre un máximo en el origen, un máximo secundario y dos mínimos. La excepción se producía cuando la fase del citoplasma era pequeña frente a la fase del núcleo ($\phi_N > \phi_C$). En este caso, esta función oscilaba suavemente sin tomar valores negativos en el intervalo estudiado, debido a la fuerte influencia de la contribución del núcleo.

Las modificaciones más importantes que sufre la parte real de la amplitud total cuando el núcleo se desplaza del centro de simetría, se producen fundamentalmente en este último caso. Así, cuando $\phi_C = 0.05$ rad. y $\phi_N > 0.05$ rad., el comportamiento de las partes reales de la amplitud total y de la contribución del núcleo son equivalentes; tanto más cuanto mayores son el módulo del desplazamiento y la fase del núcleo. En la Tabla XXII aparecen los valores de las frecuencias espaciales a los que se producen máximos, mínimos y ceros, para distintos valores de $|\bar{E}|$.

TABLA XXII

Valores de las frecuencias espaciales a las que aparecen los máximos, mínimos y ceros de la parte real de la amplitud total en función del desplazamiento, para $\phi_C = 0.05$ rad. y $\phi_N = 1.05$ rad.

$ \bar{E} $ (mm)		$\phi_M = 0.05$ rad.	$\phi_M = 1.55$ rad.
		(mm ⁻¹)	(mm ⁻¹)
0.005	Max. pal.	1.20	0.70
	Min.		18.95
	Max.		27.20
	Min.		45.45
0.010	Max. pal.	1.95	1.20
	Cero	35.20	34.95
	Min.	45.45	42.95
0.015	Max. pal.	2.20	1.45
	Cero	20.95	20.20
	Min.	35.70	38.95
0.020	Max. pal.	2.20	1.70
	Cero	16.45	15.45
	Min.	25.95	23.95
	Cero	42.20	44.45
0.025	Max. pal.	2.20	1.70
	Cero	13.95	13.20
	Min.	21.95	20.70
	Cero	32.95	32.20
	Max.	40.20	39.70

En esta Tabla se observa cómo el desplazamiento del máximo principal es mayor cuanto mayor es $|\bar{E}|$ y menor es ϕ_M . El aumento de la fase asociada al núcleo hace que los valores de las frecuencias espaciales a los que aparecen estos puntos críticos aumente.

En la Graf. 28 se representan conjuntamente las partes reales de la amplitud total en el caso en que el núcleo está centrado ($\text{Re } \psi$) y en el caso en que está desplazado ($\text{Re } \psi'$), para los valores de $|\bar{E}|$ que aparecen en la Tabla XXII. Se observa cómo la parte real de la amplitud asociada al caso en que el núcleo está desplazado, pierde su simetría con respecto al eje de ordenadas. El intervalo de representación es, en todas ellas, el que va de $- 25 \text{ mm}^{-1}$ a 25 mm^{-1} .

El comportamiento de esta función con respecto a las fases de la membrana y del núcleo es análogo al que se produce cuando el núcleo está centrado (ver Apartado 3.3.1.d).

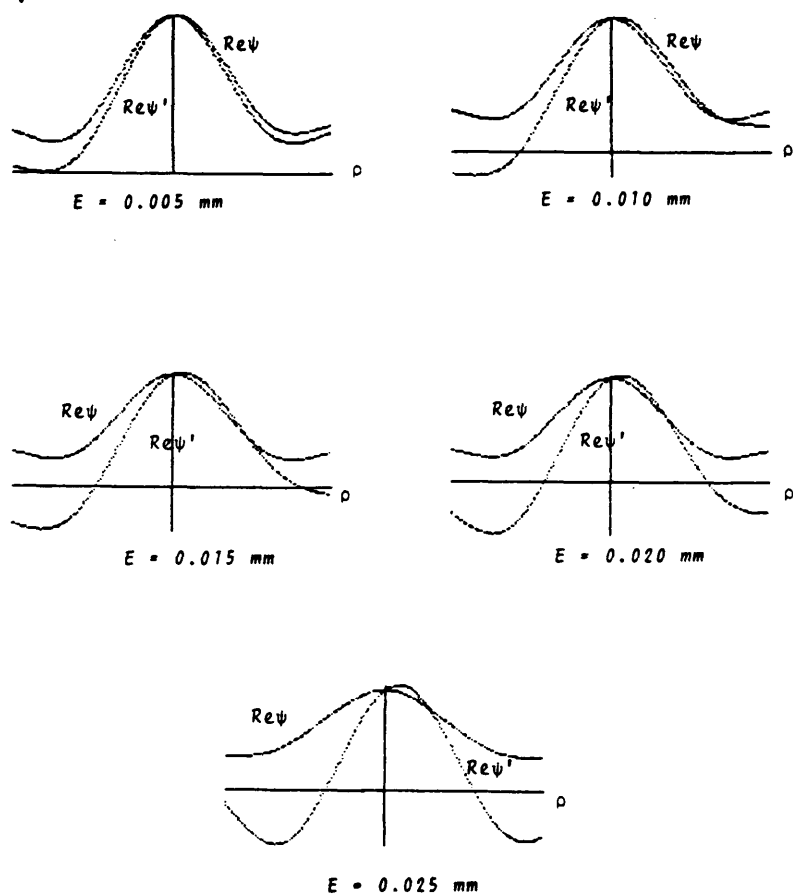
Para valores superiores de ϕ_C ($\phi_C > \phi_M$), la parte real de la amplitud total presenta siempre el máximo principal en el origen, dos mínimos secundarios y un máximo secundario, coincidiendo con el resultado obtenido cuando el núcleo no está desplazado. Las alteraciones se producen en los valores de las frecuencias espaciales a las que aparecen los máximos, mínimos y ceros.

Comparación entre $\text{Re } \psi$ y $\text{Re } \psi'$:

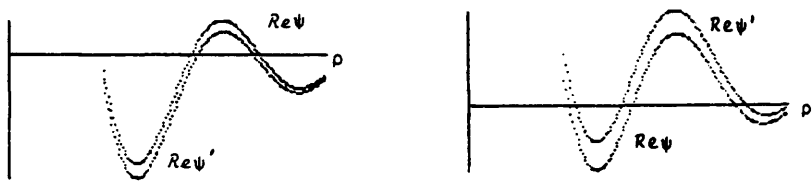
Los resultados que se obtienen comparando con la parte real de la amplitud cuando el núcleo no está desplazado, se muestran en la Graf. 29 y se pueden resumir de la siguiente manera:

i) $\phi_N < \phi_C$ (Graf. 29a):

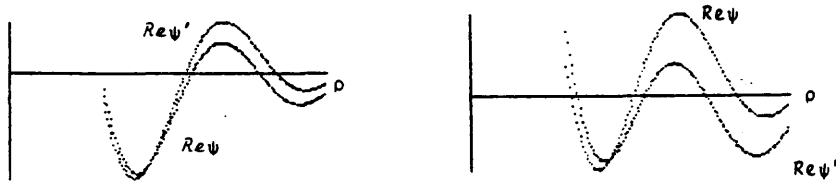
- Para $|\bar{E}| = 0.005 \text{ mm}$, el máximo principal y el máximo secundario se estrechan, mientras que el primer mínimo se ensancha. El primer y segundo mínimos se producen a frecuencias menores y el segundo máximo, a mayores. En este caso, la parte real de la amplitud total se desplaza hacia valores más negativos, con lo cual las amplitudes de los dos mínimos aumentan, mientras que la del máximo secundario disminuye.



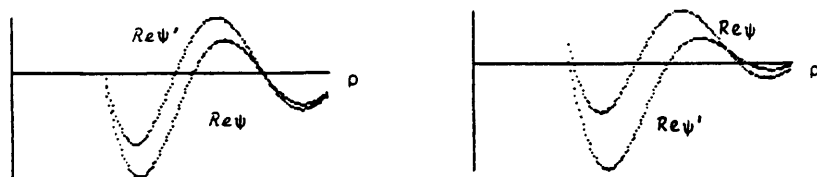
Graf. 28.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud total en los casos de núcleo centrado (ψ) y de núcleo desplazado (ψ'), para $\phi_N = 1.05 \text{ rad.}$; $\phi_C = 0.05 \text{ rad.}$ y $\phi_M = 1.55 \text{ rad.}$



$E = 0.005 \text{ mm}$



$E = 0.015 \text{ mm}$



$E = 0.025 \text{ mm}$

(a)
 $\phi_N < \phi_C$

(b)
 $\phi_N > \phi_C$

Graf. 29.- Comparación entre las partes reales de la amplitud total en los casos de núcleo desplazado ($Re\psi'$) y núcleo centrado ($Re\psi$) para $\phi_M = 1.05 \text{ rad}$:
(a) $\phi_N < \phi_C$; (b) $\phi_N > \phi_C$

- Para $|\bar{E}| = 0.010$ mm y 0.015 mm, el máximo principal se estrecha y el primer mínimo se ensancha. Las amplitudes asociadas al primer mínimo y al máximo secundario aumentan, mientras que la asociada al segundo mínimo disminuye.

- Para $|\bar{E}| = 0.020$ mm y 0.025 mm, el máximo principal y el segundo máximo se ensanchan, mientras que el primer mínimo se estrecha. Las amplitudes asociadas al primer y segundo mínimos son menores para $|\bar{E}| = 0.020$ mm. La amplitud del segundo mínimo aumenta si el desplazamiento es 0.025 mm. La amplitud del máximo secundario aumenta en los dos casos.

ii) $\phi_N > \phi_C$ (Graf. 29b):

En este caso, los resultados que se obtienen son, en líneas generales, contrarios a los indicados en el Apartado i) $\phi_N < \phi_C$.

c) Análisis de la distribución de intensidad total de difracción:

La distribución de intensidad total de difracción sigue presentando un máximo principal y tres máximos secundarios para cualquier valor de $|\bar{E}|$. Sólo hay una excepción a este comportamiento que se presenta para $|\bar{E}| = 0.025$ mm y $\phi_C = 0.05$ rad., independientemente de los valores que tomen las fases del núcleo y la membrana. Esta distribución de intensidad presenta un máximo principal y dos máximos secundarios.

El máximo principal aparece desplazado del origen para $|\bar{E}| > 0.010$ mm, $\phi_C = 0.05$ rad. y $\phi_N > 0.55$ rad. Por tanto, sobre la distribución de intensidad total el efecto del desplazamiento del núcleo es menos importante que sobre la amplitud total. El máximo principal se presenta, en este caso, a 0.45 mm^{-1} y solamente aparece a 0.70 mm^{-1} cuando $|\bar{E}| > 0.015$ mm y $\phi_N = 1.55$ rad. Para $|\bar{E}| = 0.020$ mm debe cumplirse, además, que $\phi_M > 0.55$ rad., para que haya desplazamiento del máximo principal. En la Graf. 30 se representan conjuntamente la distribución de intensidad asociada al caso en que el núcleo está centrado, I, y la asociada al caso en que está desplazado, I'. Todas las figuras muestran cómo I' presenta el máximo central desplazado y la pérdida de simetría con res-

pecto al eje de ordenadas. En la Graf. 30a el primer máximo secundario asociado a I' , en la zona de las frecuencias espaciales positivas, es menor que su correspondiente para I , mientras que en la zona de frecuencias negativas es mayor. Se observa que según aumentan el módulo del desplazamiento y la fase de la membrana, la amplitud de este máximo va disminuyendo.

Las modificaciones que sufre el patrón de difracción son difícilmente generalizables, y solamente es posible describir un comportamiento global para el primer máximo. Así, cuando $\phi_N < \phi_C$, el primer máximo secundario se estrecha y aumenta su amplitud, mientras que cuando $\phi_N > \phi_C$, se ensancha y su amplitud disminuye. Esto ocurre en general siempre que $|\bar{E}| < 0.020$ mm, como se muestra en las Grafts. 31a y 31b.

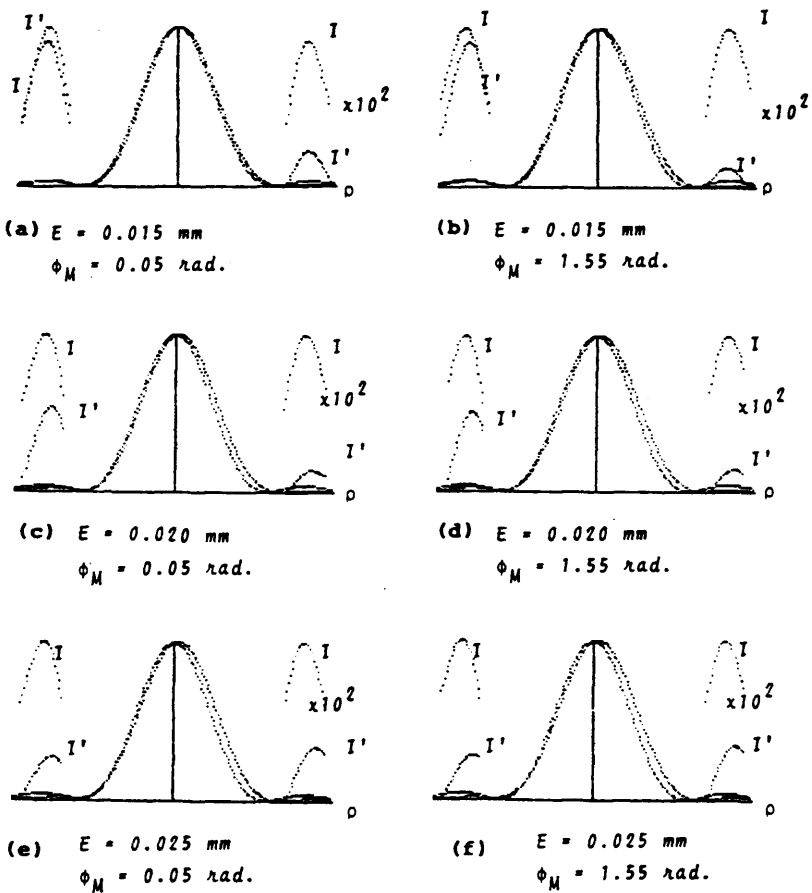
En la Tabla XXIII aparecen los valores normalizados del primer máximo para poner de manifiesto cuantitativamente las modificaciones del mismo.

TABLA XXIII

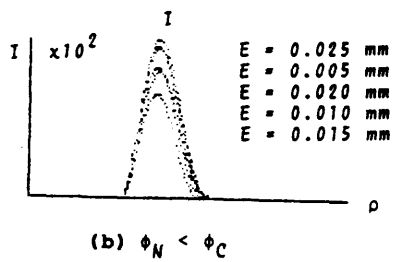
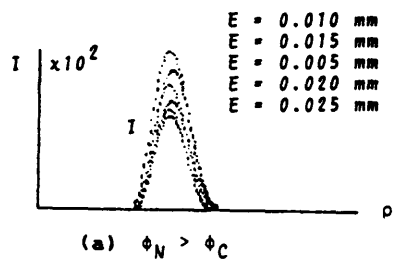
Valores relativos del primer máximo secundario de la distribución de intensidad total del caso del núcleo desplazado, I' , con respecto al caso del núcleo sin desplazar, I , para $\phi_M = 1.55$ rad.

$ \bar{E} $ (mm)	I'/I	
	$\phi_N > \phi_C$	$\phi_N < \phi_C$
0.005	0.79	1.18
0.010	0.62	1.25
0.015	0.59	1.19
0.020	0.68	1.03
0.025	0.88	0.82

En el Apartado 3.4.1.e se hizo notar que aquellos valores de las fases, ϕ_N , ϕ_C y ϕ_M , que cumplieren la Eq. (3.4.1.) daban lugar al mismo patrón de difracción. Así mismo se vió que la dis-



Graf. 30.- Representaciones conjuntas de la distribución de intensidad en los casos de núcleo centrado (I) y de núcleo desplazado (I'), para diferentes valores de E y de ϕ_M : $\phi_N = 1.55 \text{ rad.}$ y $\phi_C = 0.05 \text{ rad.}$



Graf. 31.- Representaciones conjuntas del primer máximo secundario de las distribuciones de intensidad en los casos de núcleo centrado (I) y de núcleo desplazado para diferentes valores del desplazamiento E : $\phi_M = 1.55 \text{ rad}$.

tribución de intensidad era simétrica respecto a las fases:

$$I(\phi_N, \phi_C, \phi_M) = I(-\phi_N, -\phi_C, -\phi_M)$$

Cuando el núcleo está desplazado esta última relación no se verifica. En consecuencia, los valores de las fases que dan lugar a una misma distribución de intensidad se restringen, a diferencia de lo obtenido en el Apartado 3.4.1.e, a una recta.

Sin embargo, si consideramos el módulo del desplazamiento se obtiene que:

$$I(\phi_N, \phi_C, \phi_M, |\bar{E}|) = I(-\phi_N, -\phi_C, -\phi_M, -|\bar{E}|)$$

y el conjunto de valores ϕ_N, ϕ_C, ϕ_M que da lugar a una misma distribución de intensidad estaría ahora representado por dos rectas paralelas a la diagonal principal.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos en el Caso General (Apartado 3.2.), se puede concluir que el desplazamiento del núcleo provoca alteraciones mayores en la figura de difracción cuando la fase del citoplasma es pequeña frente a la fase del núcleo. En el Caso General el estudio numérico se realizó dando a la fase del citoplasma el valor 0.01 rad., fijo en todo el cálculo. Los resultados ponían de manifiesto que cuando el desplazamiento tomaba su máximo valor se perdía el segundo máximo secundario en la distribución de intensidad. Este resultado coincide con el obtenido en este Apartado cuando ϕ_C toma el valor de 0.05 rad. De igual manera los desplazamientos del máximo central y la pérdida de simetría en la figura de difracción, son fenómenos que aparecen de forma generalizada para valores pequeños de la fase del citoplasma.

3.5.- CASO DE AMPLITUD.

3.5.1.- Núcleo centrado.

En este Apartado se han evaluado las expresiones (2.30), (2.31) y (2.32), correspondientes a las amplitudes de difracción de las tres contribuciones, la Eq. (2.29), que expresa la amplitud total de difracción, y la Eq. (2.33), que representa la distribución total de intensidad.

La función de transmisión asociada a un objeto de amplitud es real, Eq. (2.28), y, en consecuencia, la Transformada de Bessel-Fourier es también real. Por tanto, si al hacer el estudio numérico no se consideran los factores de fase asociados a la onda, las partes reales de las amplitudes de las tres contribuciones coinciden con las ecuaciones arriba indicadas. Al igual que en el Caso General (Apartado 3.2), estas expresiones dependen también de la serie de funciones de Bessel de orden impar y el número de términos que se ha tomado para realizar el estudio numérico es el mismo que se tomó en dicho caso. En este estudio el único parámetro que se ha considerado variable es el factor de transmisión asociado al citoplasma (t_C).

a) Análisis de la amplitud de difracción asociada a la contribución del núcleo:

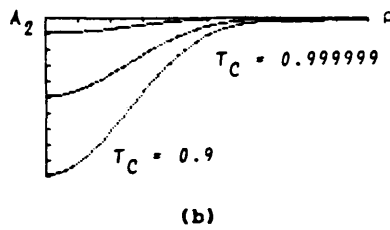
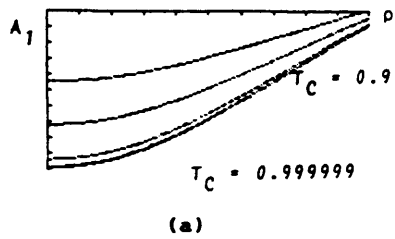
El factor que multiplica a la función de Airy en la Eq. (2.30) es ahora únicamente la diferencia entre los factores de transmisión asociados al núcleo y al citoplasma ($t_N - t_C$). Si suponemos que el núcleo es la parte de la célula que absorbe más energía, la diferencia entre estos factores es negativa y, en consecuencia, la amplitud asociada a esta contribución también lo es para cualquier valor de las frecuencias en el intervalo estudiado. Al igual que en el Caso General, la primera frecuencia de corte aparece a 61 mm^{-1} , que se sitúa fuera de la región estudiada.

Esta contribución está representada en la Graf. 32a para distintos valores de t_C . Se puede observar que se hace menos negativa cuando t_C disminuye.

b) Análisis de la amplitud de difracción asociada a la contribución del citoplasma:

Como se puso de manifiesto en el capítulo anterior (Sección 2.4.2) esta contribución no depende, en este caso, de la función de Airy. Esto hace que no presente nunca un comportamiento oscilatorio y aparezca siempre como una función creciente desde el origen, donde toma su valor mínimo.

Este comportamiento puede apreciarse en la Graf. 32b,



Graf. 32.- Representaciones conjuntas de las amplitudes asociadas a:
 (a) Núcleo ; (b) Citoplasma

donde se ha representado la amplitud de esta contribución para diferentes valores de t_C . En este caso, la contribución se hace más negativa cuanto menor es t_C .

c) Análisis de la amplitud de difracción asociada a la contribución de la membrana:

La expresión analítica de esta contribución, Eq. (2.32), puede escribirse en forma resumida como:

$$A_3(\rho) = M_1(\rho) + M_2(\rho) \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} \quad \left| \quad \rho = r_0 / \lambda f \right.$$

donde $M_1(\rho)$ y $M_2(\rho)$ son funciones que sólo dependen de la variable radial en el plano de Fourier y están definidas con igual criterio que el expresado en el Apartado 3.3.1.c.

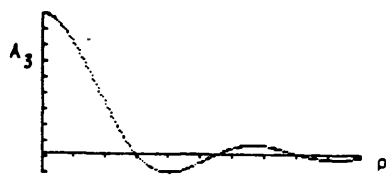
Esta contribución se comporta de la siguiente manera:

- Para $t_C = t_M$ ($t_C = 0.999999$), la amplitud asociada a la membrana equivale a la que se obtendría para una abertura circular, como consecuencia de que el primer sumando (función de Airy) prevalece en todo el intervalo de frecuencias espaciales estudiado. En la Graf. 33a está representada esta contribución para este caso particular. En ella puede observarse cómo la función toma su valor máximo en el origen, presentando un máximo secundario y dos mínimos. En la Tabla XXIV aparecen las frecuencias de corte y las dimensiones a ellas asociadas.

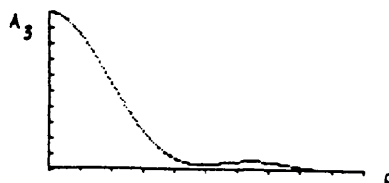
TABLA XXIV

Frecuencias de corte de la amplitud asociada a la contribución de la membrana, para $t_C = 0.999999$

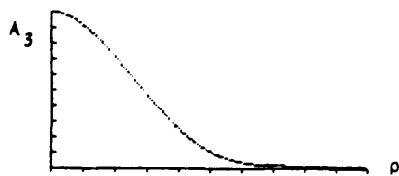
Frecuencias de corte (mm ⁻¹)	Diámetros (mm)
15.26	0.0799
27.91	0.0799
40.48	0.0800



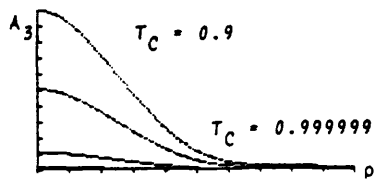
(a) $T_C = 0.999999$



(b) $T_C = 0.999$



(c) $T_C < 0.999$



(d) Representación conjunta

Graf. 33.- Representaciones de la parte real de la amplitud asociada a la contribución de la membrana.

- Para $t_C = 0.999$ comienza a perderse el comportamiento característico de una función de Airy. En la Graf. 33b puede verse que la función es positiva para todo valor de $\rho < 42.59 \text{ mm}^{-1}$, para el que se produce el primer punto de corte. La causa de este comportamiento es la que ya ha sido descrita en el Apartado 3.2.1.c.

- Para $t_C < 0.999$, el segundo sumando de la expresión in dicada más arriba, que es el que contiene la información asociada al comportamiento parabólico de la membrana, prevalece en la zona del espectro estudiada. Bajo estas condiciones la función es decreu ciente desde el origen, donde toma su valor máximo (Graf. 33c).

En la Graf. 33d se representan conjuntamente las amplitudes asociadas a esta contribución, para distintos valores de t_C . En ella puede apreciarse que la contribución toma valores mayores cuando t_C disminuye.

Conclusiones generales sobre las tres contribuciones:

- La amplitud del núcleo es la más extendida.
- Para valores de $t_C < 0.999$, las contribuciones del citoplasma y de la membrana aparecen como si fueran simétricas con respecto al eje de frecuencias espaciales, pero sus valores numéricos no son exactamente iguales.

La comparación de los resultados obtenidos en este caso con los hallados en el Caso General pone de manifiesto los efectos asociados a las fases de cada parte de la célula: Así, se puede comprobar que la fase del núcleo, ϕ_N , es la responsable de que, siendo en ambos casos $t_C > t_N$, la contribución del núcleo sea positiva en el Caso General y negativa en este caso. Las fases asociadas al citoplasma y a la membrana son responsables del comportamiento oscilatorio o no oscilatorio de la contribución del citoplasma. En el Caso General, la diferencia entre las fases actúa como borde difractante, mientras que en este caso, al no existir discontinuidad en los factores de transmisión, el citoplasma pierde sus características de abertura circular.

d) Análisis de la amplitud total de difracción:

Los resultados de analizar la Eq. (2.29) se resumen como sigue:

- Para $t_C = t_M$, la contribución de la membrana prevalece sobre todo el intervalo estudiado (Graf. 34a) y, por tanto, la amplitud total de difracción coincide casi exactamente con esta contribución. La influencia de las otras dos contribuciones hace que los valores de la amplitud de los máximos sean mayores y los de la de los mínimos menores. La amplitud total de difracción está representada en este caso en la figura 34a.

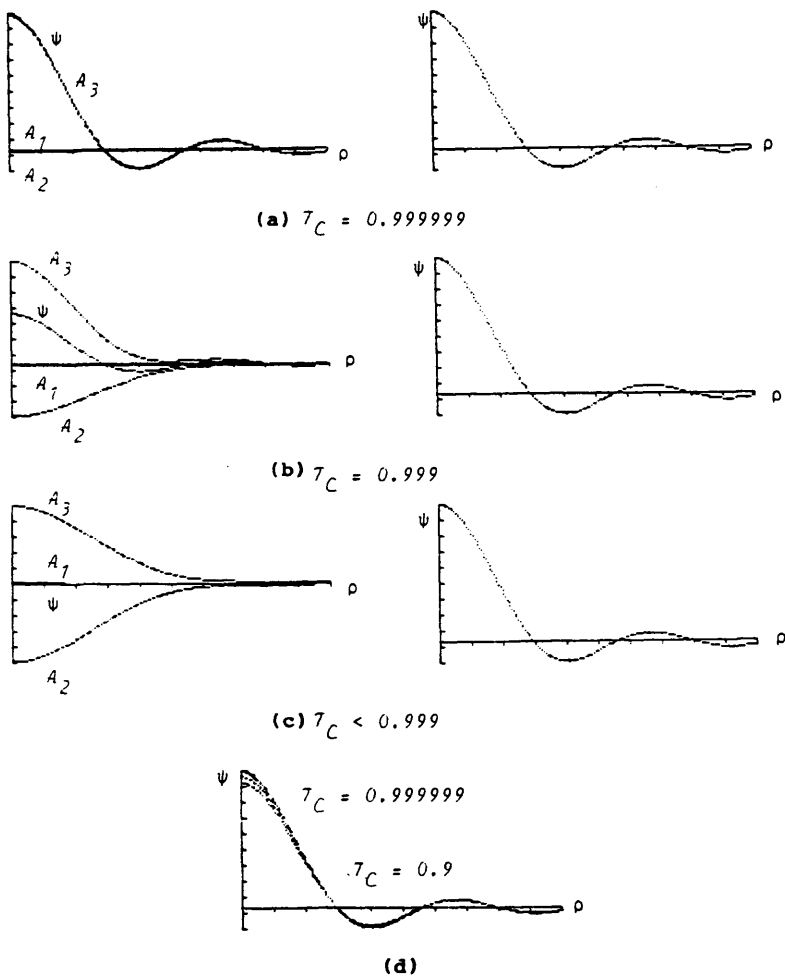
En la Tabla XXV aparecen los valores de las frecuencias de corte y las dimensiones con las que están relacionadas, que son muy próximas al diámetro total.

TABLA XXV

Frecuencias de corte de la distribución de amplitud total para $t_C = 0.999999$

Frecuencias espaciales (mm^{-1})	Diámetros (mm)
15.04	0.0811
28.31	0.0788
40.09	0.0808

- Para $t_C = 0.999$, la contribución de la membrana sigue siendo la más importante, pero la del citoplasma es, en relación con lo descrito en el párrafo anterior, apreciablemente mayor (ver Graf. 34b). Por ello, la amplitud total ya no coincide con $A_3(r_0)$, aunque sigue presentándose como una función oscilatoria. Los valores de las frecuencias espaciales correspondientes a los máximos, mínimos y ceros coinciden con los obtenidos en el caso anterior (Tabla XXV).



Graf. 34.- Representación conjunta de las amplitudes correspondientes a las diferentes contribuciones y de la amplitud total de difracción, para distintos valores del factor de transmisión del citoplasma.

- Para $t_c < 0.999$ se tiene que $A_2(r_0) = A_3(r_0)$ y ambas, mucho mayores que la contribución del núcleo, $A_1(r_0)$, Graf. 34c. No obstante la amplitud total de difracción sigue siendo una función oscilatoria, como puede observarse en dicha figura, presentando dos máximos y dos mínimos en el intervalo estudiado. El valor máximo lo toma en el origen. En la Tabla XXVI se presenta una relación de las frecuencias de corte y de las dimensiones a ellas asociadas, para diferentes valores de t_c .

TABLA XXVI

Frecuencias de corte de la distribución de amplitud para valores del factor de transmisión $t_c < 0.999$

t_c	Frecuencias de corte (mm^{-1})	Diámetros (mm)
0.99	15.05	0.0811
	28.29	0.0788
	40.10	0.0808
0.95	15.08	0.0809
	28.22	0.0790
	40.16	0.0807
0.90	15.13	0.0806
	28.12	0.0793
	40.23	0.0805

En esta Tabla se observa cómo los valores de las frecuencias asociadas al segundo cero contienen información sobre el diámetro del citoplasma, mientras que las restantes están relacionadas con diámetros superiores al total de la célula. También puede observarse cómo la disminución del factor de transmisión provoca desplazamientos de las frecuencias que hacen que el máximo central sea más ancho, el primer mínimo más estrecho y el último máximo más ancho.

En la Graf. 34d se representan conjuntamente las amplitudes totales de difracción para diferentes valores de t_c , mostrando cómo esta función decrece con t_c . Así, el valor que toma

la amplitud en el origen para $t_C = 0.9$ es aproximadamente un 90% del que toma para $t_C = 0.999999$.

Por tanto, cuando la célula se considera como un objeto de amplitud (función de transmisión real), la amplitud total de difracción es siempre una función oscilatoria. En este sentido, comparando con los resultados obtenidos en el Caso General, la influencia de las fases puede concretarse de la siguiente manera:

- La fase del núcleo provoca desplazamientos de la amplitud total de difracción hacia valores mayores, lo que conlleva que esta función pierda el comportamiento oscilatorio característico de objetos que presentan simetría circular.

- Al mismo tiempo, la influencia de las fases asociadas al núcleo y al citoplasma hace que la dependencia de la amplitud total con t_C sea mucho menos importante. En la Tabla XXVII se comparan los valores que toma la amplitud en el origen en función de t_C . En la columna primera aparecen los asociados al Caso General, y en la segunda, los relacionados con el caso que se está analizando, cada una de ellos normalizados al valor máximo correspondiente.

TABLA XXVII

Comparación entre los valores normalizados de los máximos de la parte real de la amplitud en el Caso General y de los de la amplitud en el Caso de Amplitud

t_C	Caso General	Caso de Amplitud
	$\phi_N = \phi_M = 1.55 \text{ rad.}$	
	$\phi_C = 0.01 \text{ rad.}$	
0.999999	0.9913	1.0000
0.999	0.9913	0.9868
0.99	0.9922	0.9793
0.95	0.9956	0.9417
0.9	1.0000	0.8985

- Tambien es notable la influencia de las fases sobre los valores de las frecuencias de corte. En el Caso General se obtienen valores de frecuencias espaciales que se corresponden en todos los casos con dimensiones mayores a las asociadas al objeto (ver Tabla III).

e) Análisis de la distribución de intensidad de difracción:

La distribución de intensidad presenta, en este caso, un máximo central y tres máximos secundarios. Para cualquier valor de t_C los valores de estos máximos normalizados son:

- Primer máximo secundario: 0.021 (2.1%)
- Segundo máximo secundario: 0.0034 (0.34%)
- Tercer máximo secundario: 0.002 (0.2%)

En la Tabla XXVIII se da la relación de frecuencias a las que se producen los máximos y mínimos.

TABLA XXVIII

Frecuencias asociadas a los máximos secundarios y a los mínimos, para distintos valores del factor de transmisión t_C

	$t_C = 0.999999$		$t_C = 0.9$	
	$\rho(\text{mm}^{-1})$	$d(\text{mm})$	$\rho(\text{mm}^{-1})$	$d(\text{mm})$
1 ^{er} min.	15.04	0.0811	15.13	0.0806
1 ^{er} max.	20.41	0.0803	20.41	0.0803
2 ^a min.	28.31	0.0788	28.12	0.0793
2 ^a max.	33.53	0.0802	33.53	0.0802
3 ^{er} min.	40.10	0.0808	40.23	0.0805
3 ^{er} max.	46.21	0.0805	46.21	0.0805

Para valores de t_C comprendidos entre 0.999999 y 0.99, las frecuencias a las que aparecen los mínimos y máximos secundarios no varían.

Atendiendo a los valores que aparecen en la Tabla XXVIII, se deduce que las frecuencias relacionadas con los máximos son in-

dependientes de t_c , mientras que las relacionadas con los mínimos varían con este parámetro de la siguiente manera: Las correspondientes al primer y tercer mínimos, aumentan ligeramente cuando disminuye t_c , en tanto que la del segundo mínimo, disminuye. En consecuencia, cuando t_c disminuye, el máximo central se hace más ancho, el primer máximo secundario, más estrecho y el segundo, más ancho.

Las dimensiones relacionadas con estas frecuencias oscilan entre el diámetro del citoplasma y el total.

En la Graf. 35 se representan conjuntamente las distribuciones de intensidad asociadas a distintos valores de t_c . La distribución que toma valores mayores en el origen corresponde a la de $t_c = 0.999999$.

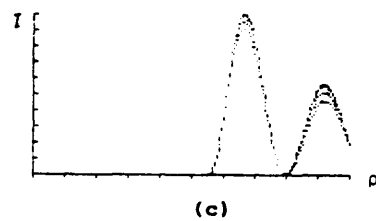
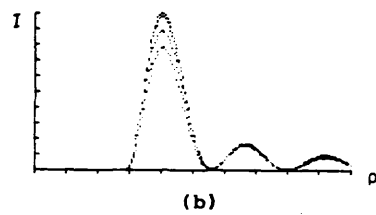
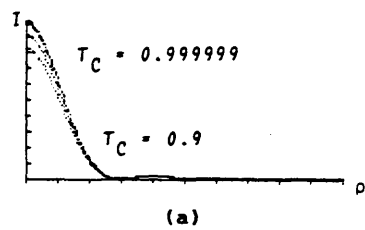
Resumiendo, en el patrón de difracción que se obtiene cuando no se consideran las fases asociadas a las distintas partes de la célula, las frecuencias a las que aparecen los mínimos están más ajustadas a las dimensiones de las distintas partes de la misma. La influencia de la fase del núcleo sobre el patrón de difracción se concreta en dos aspectos: Desplazar las frecuencias de los mínimos hacia valores que tienen asociados diámetros mayores que los que corresponden al objeto y redistribuir la energía en los máximos.

3.5.2.- Efecto del desplazamiento del núcleo con respecto al centro de simetría.

Al igual que en casos anteriores (Apartado 3.3.2), la única contribución a la amplitud total que se ve afectada por el desplazamiento del núcleo es la asociada a éste y, por tanto, es la que analizamos. Hay que destacar que el término de fase que introduce el desplazamiento hace, en este caso, que la Transformada de Bessel-Fourier asociada a la función de transmisión sea compleja.

a) Análisis de la parte real de la amplitud asociada a la contribución del núcleo:

Se ha evaluado la parte real correspondiente a la



Graf. 35.- Representaciones conjuntas de la distribución de intensidad para diversos valores de T_C :
 (a) Todo el espectro de frecuencias.
 (b) Frecuencias mayores de 15 líneas por mm.
 (c) Frecuencias mayores de 33.53 líneas por mm.

Eq. (2.35), para distintos valores del factor de transmisión asociado al citoplasma, t_C , y del módulo del desplazamiento, $|\bar{E}|$. Su expresión analítica es:

$$\text{Re}A_1(\rho) = (2\pi/\lambda f) \text{sen}(-2\pi\bar{\rho}\bar{E}) \frac{d_N^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_N)}{\pi\rho d_N} (t_N - t_C) \Bigg|_{\rho = r_0/\lambda f} =$$

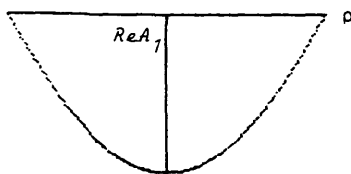
$$= \text{Re}A_1(\rho) \text{sen}(-2\pi\bar{\rho}\bar{E})$$

donde $\text{Re}A_1(\rho)$ es la parte real de la contribución del núcleo cuando éste no está desplazado. El resultado de multiplicar a esta última por $\text{sen}(-2\pi\bar{\rho}\bar{E})$ es una función oscilante, siendo la frecuencia de oscilación proporcional a $|\bar{E}|$. Este resultado se muestra en la Graf. 36, donde se representa la parte real de la amplitud de la contribución del núcleo para diferentes valores del desplazamiento. En todas ellas se observa la separación del máximo principal del origen de coordenadas, punto en el que aparecía el mínimo principal asociado a la contribución del núcleo cuando éste no está desplazado. La explicación que se da a este fenómeno en el Apartado 3.3.2.a es válida para este caso.

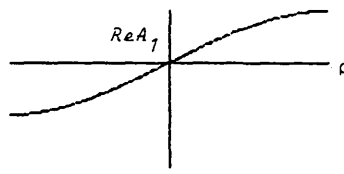
Sobre estas figuras también puede verse cómo la función es ahora antisimétrica con respecto al eje de ordenadas, a diferencia de los descrito en el Caso General y en el Caso de Fase, donde la función perdía totalmente la simetría.

La Tabla XXIX muestra los valores de las frecuencias espaciales para las cuales aparecen máximos, mínimos y frecuencias de corte. En ellas se observa que el desplazamiento del máximo principal es tanto mayor cuanto menor es el valor de $|\bar{E}|$.

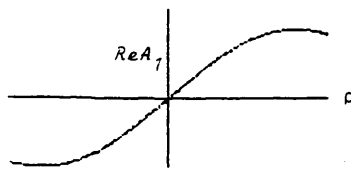
En las Graf. 37a y 37b se muestran conjuntamente las amplitudes asociadas al núcleo, para distintos valores del factor de transmisión t_C . En la primera de ellas el valor del desplazamiento es 0.005 mm y en la segunda, 0.025 mm. En ambas se comprueba que la forma de la función es independiente del factor de transmisión t_C . Las contribuciones de mayor amplitud corresponden a las de mayor valor para este último parámetro.



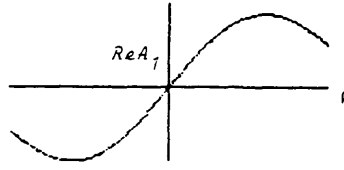
Sin desplazar



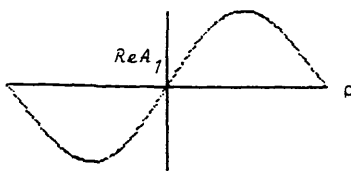
$E = 0.005 \text{ mm}$



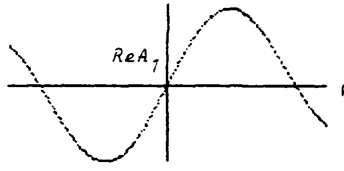
$E = 0.010 \text{ mm}$



$E = 0.015 \text{ mm}$

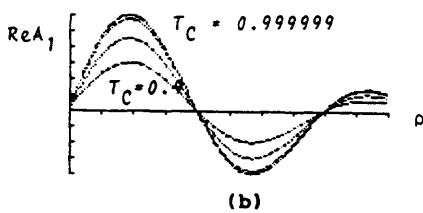
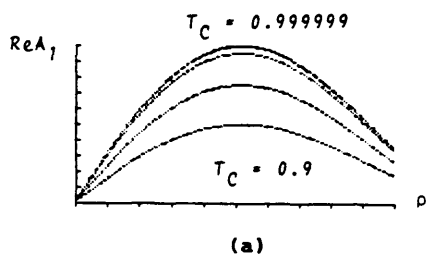


$E = 0.020 \text{ mm}$



$E = 0.025 \text{ mm}$

Graf. 36.- Representación de la parte real de la amplitud de la contribución asociada al núcleo para diferentes valores del desplazamiento del mismo: $\gamma_C = 0.999999$; $-25 \text{ mm}^{-1} < \rho < 25 \text{ mm}^{-1}$



Graf. 37.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud asociada al núcleo para diversos valores de T_C :
 (a) $E = 0.005$ mm.
 (b) $E = 0.025$ mm.

TABLA XXIX

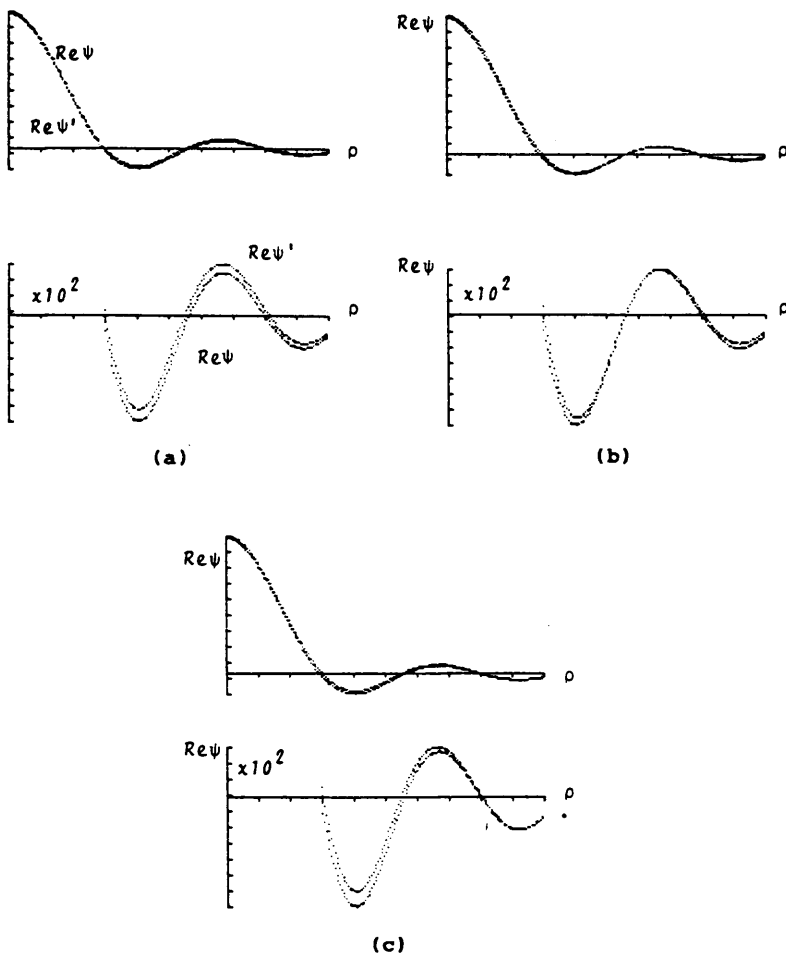
Frecuencias de los máximos, mínimos y ceros de la parte real de la amplitud asociada a la contribución del núcleo, para distintos valores del desplazamiento

\bar{E} (mm)	Frecuencias (mm ⁻¹)	
0.005	Max.	26.20
0.010	Max.	19.95
	Cero	49.95
0.015	Max.	14.95
	Cero	33.45
	Min.	43.45
0.020	Max.	11.70
	Cero	24.95
	Min.	34.70
	Cero	49.95
0.025	Max.	9.70
	Cero	19.95
	Min.	28.70
	Cero	39.95
	Max.	46.95

b) Análisis de la parte real de la amplitud total:

Las conclusiones sobre los resultados descritos en el Apartado 3.5.1.d son igualmente válidas en este caso.

La influencia del desplazamiento del núcleo sobre la amplitud total, afecta de forma más importante en la zona de altas frecuencias. En las Grafs. 38a, b y c, se representan conjuntamente la distribución de amplitud para los casos de núcleo desplazado y sin desplazar. En cada uno de ellos, las gráficas inferiores muestran los máximos y mínimos secundarios aisladamente, con objeto de observar en detalle las variaciones de los mismos. Estas representaciones ponen de manifiesto lo siguiente:



Graf. 38.- Comparación entre las partes reales de la amplitud total en los casos del núcleo desplazado y sin desplazar:

$$T_c = 0.999999$$

(a) $E = 0.005$ mm ; (b) $E = 0.015$ mm ; (c) $E = 0.025$ mm.

- El desplazamiento del núcleo hace que la amplitud de los mínimos disminuya en valor absoluto y la del máximo secundario aumente. Este fenómeno se produce para cualquier valor de t_c .

- Las frecuencias de corte también se modifican de forma que los máximos se ensanchan mientras que los mínimos se estrechan.

- Es de destacar que la amplitud total no presenta el máximo principal desplazado del origen en ninguno de los casos estudiados.

c) Análisis de la distribución de intensidad total:

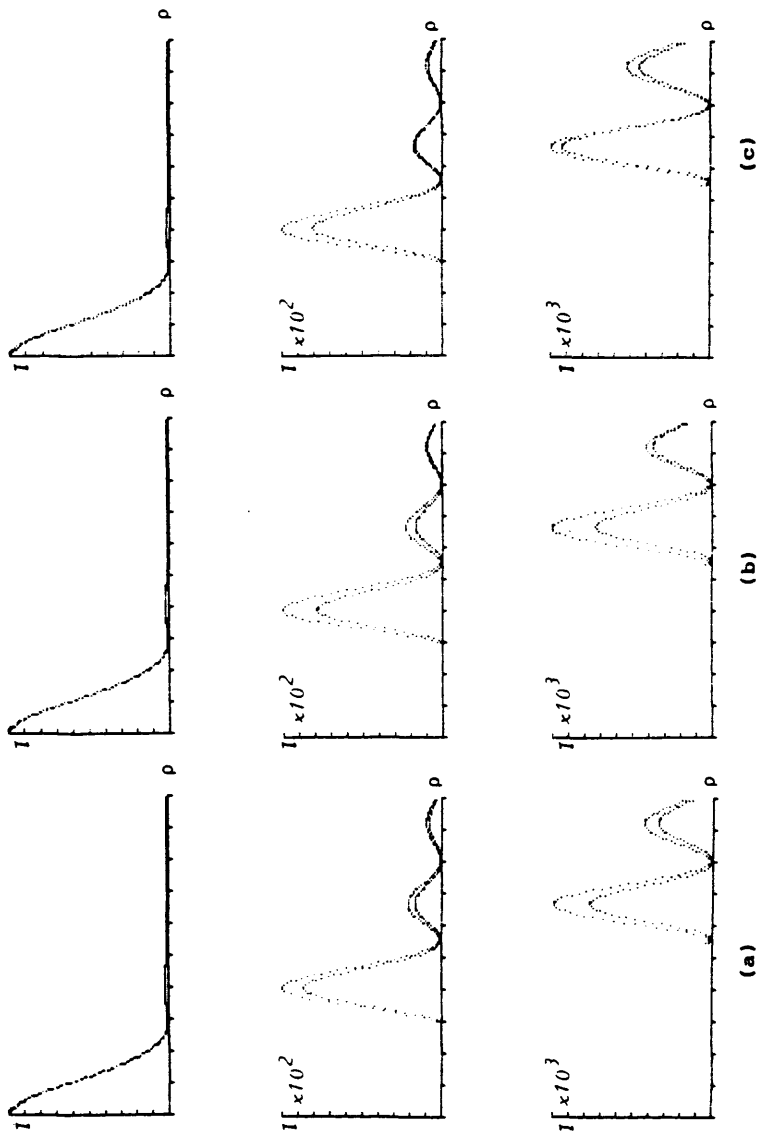
La distribución de intensidad total sigue presentando un máximo central y tres máximos secundarios, cuyos valores relativos, independientes de t_c , son los siguientes:

TABLA XXX

Valores relativos de los máximos de intensidad para diferentes desplazamientos del núcleo

$ \bar{E} $ (mm)	0	0.005	0.010	0.015	0.020	0.025
Max. pal.	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
1 ^{er} max.	0.0210	0.0180	0.0170	0.0160	0.0160	0.0160
2 ^a max.	0.0034	0.0044	0.00048	0.0046	0.0041	0.0036
3 ^{er} max.	0.0020	0.0015	0.0015	0.0017	0.0018	0.0016

Así pues, el aumento del desplazamiento provoca redistribuciones de la energía que afectan a los máximos secundarios. Este fenómeno se representa en la Graf. 39. En ella se representan conjuntamente la distribución de la intensidad asociada al núcleo centrado y la asociada al núcleo desplazado. Se puede observar cómo el primer y tercer máximos disminuyen para el núcleo desplazado, mientras que el segundo aumenta. De igual manera se producen desplazamientos en los valores de las frecuencias asociadas a los mínimos; el primer y tercer mínimos aparecen a frecuencias mayores, mientras que el segundo se desplaza hacia frecuencias menores. Como consecuencia el primer máximo se estrecha y el segundo



Graf. 39.- Comparación entre las distribuciones de intensidad en los casos del núcleo desplazado y sin desplazar: $T_C = 0.999999$
 (a) $E = 0.005$ mm ; (b) $E = 0.015$ mm ; (c) $E = 0.025$ mm.

se ensancha. En la Tabla XXXI se proporciona una relación de las frecuencias a las que aparecen los mínimos y de las dimensiones con ellas relacionadas.

TABLA XXXI

Frecuencias de los mínimos de la distribución de intensidad y dimensiones asociadas a ellas, para distintos valores de $|\bar{E}|$

	$ \bar{E} $ (mm)	Frecuencias (mm ⁻¹)	Diámetros (mm)
Primer mínimo	< 0.010	15.20	0.0803
	> 0.010	15.45	0.0790
Segundo mínimo	0.010 < $ \bar{E} $ < 0.015	27.70	0.0805
	0.005 y 0.025	27.95	0.0798
Tercer mínimo	0.005 < $ \bar{E} $ < 0.025	33.45	0.0969

La Tabla XXXI pone de manifiesto que los valores de las frecuencias de los mínimos contienen información sobre las dimensiones reales del objeto.

Finalmente, nótese que, en este caso, el desplazamiento del núcleo no da lugar a la pérdida de simetría de la figura de difracción, como ocurría en el Caso General (Apartado 3.3.2).

3.6.- APROXIMACIONES PARA VALORES DE FASE PEQUEÑOS.

3.6.1.- Caso General.

Las ecuaciones que se evalúan en este Apartado son las (2.40), (2.41) y (2.42), que corresponden, respectivamente, a la parte real de las amplitudes de difracción del núcleo, citoplasma y membrana. También se estudia la parte real de la Eq. (2.43), que corresponde a la amplitud total de difracción, y la distribución de intensidad total, Eq. (2.44).

El comportamiento de estas expresiones se analiza en función de los valores de las fases asociadas a cada zona de la

célula y del factor de transmisión del citoplasma. Atendiendo a la aproximación que se hace en este caso para la función de transmisión de la célula (Apartado 2.5), los valores dados a las fases son menores que la unidad, mientras que el factor de transmisión del citoplasma toma los mismos valores que en estudios anteriores.

a) Análisis de la parte real de la distribución de amplitud asociada a la contribución del núcleo:

De la misma forma que en los casos hasta ahora estudiados, la parte real de la amplitud de la contribución del núcleo no se comporta como una función oscilatoria en el intervalo estudiado. Su comportamiento con respecto a los parámetros antes citados se concreta en los siguientes aspectos:

- Cuando la fase del núcleo es mayor que la del citoplasma, la función toma su valor máximo en el origen, siendo positiva en todo el intervalo estudiado.

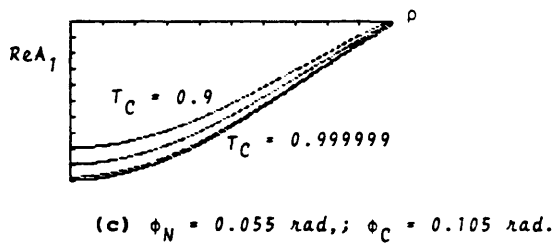
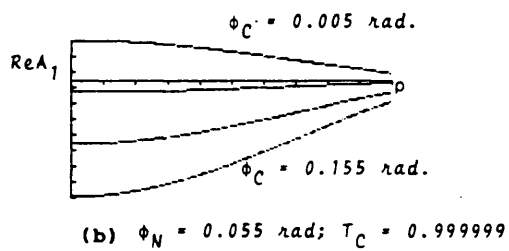
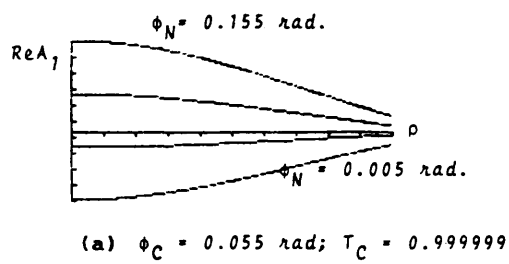
- Cuando la fase del citoplasma es mayor o igual que la del núcleo, la función presenta un mínimo en el origen, siendo negativa en todo el intervalo estudiado.

- Cuando se mantienen constantes la fase y el factor de transmisión del citoplasma, la función aumenta con la fase del núcleo (ver Graf. 40a). Estos resultados se muestran en la Tabla XXXII, en la que también se puede constatar que la amplitud es negativa para $\phi_N < \phi_C$.

TABLA XXXII

Variaciones de los máximos/mínimos con la fase del núcleo,
para $t_C = 0.999999$ y $\phi_C = 0.055$ rad.

ϕ_N (rad.)	0.005	0.055	0.105	0.155
$\text{Re}A_1(\phi_N)/ \text{Re}A_1(0.155) $	- 0.74	- 0.16	0.42	1.00



Graf. 40.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud asociada al núcleo para diferentes valores de los parámetros.

- Cuando se mantienen constantes la fase del núcleo y el factor de transmisión del citoplasma, la función disminuye cuando aumenta la fase del citoplasma (ver Graf. 40b). En la Tabla XXXIII estan los factores normalizados que toma la función en el origen de frecuencias.

TABLA XXXIII

Variaciones de los máximos/mínimos de la parte real de la amplitud asociada a la contribución del núcleo con la fase del citoplasma, para $\phi_N = 0.055$ rad. y $t_C = 0.999999$

ϕ_C (rad.)	0.005	0.055	0.105	0.155
$\text{Re}A_1(\phi_C)/ \text{Re}A_1(0.155) $	0.35	- 0.01	- 0.55	- 1.00

- Cuando se mantienen constantes las fases del núcleo y del citoplasma, la función crece cuando disminuye t_C (ver Graf. 40c). En la Tabla XXXIV se muestran las variaciones del máximo/mínimo para este caso.

TABLA XXXIV

Variaciones de los máximos/mínimos de la parte real de la amplitud asociada a la contribución del núcleo con el factor de transmisión del citoplasma, para $\phi_N = 0.055$ rad. y $\phi_C = 0.105$ rad.

t_C	$\text{Re}A_1(t_C)/ \text{Re}A_1(0.999999) $
0.999999	- 1.000
0.999	- 0.998
0.99	- 0.980
0.95	- 0.910
0.9	- 0.830

b) Análisis de la parte real de la distribución de amplitud asociada a la contribución del citoplasma:

La Eq. (2.41), que corresponde a la parte real de la amplitud del citoplasma, puede expresarse como sigue:

$$\text{Re}A_2(\rho) = C_1(\rho) + \phi_M \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} C_2(\rho) \quad (3.6.1)$$

$\rho = r_0 / \lambda f$

donde $C_1(\rho)$ y $C_2(\rho)$ tienen el mismo significado que el descrito en el Caso General. Al igual que en éste, el comportamiento de la parte real de la amplitud de esta contribución depende del factor de transmisión del citoplasma, t_C , y los resultados se pueden resumir en función de este último de la siguiente manera:

- Para valores de t_C próximos a t_M ($t_C = 0.999999$), el primer término de la expresión (3.6.1) es el que tiene mayor importancia. Este término depende de la función de Airy de argumento proporcional al diámetro de esta zona de la célula. En consecuencia, la parte real de la amplitud asociada a esta contribución es una función oscilante. Si la fase del citoplasma es mayor que la de la membrana, esta función presenta un máximo en el origen, un máximo secundario, dos mínimos y tres ceros. Pero si la fase del citoplasma es menor que la de la membrana, la función presenta un mínimo en el origen, un mínimo secundario, dos máximos y tres ceros.

Cuando ambas fases son iguales, el primer sumando de la expresión (3.6.1) se anula y, en este caso, el comportamiento de esta función es análogo al que se obtiene cuando el segundo sumando es el que tiene más peso. Esto será discutido más adelante.

Cuando la fase del citoplasma es mayor que la de la membrana, los valores de las frecuencias espaciales a las que aparecen los máximos, mínimos y ceros, son independientes de los valores de ambas fases (Tabla XXXV). Como puede verse en dicha Tabla, la dimensión asociada al primer cero corresponde al diámetro total, mientras que las del segundo y tercero, al del citoplasma.

TABLA XXXV

Valores de las frecuencias espaciales de los máximos, mínimos y ceros de la parte real de la amplitud asociada a la contribución del citoplasma, para $\phi_C > \phi_M$, y dimensiones asociadas a los puntos de corte

	Frecuencias (mm^{-1})	Diámetros (mm)
Max. pal.	0.00	
Cero	15.20	----- 0.080
1 ^{er} min.	20.70	
Cero	28.20	----- 0.079
1 ^{er} max. sec.	33.95	
Cero	40.95	----- 0.079
2 ^o min.	46.70	

Cuando la fase del citoplasma es menor que la de la membrana, se obtiene que, para $\phi_C = 0.005$ rad., los valores de las frecuencias espaciales coinciden con los indicados en la Tabla XXXV. Cuando ϕ_C toma valores superiores, solamente se modifica el primer cero, que aparece en 15.45 mm^{-1} , correspondiente al diámetro del citoplasma ($d_C = 0.079$ mm).

Para un valor fijo de la fase de la membrana tal que $\phi_M < \phi_C$, cuando aumenta la fase del citoplasma aumentan las amplitudes de los máximos y de los mínimos de esta función. Así mismo, cuando la fase de la membrana es mayor que la del citoplasma, las amplitudes de los máximos y mínimos disminuyen cuando aumenta ϕ_C . En la Tabla XXXVI se dan los valores que toman los máximos y mínimos de la parte real de esta contribución en los dos casos señalados y en la Graf. 41a se muestra este resultado.

TABLA XXXVI

Valores de los máximos y mínimos de la parte real de la amplitud asociada a la contribución del citoplasma cuando varía ϕ_C , para $t_C = 0.999999$

		ϕ_C (rad.) = 0.055	0.105	0.155
ϕ_M (0.005 rad.)	Max. pal.	0.34	0.67	1.00
	1 ^{er} min.	- 0.34	- 0.67	- 1.00
	1 ^{er} max.	0.34	0.67	1.00
	2 ^a min.	- 0.34	- 0.67	- 1.00
ϕ_M (0.155 rad.)	Min. pal.	- 1.00	- 0.68	- 0.33
	1 ^{er} max.	1.00	0.67	0.33
	1 ^{er} min.	- 1.00	- 0.67	- 0.33
	2 ^a max.	1.00	0.67	0.33

Nota: Cada máximo o mínimo está dividido por el valor absoluto máximo que alcanza al variar ϕ_C , para cada ϕ_M .

En la Tabla XXXVII, se dan los valores que toman los máximos y mínimos cuando varía ϕ_M , para un valor fijo de la fase del citoplasma, observándose que, cuando $\phi_C < \phi_M$ las amplitudes de éstos aumentan, mientras que cuando $\phi_C > \phi_M$, el comportamiento es el contrario. Como los valores de los máximos y mínimos para un valor determinado de ϕ_M se mantienen, solamente se indican los correspondientes al máximo/mínimo principal.

TABLA XXXVII

Valores del máximo/mínimo principal de la parte real de la amplitud asociada al citoplasma cuando varía ϕ_M , para $t_C = 0.999999$

	ϕ_M (rad.) =	0.055	0.105	0.155
$\phi_C = 0.005$ rad.	Min. pal.	- 0.34	- 0.67	- 1.00
	ϕ_M (rad.) =	0.005	0.055	0.105
$\phi_C = 0.155$ rad.	Max. pal.	1.00	0.67	0.33

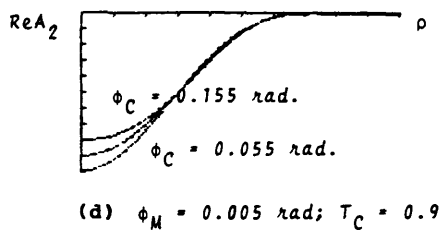
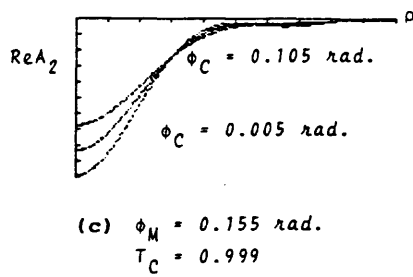
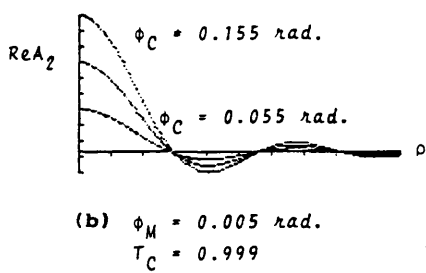
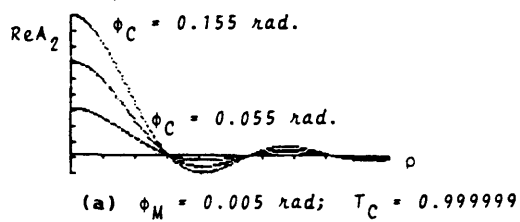
- Cuando $t_c = 0.999$, aumenta el factor que multiplica al segundo sumando de la derecha en la expresión (3.6.1), teniendo ahora un peso equivalente al del primero. Como consecuencia, la función comienza a perder su comportamiento oscilatorio, siendo este cambio tanto más importante cuanto mayor es la fase de la membrana frente a la del citoplasma. En la Graf. 41b se representan conjuntamente la parte real de esta amplitud para distintos valores de ϕ_c y se puede apreciar cómo, en este caso, la función presenta un máximo en el origen, un máximo secundario, dos mínimos y tres ceros, para cualquier valor de ϕ_c . En la Graf. 41c se hace la misma representación, pero ahora la fase de la membrana vale 0.155 rad. En todos los casos se aprecia que la función es menos oscilatoria, tomando su valor mínimo en el origen, ya que $\phi_M > \phi_c$. En este caso la función sólo es positiva para frecuencias espaciales superiores a un cierto valor, el cual aumenta a medida que aumenta ϕ_c . Así, para $\phi_c = 0.005$ rad., el cero se produce a 43.20 mm^{-1} mientras que para $\phi_c = 0.055$ rad., aparece a 44.45 mm^{-1} . Para $\phi_c = 0.105$ rad., la función es negativa en todo el intervalo estudiado.

- Cuando $t_c < 0.999$ ó las fases del citoplasma y de la membrana son iguales, el segundo sumando de la derecha predomina sobre el primero, independientemente de los valores de las fases. La parte real de la amplitud asociada al citoplasma se presenta siempre como una función negativa, que toma su valor mínimo en el origen. En la Graf. 41d se presenta este resultado.

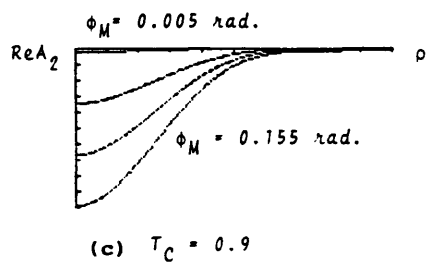
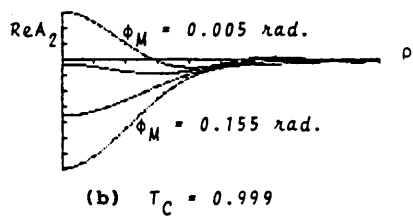
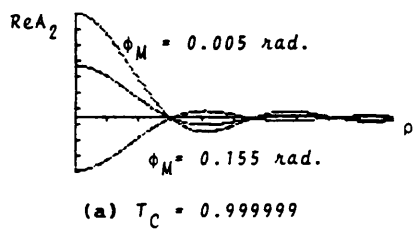
Los cambios de la parte real de la amplitud de la contribución del citoplasma en estos dos últimos casos se manifiestan de la siguiente manera:

- Fijados el factor de transmisión del citoplasma y la fase de la membrana, los valores de la función aumentan con ϕ_c . Esto se muestra en las Graf. 41b, c y d.

- Fijados la fase y el factor de transmisión del citoplasma, se observa que la función disminuye cuando aumenta ϕ_M . Estos resultados se muestran en la Graf. 42.



Graf. 41.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud asociada al citoplasma para distintos valores de los parámetros.



Graf. 42.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud asociada al citoplasma para distintos valores de ϕ_M y de T_C : $\phi_C = 0.105$ rad.

- Fijadas las fases de la membrana y del citoplasma, se observa que la función toma valores más pequeños cuando disminuye t_C , como puede verse en la Graf. 43.

c) Análisis de la parte real de la distribución de la amplitud asociada a la contribución de la membrana:

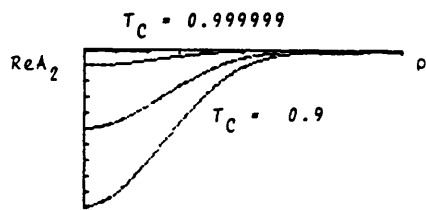
La parte real de esta amplitud, Eq. (2.42), puede expresarse como sigue:

$$\operatorname{Re}A_3(\rho) = \phi_M \left(M_1(\rho) + \frac{t_M - t_C}{(d_T - d_C)^2} M_2(\rho) \right) \Bigg|_{\rho = r_0/\lambda f} \quad (3.6.2)$$

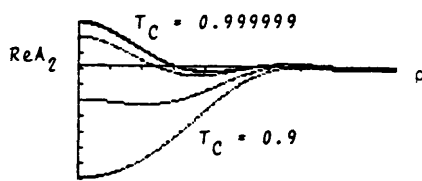
donde $M_1(\rho)$ y $M_2(\rho)$ están definidas con el mismo criterio que $C_1(\rho)$ y $C_2(\rho)$ en la expresión (3.6.1).

Al ser esta expresión formalmente idéntica a la (3.3.2), el comportamiento general es el mismo que el descrito para esta última en el Apartado 3.3.1.c:

- Para $t_C \approx t_M$ ($t_C = 0.999999$), la parte real de esta amplitud, presenta un máximo principal en el origen, un máximo secundario, dos mínimos y tres ceros. Las frecuencias espaciales a las que aparecen son independientes de la fase de la membrana y en la Tabla XXXVIII se da la relación de las mismas, así como las dimensiones asociadas a los ceros que, como puede verse, coinciden con el valor del diámetro total de la célula.



(a) $\phi_C = 0.005 \text{ rad.}; \phi_M = 0.155 \text{ rad.}$



(b) $\phi_C = 0.155 \text{ rad.}; \phi_M = 0.005 \text{ rad.}$

Graf. 43.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud asociada al citoplasma para diferentes valores de los parámetros.

TABLA XXXVIII

Frecuencias espaciales a las que aparecen los máximos, mínimos y ceros de la parte real de la amplitud asociada a la contribución de la membrana, para $t_c = 0.999999$, y dimensiones asociadas a las frecuencias de corte

	Frecuencias (mm^{-1})	Diámetros (mm)
Max. pal.	0.00	
Cero	15.20	0.080
Primer min.	20.45	
Cero	27.70	0.080
Primer max.	33.45	
Cero	40.45	0.080
Segundo Min.	46.20	

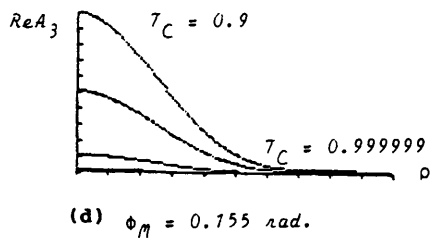
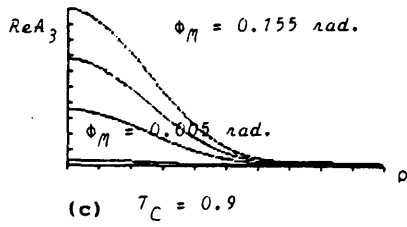
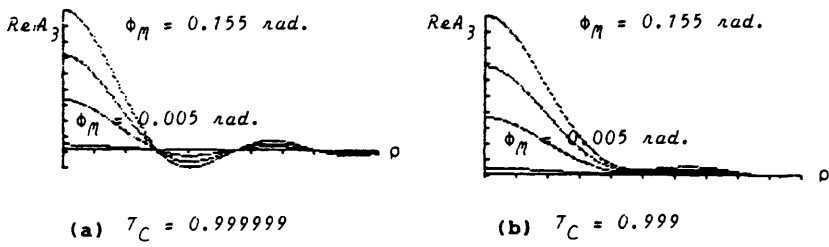
Las amplitudes asociadas con los máximos y mínimos aumentan cuando aumenta la fase de la membrana, tal y como se muestra en la Tabla XXXIX, donde sólo aparece el valor del máximo principal, ya que los demás presentan las mismas variaciones. En la Graf. 44a se muestra este resultado.

TABLA XXXIX

Variaciones relativas del máximo principal de la parte real de la amplitud asociada a la contribución de la membrana con ϕ_M , para $t_c = 0.999999$

ϕ_M (rad.) =	0.005	0.055	0.105	0.155
$\text{Re}A_3(\phi_M) / \text{Re}A_3(0.155) $	0.032	0.350	0.680	1.000

- Para $t_c = 0.999$, los dos primeros ceros desaparecen y el primer mínimo y segundo máximo son ahora relativos. La función toma valores positivos siempre que $\rho < 42.45 \text{ mm}^{-1}$, apareciendo el último mínimo en 46.70 mm^{-1} independientemente del valor de la fase de la membrana. La amplitud del máximo principal y del mínimo aumentan cuando aumenta ϕ_M . Las variaciones del máximo principal con ϕ_M coinciden con las que aparecen en la Tabla XXXIX.



Graf. 44.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud asociada a la contribución de la membrana.

En la Graf. 44b se representan conjuntamente las partes reales de las amplitudes para distintos valores de la fase de la membrana.

- Cuando $t_c < 0.999$, el máximo principal aumenta cuando aumenta ϕ_M , tomando los mismos valores que los dados en la Tabla XXXIX. Gráficamente se muestra este comportamiento en la figura 34c.

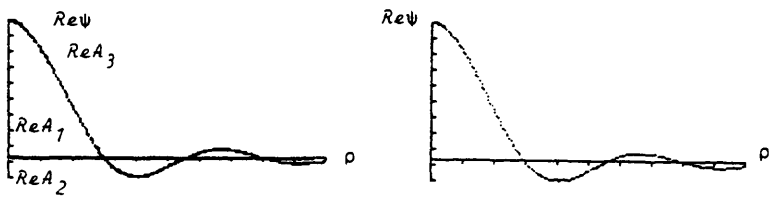
Por último, la parte real de la amplitud de la contribución de la membrana aumenta cuando disminuye t_c (Graf. 44d). En general, se puede decir que la disminución de este último parámetro hace que la función aumente en valor absoluto para todo ρ .

d) Análisis de la parte real de la distribución de amplitud total de difracción:

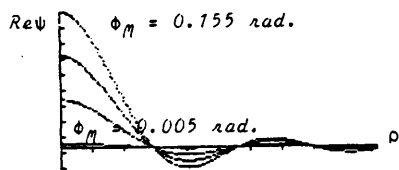
Los resultados obtenidos en el estudio de la parte real de la distribución de amplitud total de difracción, Eq. (2.43), ponen de manifiesto lo siguiente:

- Cuando las fases asociadas a cada región de la célula son iguales, el primer sumando de la expresión (3.6.1) se anula. Si a esta condición añadimos el que t_c sea muy próximo a la unidad ($t_c = 0.999999$), obtenemos que tanto la contribución del núcleo como la del citoplasma son muy pequeñas frente a la de la membrana. En consecuencia, la parte real de la amplitud total de difracción coincide con esta última contribución y, por tanto, esta función presenta un máximo en el origen, un máximo secundario, dos mínimos y tres ceros. Este resultado se muestra en la Graf. 45a. En la Tabla XL se proporcionan los valores de las frecuencias espaciales a las que aparecen los máximos, mínimos y ceros.

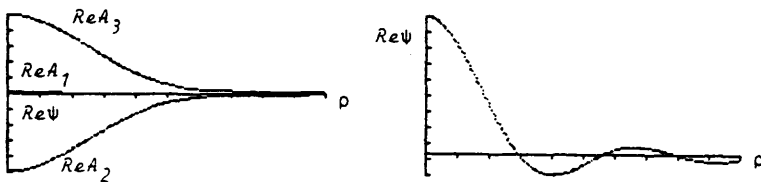
Comparando estos valores con los de la Tabla XXXIX se aprecia que las frecuencias espaciales a las que aparecen los máximos y mínimos son iguales. Sin embargo, los ceros están ligeramente desplazados, el primero y tercero hacia frecuencias menores y el segundo a frecuencias mayores, por lo que las dimensiones relacionadas con ellos no coinciden con el diámetro total de la célula. En consecuencia, en este caso, la información sobre la membrana está contenida en las frecuencias de los máximos y mínimos.



(a) $T_C = 0.999999$; $\phi_N = \phi_C = \phi_M = 0.155$ rad.



(b) $T_C = 0.999999$; $\phi_N = \phi_C = \phi_M$



(c) $T_C = 0.9$; $\phi_N = \phi_C = \phi_M = 0.155$ rad.

Graf. 45.- Comportamiento de la parte real de la amplitud total de difracción ($Re\psi$), cuando $\phi_N = \phi_C = \phi_M$

TABLA XL

Frecuencias espaciales asociadas a los máximos, mínimos y ceros de la parte real de la amplitud total, para $t_C = 0.99999$ y $\phi_N = \phi_C = \phi_M$ y dimensiones asociadas a los ceros

	Frecuencias (mm^{-1})	Diámetros (mm)
Max. pal.	0.00	
Cero	14.95	0.082
Primer min.	20.45	
Cero	28.20	0.079
Primer max.	33.45	
Cero	39.95	0.081
Segundo min.	46.20	

En la Graf. 45b se observa cómo las amplitudes de los máximos y mínimos aumentan con la fase. En la Tabla XLI están los valores normalizados asociados al máximo principal.

TABLA XLI

Variación relativa del máximo principal de la parte real de la amplitud total con la fase, para $t_C = 0.999999$ y

$$\phi_N = \phi_C = \phi_M$$

ϕ_M (rad.) =	0.005	0.055	0.105	0.155
$\text{Re}\psi(\phi_M)/ \text{Re}\psi(0.155) $	0.032	0.350	0.680	1.000

Para valores menores de t_C , esta coincidencia entre $\text{Re}A_3$ y $\text{Re}\psi$ se pierde, pues ahora los segundos sumandos de las expresiones (3.6.1) y (3.6.2) son los que predominan. No obstante, la parte real de la amplitud total en estudio presenta un comportamiento análogo al que acabamos de describir (Graf. 45c). En este caso, las frecuencias espaciales de los máximos, mínimos y ceros son prácticamente iguales a las ya mostradas en la Tabla XL.

- La contribución del núcleo tiene una influencia importante sobre la parte real de la amplitud total cuando la fase del citoplasma es pequeña frente a la fase del núcleo. Esta influencia

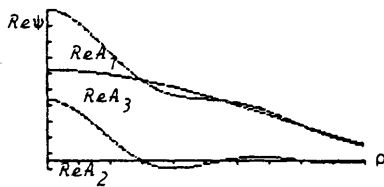
es tanto más importante cuanto más próximo a la unidad es el factor de transmisión del citoplasma. En la Graf. 46a se representan conjuntamente las amplitudes asociadas a las tres contribuciones y la amplitud total. En ella puede observarse cómo la parte real de la amplitud total oscila muy suavemente, tomando valores positivos en todo el intervalo estudiado. En la Graf. 46b se hace una representación análoga a la anterior y se observa que su comportamiento es igual al último descrito. Sin embargo, se ve claramente que la contribución del núcleo, en este caso, es muy pequeña frente a las de la membrana y del citoplasma, aunque el núcleo sigue teniendo una importante influencia, debido a que estas dos últimas contribuciones toman valores muy parecidos y de signo contrario, cancelándose. En la Tabla XLII, se muestran las variaciones del máximo principal de la parte real de la amplitud total. En la Graf. 46c se representa este resultado. Tanto los resultados numéricos como los gráficos muestran que el valor del máximo crece con ϕ_N . Por otra parte, en la Graf. 46d se observa que las oscilaciones de la amplitud total aumenta con ϕ_M .

TABLA XLII

Variaciones del máximo principal de la parte real de la amplitud total con ϕ_N , para $t_C = 0.99$,
 $\phi_C = 0.005$ rad. y $\phi_M = 0.155$ rad.

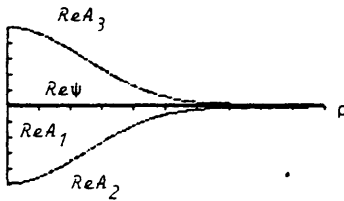
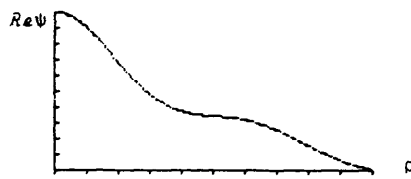
ϕ_N (rad.) =	0.055	0.105	0.155
$Re\psi(\phi_N)/ Re\psi(0.155) $	0.69	0.84	1.00

- La contribución del citoplasma predomina sobre las otras dos cuando la fase de la membrana es pequeña frente a la del citoplasma y t_C es muy próximo a la unidad. En la Graf. 47a se presenta este comportamiento, observándose cómo la parte real de la amplitud total de difracción coincide prácticamente con esta contribución. En esta representación $\phi_N = \phi_C$, con lo cual la contribución del núcleo toma valores muy pequeños, acentuándose el predominio de la contribución del citoplasma. La Graf. 47a



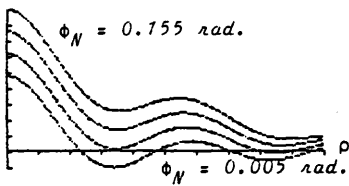
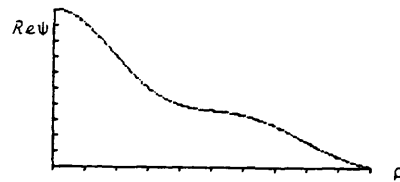
(a)

$$T_C = 0.999999 ; \phi_N = 0.155 \text{ rad.} ; \phi_C = \phi_M = 0.005 \text{ rad.}$$

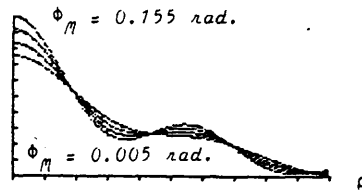


(b)

$$T_C = 0.9 ; \phi_N = 0.155 \text{ rad.} ; \phi_C = \phi_M = 0.005 \text{ rad.}$$

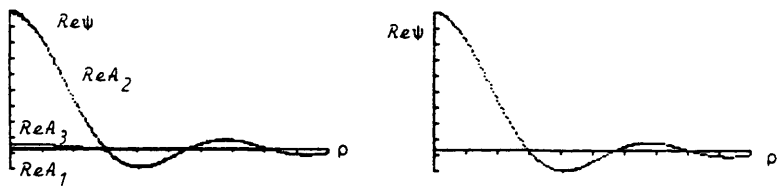


(c) $T_C = 0.99 ; \phi_C = 0.005 \text{ rad.}$
 $\phi_M = 0.155 \text{ rad.}$



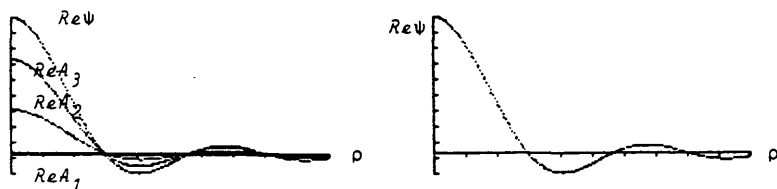
(d) $T_C = 0.99 ; \phi_C = 0.005 \text{ rad.}$
 $\phi_N = 0.155 \text{ rad.}$

Graf. 46.- Comportamiento de la parte real de la amplitud total de difracción ($Re\psi$) para valores pequeños de ϕ_C .



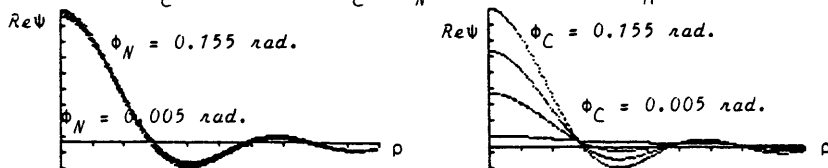
(a)

$$T_C = 0.999999; \phi_C = \phi_N = 0.155 \text{ rad.}; \phi_M = 0.005 \text{ rad.}$$



(b)

$$T_C = 0.999999; \phi_C = \phi_N = 0.155 \text{ rad.}; \phi_M = 0.105 \text{ rad.}$$



(c) $T_C = 0.999999; \phi_C = 0.155 \text{ rad.}$ (d) $T_C = 0.999999;$
 $\phi_M = 0.005 \text{ rad.}$ $\phi_N = 0.155 \text{ rad.};$

$\phi_M = 0.005 \text{ rad.}$

Graf. 47.- Comportamiento de la parte real de la amplitud total de difracción para valores pequeños de ϕ_M .

muestra cómo la parte real de la amplitud total de difracción presenta un máximo principal en el origen, un máximo secundario, dos mínimos y tres ceros. La Tabla XLIII indica los valores de las frecuencias espaciales a las que se producen estos últimos que, comparados con los que aparecen en la Tabla XXXV, ponen de manifiesto su alto grado de coincidencia.

TABLA XLIII

Frecuencias espaciales asociadas a los máximos, mínimos y ceros de la parte real de la amplitud total para $\phi_N = \phi_C = 0.155$ rad., $\phi_M = 0.005$ rad. y $t_C = 0.999999$, y dimensiones asociadas a las frecuencias de corte

	Frecuencias (mm^{-1})	Diámetros. (mm)
Max. pal.	0.00	
Cero	15.20	----- 0.080
Primer min.	20.70	
Cero	28.45	----- 0.078
Primer Max.	33.95	
Cero	40.45	----- 0.080
Segundo min.	46.70	

Las dimensiones asociadas a estas frecuencias no contienen, sin embargo, información sobre las de esta región de la célula.

Cuando la fase del núcleo disminuye, los valores de las frecuencias espaciales que se muestran en la Tabla XLIII varían de forma que el primer y tercer ceros se desplazan hacia frecuencias menores y el segundo, a frecuencias mayores. Cuando disminuye la fase del citoplasma varían en el sentido contrario al que se acaba de exponer.

En la Graf. 47b se representan conjuntamente todas las contribuciones y la amplitud total, pero ahora, $\phi_M = 0.105$ rad., pudiéndose observar que la contribución del citoplasma ya no predomina sobre la de las otras dos.

En las Grafts. 47c y d, se representan conjuntamente la parte real de la amplitud total de difracción para diferentes valores de ϕ_N y ϕ_C . La primera refleja cómo las amplitudes de los máximos aumentan ligeramente y la de los mínimos disminuyen, cuando aumenta ϕ_N . En la segunda se observa que las amplitudes de máximos y mínimos aumentan, en valor absoluto, con ϕ_C .

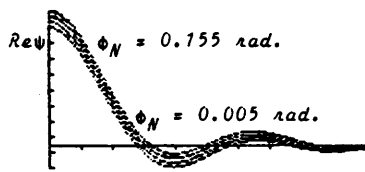
Fuera de las tres situaciones descritas, la parte real de la amplitud total de difracción es siempre una función que presenta un máximo en el origen, un máximo secundario, dos mínimos y tres ceros. En la Graf. 48 aparece la dependencia de la amplitud total con los parámetros bajo los cuales se ha realizado el estudio. En la Graf. 48a se representan conjuntamente la parte real de la amplitud total para diferentes valores de la fase del núcleo, apreciándose que las amplitudes de los máximos aumentan, mientras que la de los mínimos disminuyen.

Cuando aumentan las fases del citoplasma y de la membrana, las amplitudes de los máximos y mínimos aumentan. Este resultado aparece en las Grafts. 48b y c. El mismo fenómeno tiene lugar cuando aumenta el factor de transmisión del citoplasma, tal y como se muestra en la Graf. 48d. En las Grafts. 48c y d también se observa cómo la variación de ϕ_M y t_C no provocan grandes cambios en la parte real de la amplitud total de difracción.

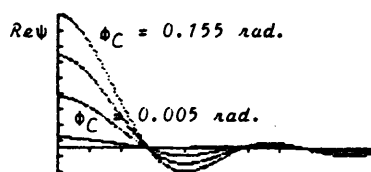
e) Análisis de la distribución de intensidad total de difracción:

En este caso la expresión evaluada es la Eq. (2.44) y se obtiene que la distribución de intensidad total presenta, en todos los casos, un máximo principal en el origen y tres máximos secundarios en el intervalo estudiado.

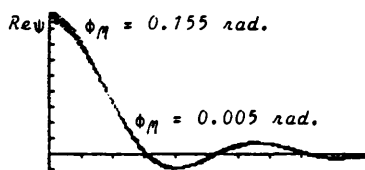
A continuación vamos a ver que la distribución de intensidad no contiene, en este caso, información sobre las fases. En el Apartado 2.5.1. se obtuvo que, cuando las fases asociadas a las distintas partes de la célula son mucho menores que la unidad, la parte real de la amplitud total de difracción coincidía con la parte real de la amplitud de difracción del Caso General, Apartado 2.2, exceptuando la dependencia con las fases, que en este ca-



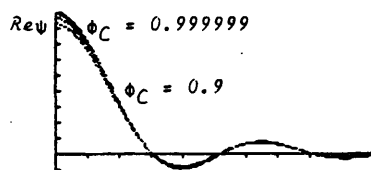
(a) $T_C = 0.99$; $\phi_C = 0.055$ rad.
 $\phi_M = 0.155$ rad.



(b) $T_C = 0.99$; $\phi_N = 0.055$ rad.
 $\phi_M = 0.155$ rad.



(c) $T_C = 0.99$; $\phi_C = 0.055$ rad.
 $\phi_M = 0.105$ rad.



(d) $\phi_N = 0.105$ rad.
 $\phi_C = 0.055$ rad.
 $\phi_M = 0.155$ rad.

Graf. 48.- Representaciones conjuntas de la parte real de la amplitud total de difracción.

so es lineal y en el otro sinusoidal. Así mismo, la parte imaginaria de la amplitud total de difracción coincide con la parte real de la misma del Caso de Amplitud (Apartado 3.4.2) y, por tanto, no presenta dependencia con las fases de las distintas partes de la célula, dependiendo solamente de los factores de transmisión de cada zona de la misma.

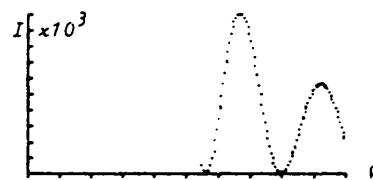
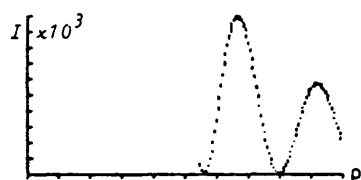
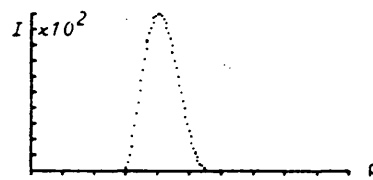
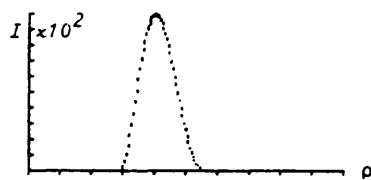
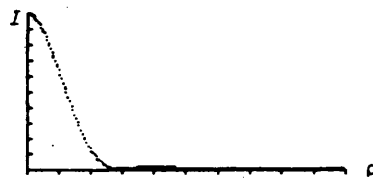
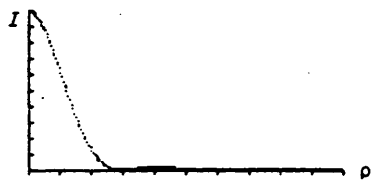
En la Tabla XLIV aparecen los valores que toman la parte real y la imaginaria de la amplitud total de difracción y se comprueba que esta última es mucho mayor que la primera (aproximadamente seis veces), siendo esto generalizable para cualquier valor de t_C . En consecuencia, los valores de las fases no influyen sobre la distribución de intensidad de manera notable.

TABLA XLIV

Valores de las partes real e imaginaria de la amplitud total de difracción, para $\phi_N = \phi_C = \phi_M$

	Re ψ	Im ψ
Max. pal.	0.15	1.00
Primer min.	- 0.15	- 1.00
Primer max.	0.15	1.00
Segundo min.	- 0.15	- 1.00

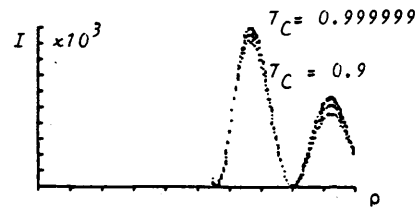
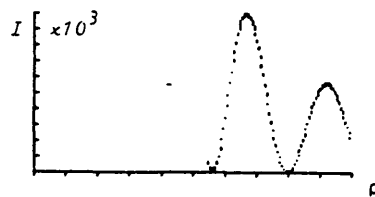
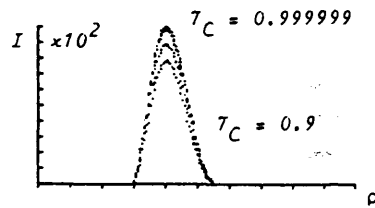
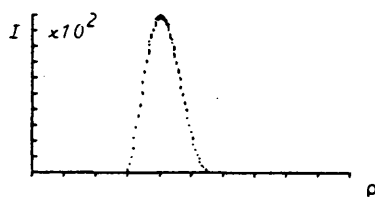
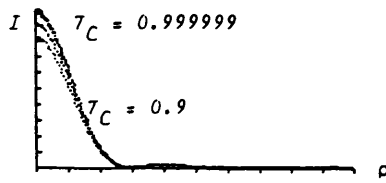
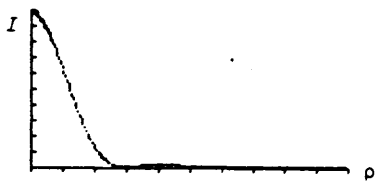
En la Graf. 49 se ha hecho una representación conjunta de la distribución de intensidad. En la Graf. 49a, haciendo variar ϕ_N , y en la 49b, ϕ_M . En la Graf. 50a, el parámetro variable es ϕ_C . Finalmente, en la Graf. 50b se representan conjuntamente las distribuciones de intensidad asociadas a distintos valores del factor de transmisión, poniéndose de manifiesto que las intensidades de los máximos disminuyen cuando disminuye t_C . En la Tabla XLV están los valores normalizados de los mismos.



(a) $\gamma_C = 0.999999$
 $\phi_M = 0.105 \text{ rad.}$
 $\phi_C = 0.155 \text{ rad.}$

(b) $\gamma_C = 0.999999$
 $\phi_C = 0.155 \text{ rad.}$
 $\phi_M = 0.105 \text{ rad.}$

Graf. 49.- Representaciones conjuntas de la distribución de intensidad total de difracción para diferentes valores de:
 (a) ϕ_N ; (b) ϕ_M



(a) $T_C = 0.999999$
 $\phi_N = \phi_M = 0.105 \text{ rad.}$

(b) $\phi_N = \phi_M = 0.105 \text{ rad.}$
 $\phi_C = 0.155 \text{ rad.}$

Graf. 50.- Representaciones conjuntas de la distribución de intensidad total de difracción.

TABLA XLV

Variación de los valores relativos de los máximos de la distribución de intensidad total con t_c

$t_c =$	0.999999	0.999	0.99	0.95	0.90
Max. pal.	1.000	0.998	0.981	0.911	0.827
Primer max.	1.000	0.997	0.977	0.888	0.783
Segundo max.	1.000	0.999	0.991	0.956	0.916
Tercer max.	1.000	0.998	0.980	0.904	0.814

Estos resultados permiten concluir que, para un objeto cuya función de transmisión responda a las características del aquí considerado, la distribución de intensidad total no contiene información sobre las fases que pueda tener asociadas en cada zona. La distribución de intensidad total de difracción es equivalente a la obtenida para un objeto de amplitud y solamente se podría obtener información sobre las fases, estudiando la amplitud de difracción, mediante métodos más sofisticados de interferometría holográfica, cuya aplicación a objetos microscópicos, como el caso de la célula biológica, presenta grandes dificultades experimentales.

3.6.2.- Caso de fase.

Se estudian numericamente en este Apartado las Eqs. (2.48), (2.49) y (2.50), que corresponden a las partes reales de las amplitudes de difracción asociadas a las contribuciones del núcleo, citoplasma y membrana, respectivamente. Así mismo, se estudian la parte real de la Eq. (2.47), que corresponde a la amplitud total de difracción, y la Eq. (2.51), que representa la distribución de intensidad total.

Las expresiones relativas a las partes reales de las amplitudes de difracción del núcleo, citoplasma y membrana son análogas a las obtenidas en el Caso de Fase (Eqs. (2.21), (2.22) y (2.23)), a excepción de la dependencia con las fases que, en este caso, es lineal, mientras que en el anteriormente citado es

exponencial. Esta dependencia no altera, en lo fundamental, el comportamiento descrito en el Apartado 3.4.1.a, b y c. Esta conclusión es también válida para la parte real de la amplitud total. Si comparamos la Eq. (2.47) con la (2.20), se observa que la diferencia fundamental entre ambas reside en la parte imaginaria, ya que la amplitud de difracción, en este caso, depende de $\delta(r_0)$. Sin embargo, las partes reales de ambas funciones presentan un comportamiento análogo con respecto a las tres fases, aunque tengan una dependencia funcional diferente con las mismas.

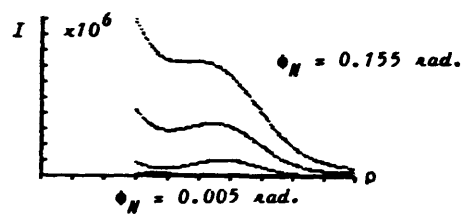
Por lo tanto en esta Sección nos limitaremos a presentar los resultados obtenidos en el estudio de la distribución de intensidad total de difracción.

a) Análisis de la distribución de intensidad total de difracción:

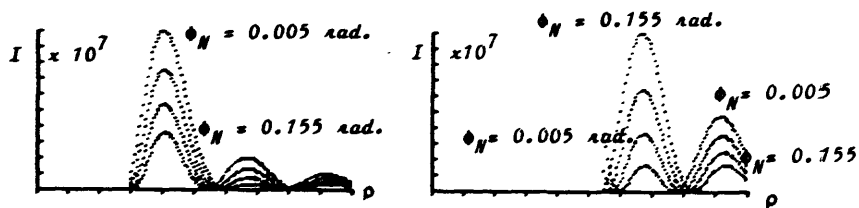
En la Eq. (2.51), expresión de la distribución de intensidad total, se observa que en el origen de frecuencias espaciales está contenida casi la totalidad de la energía, ya que en la expresión de la intensidad interviene un término en $\delta(r_0)$. Por tanto, las amplitudes de los máximos secundarios son de un orden de magnitud muy pequeño comparado con el del máximo principal.

Por esta razón, en el intervalo de frecuencias en el que se realiza el estudio se ha eliminado el origen para poner en evidencia que la distribución de intensidad presenta tres máximos secundarios, exceptuando el caso en que la fase del citoplasma es muy pequeña frente a la del núcleo. En esta situación particular, la distribución de intensidad presenta, además del máximo central, un máximo secundario, que también desaparece si la fase de la membrana es muy pequeña (ver Graf. 51a).

El comportamiento de la intensidad total de difracción con relación a las fases asociadas a cada zona de la célula, se resume en los siguientes aspectos:



(a) $\phi_C = 0.005 \text{ rad.}$
 $\phi_H = 0.155 \text{ rad.}$



(b) $\phi_C = 0.105 \text{ rad.}, \phi_H = 0.055 \text{ rad.}$

Graf. 51.- Representaciones conjuntas de la distribución de intensidad total de difracción.

- En la Tabla XLVI aparecen los valores normalizados asociados a los máximos cuando varía la fase del núcleo, observándose que cuando aumenta ϕ_N el primer y tercer máximos secundarios disminuyen y el segundo aumenta.

TABLA XLVI

Variación de las amplitudes relativas de los máximos de la distribución de intensidad con ϕ_N para $\phi_C = 0.105$ rad. y $\phi_M = 0.055$ rad.

ϕ_N (rad.) =	0.005	0.055	0.105	0.155
Primer max.	1.00	0.75	0.53	0.36
Segundo max.	0.16	0.36	0.64	1.00
Tercer max.	1.00	0.74	0.52	0.34

En la Graf. 51b, se observa este resultado. Así mismo, puede apreciarse cómo se modifican las frecuencias a las que aparecen los mínimos de la distribución de intensidad. Cuando aumenta ϕ_N , el primer y tercer mínimos se desplazan hacia frecuencias mayores, mientras que el segundo lo hace hacia frecuencias menores. En la Tabla XLVII se muestran los valores de las frecuencias espaciales a las que aparecen los mínimos.

TABLA XLVII

Frecuencias espaciales (mm^{-1}) a las que aparecen los mínimos cuando varía ϕ_N , para $\phi_C = 0.105$ rad, y $\phi_M = 0.155$ rad.

ϕ_N (rad.) =	0.005	0.055	0.105	0.155
Primer min.	14.45	14.95	15.45	15.95
Segundo min.	30.20	28.95	28.20	27.20
Tercer min.	38.70	39.70	40.70	41.70

Consecuentemente, se comprueba que el primer máximo se estrecha mientras que el segundo se ensancha, cuando aumenta la fase del núcleo.

Así mismo, se observa que sólo para $\phi_N = 0.105$ rad., las frecuencias de los mínimos contienen información sobre el objeto y, más concretamente, sobre el citoplasma.

- Las amplitudes asociadas a los tres máximos aumentan cuando aumenta la fase del citoplasma, como puede verse en la Tabla XLVIII.

TABLA XLVIII

Variación de las amplitudes relativas de los máximos con ϕ_C , para $\phi_N = 0.105$ rad. y $\phi_M = 0.055$ rad.

ϕ_C (rad.) =	0.005	0.055	0.105	0.155
Primer max.	0.04	0.04	0.37	1.00
Segundo max.	-	0.41	0.67	1.00
Tercer max.	-	0.04	0.36	1.00

Por otra parte, se observa que el aumento de la fase del citoplasma provoca redistribuciones de la energía. Para valores pequeños de ϕ_C , no existen el segundo y tercer máximos, y aparecen a medida que aumentan éstos.

La Tabla II pone de manifiesto que las frecuencias a las que aparecen los mínimos varían con la fase del citoplasma, de forma que el primer y tercer ceros se desplazan hacia bajas frecuencias y el segundo hacia altas.

TABLA II

Frecuencias espaciales (mm^{-1}) a las que aparecen los mínimos cuando varía ϕ_C , para $\phi_N = 0.105$ rad. y $\phi_M = 0.005$ rad.

ϕ_C (rad.) =	0.005	0.055	0.105	0.155
Primer min.	20.45	16.20	15.45	14.95
Segundo min.	-	26.20	28.20	28.70
Tercer min.	-	42.20	40.70	40.20

De estos datos se deduce que el primer máximo se ensancha, mientras el segundo se estrecha, cuando aumenta ϕ_C . En la Graf. 52a se representan conjuntamente las distribuciones de intensidad para distintos valores de la fase del citoplasma, manteniendo fijas las fases del núcleo y de la membrana. Puede observarse que el primer máximo aumenta mucho más que los otros dos al aumentar ϕ_C .

- En la Graf. 52b se representan conjuntamente las distribuciones de intensidad para distintos valores de la fase de la membrana. La representación muestra cómo las variaciones con ϕ_M no son tan importantes como en el caso anterior. También se observa que el primer máximo es mucho mayor que los otros dos y que el tercero, es ligeramente superior al segundo. La Tabla L muestra cómo varían numericamente estos máximos con ϕ_M .

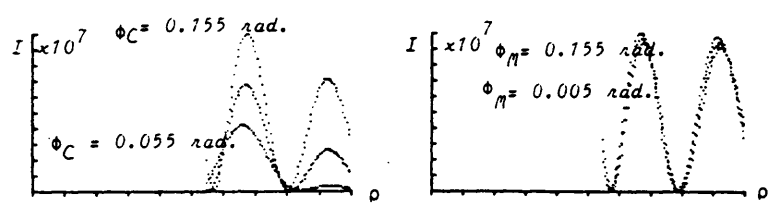
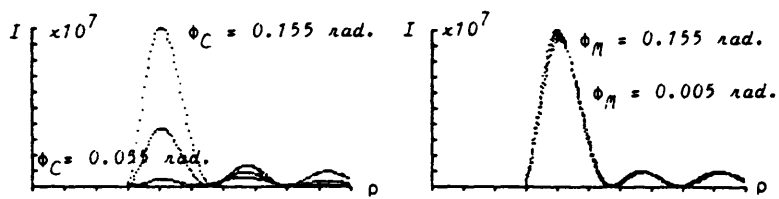
TABLA L

Variación relativa de los máximos secundarios de la distribución de intensidad con ϕ_M , para $\phi_C = 0.105$ rad. y $\phi_N = 0.055$ rad.

ϕ_M (rad.) =	0.005	0.055	0.105	0.155
Primer max.	0.94	0.96	0.98	1.00
Segundo max.	0.91	0.94	0.96	1.00
Tercer max.	0.91	0.93	0.96	1.00

Los datos que aparecen en la Tabla demuestran que los tres máximos aumentan con ϕ_M , aunque estas variaciones no son demasiado importantes.

En la Tabla LI aparecen los valores de las frecuencias espaciales asociadas a los mínimos, para distintos valores de ϕ_M , apreciándose que éstos se mantienen aproximadamente constantes cuando varía ésta última.



(a) $\phi_N = 0.105 \text{ rad.}$
 $\phi_M = 0.055 \text{ rad.}$

(b) $\phi_C = 0.105 \text{ rad.}$
 $\phi_N = 0.055 \text{ rad.}$

Graf. 52.- Representaciones conjuntas de la distribución de intensidad total de difracción.

TABLA LI

Frecuencias espaciales (mm^{-1}) asociadas con los mínimos cuando varía ϕ_M , para $\phi_N = 0.055$ rad. y $\phi_C = 0.105$ rad.

ϕ_M (rad.) =	0.005	0.055	0.105	0.155
Primer min.	14.95	14.95	14.70	14.70
Segundo min.	29.20	28.95	28.95	28.70
Tercer min.	39.95	39.70	39.45	39.20

Para determinados valores de las fases se observa que máximos de órdenes superiores cobran mayor importancia que otros de órdenes más bajos. Por ejemplo, para $\phi_N = 0.005$ rad. el tercer máximo secundario es mayor que el segundo, cualquiera que sea el valor de ϕ_C ; para $\phi_N = 0.105$ rad. y $\phi_C = 0.055$ rad, ocurre lo mismo, (ver Grafts. 51b, 52a y b).

La distribución de intensidad verifica que:

$$I(\phi_N, \phi_C, \phi_M) = I(-\phi_N, -\phi_C, -\phi_M)$$

Es decir, la función es simétrica con respecto al origen. Sin embargo, las ecuaciones obtenidas en el Caso de Fase para la distribución de intensidad ahora no se verifican. Esto significa que una misma distribución de intensidad sólo puede corresponder a una pareja de valores de las fases, con lo cual la imprecisión que se tenía en el Caso de Fase, es eliminada cuando las fases son mucho menores que la unidad.

3.7.- CONCLUSIONES GENERALES SOBRE EL ANALISIS NUMERICO.

En este Capítulo se ha analizado la distribución de la intensidad de difracción de una célula biológica y las variaciones que se producen en dicha distribución cuando suponemos diferentes comportamientos ópticos para la célula biológica. Estos últimos están asociados a parámetros tales como la fase, el coeficiente de transmisión y el desplazamiento del núcleo

Para obtener una mayor información, las dimensiones consideradas para el objeto son muy pequeñas, con lo cual, el espectro está muy extendido, lo que posibilita estudiar más detalladamente las modificaciones del mismo. Estas dimensiones se mantienen constantes en todos los cálculos realizados.

Las conclusiones más destacables derivadas del estudio realizado se resumen en los siguientes puntos:

a) Sobre la influencia de las fases:

- La fase del núcleo, ϕ_N , modifica el patrón de difracción cuando es mayor que las fases de la membrana y del citoplasma. En estas condiciones, cuando aumenta ϕ_N , los máximos de orden impar aumentan y los de orden par disminuyen.

- La fase del citoplasma, ϕ_C , tiene una influencia notable cuando es mayor que las fases de la membrana y del núcleo. Su aumento provoca redistribuciones de la energía contrarias a las acabadas de mencionar para ϕ_N .

- La fase de la membrana, ϕ_M , produce alteraciones en el patrón de difracción que no son tan acusadas como las producidas por las otras dos fases. Estas alteraciones son distintas dependiendo de si el objeto es puro de fase o es de fase y amplitud.

b) Sobre la influencia de los factores de transmisión:

- El factor de transmisión asociado al núcleo, t_N , no produce alteraciones importantes en el patrón de difracción, ya que las dimensiones de esta parte de la célula son pequeñas. Por tanto, el que t_N sea mayor o menor (núcleo menos o más opaco) no

introduce variaciones destacables en la distribución de intensidad.

- El factor de transmisión del citoplasma, t_c , tiene, por el contrario, una influencia notable en la respuesta que se obtiene en el plano de Fourier. Esto es debido al comportamiento parabólico asignado a la membrana en el modelo teórico diseñado para la célula. Este comportamiento puede ser detectado o no en el patrón de difracción dependiendo, entre otros factores, del valor de t_c . En el estudio realizado se muestra cómo para valores de t_c que difieran de t_m en cantidades superiores a 10^{-3} , el comportamiento parabólico se manifiesta en las amplitudes de difracción del citoplasma y de la membrana. Sin embargo, estas modificaciones no alteran de forma significativa la distribución de intensidad de difracción, con lo cual este comportamiento no puede ser detectado en el patrón de difracción.

Por otro lado, al ser el citoplasma la zona más extensa de la célula, absorbe la mayor parte de la energía, en detrimento de la que llega al plano de Fourier, disminuyendo, por tanto, la amplitud de los máximos.

c) Sobre el desplazamiento del núcleo:

El desplazamiento del núcleo del centro de simetría de la célula conlleva un cambio drástico en su función de transmisión, lo que da lugar a importantes variaciones en el patrón de difracción. Estas son mucho más relevantes cuando las fases asociadas a cada zona de la célula no son nulas.

El término de fase que introduce el desplazamiento afecta sólo a la amplitud asociada al núcleo y depende del producto escalar del vector desplazamiento por el vector radial asociado al plano de difracción. Este factor de fase hace que el máximo central no se sitúe en el origen de frecuencias y que el patrón de difracción no presente la simetría típica de la mancha de Airy. Estos dos efectos son mucho más pronunciados cuando la fase del núcleo es mucho mayor que la del citoplasma. Por otro lado, el poder observarlos depende de la orientación que

exista entre el vector desplazamiento y el radial. Así, cuando la observación se realice de forma que el ángulo entre ambos sea de 0° se estará en las mejores condiciones de apreciar el fenómeno descrito; si el ángulo es de $\pi/2$ rad. el fenómeno anterior no podrá ser observado.

d) Sobre los modelos teóricos definidos:

- Los resultados obtenidos en el Caso de Fase demuestran cómo el conjunto de valores asociados a las fases, que dan lugar a una misma distribución de intensidad de difracción, son infinitos.

- Este resultado se hace más restrictivo cuando los valores de las fases asociadas a cada parte de la célula son muy pequeños.

- En el caso en que la célula tenga asociada una función de transmisión compleja, con amplitud menor que la unidad y fases muy pequeñas, el patrón de difracción es equivalente al que se obtiene cuando las fases son nulas (Caso de Amplitud). La información sobre las fases está contenida en la parte real de la amplitud total de difracción.

Como comentario final mencionaremos que el rango de frecuencias espaciales comprendido entre 20 y 40 ciclos/mm, aquí representado, ha sido también estudiado por Kopp y colaboradores (Kopp, R.E. et al, 1974, 1976) considerándolo como el más adecuado para discriminar comportamientos entre células sanas y malignas.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 3.

- 1.- CATSIMPOOLAS, N. (Editor): "Cell Analysis". (Ed. Plenum Press, N.Y., 1982). Vol. 1, Cap. 5, Sección V.
- 2.- HUTZLER, P.I.S.: "Spatial frequency filtering and its application to Microscopy". Applied Optics, 16, pp. 2264, (1977).
- 3.- KOPP, R.E., LISA, J., MENDELSON, J., PERNICK, B. STONE, H. & WOHLERS, R.: "The use of coherent optical processing techniques for automatic screening of cervical cytologic samples". J. Histochem. Cytochem., 22, pp. 598, (1974).
Ibid: 24, pp. 122, (1976).
- 4.- PERNICK, B., WOHLERS, M.R. & MENDELSON, J.: "Paraxial analysis of light scattering by biological cells in a flow system". Applied Optics, 17, pp. 3205, (1978).
- 5.- SEGER, G. ACHATZ, M. HEINZE, W. & SINSEL, F.: "Quantitative extraction of morphologic cell parameters from the diffraction pattern". J. Histochem. Cytochem., 25, pp. 707, (1977).
- 6.- VOLKENSHEIN, M.V.: "Byophysics", (Ed. MIR, Moscú, 1983).
Capítulo 10.

CAPITULO 4

DISPOSITIVOS Y RESULTADOS EXPERIMENTALES. COMPARACION CON EL MODELO TEORICO

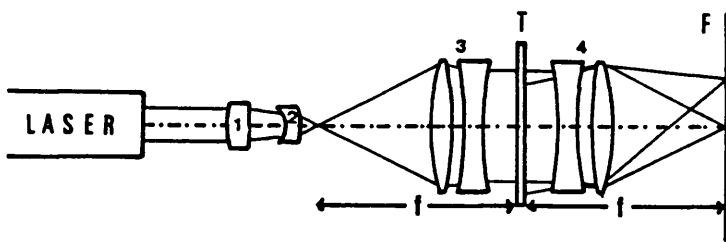
4.1.- INTRODUCCION.

Los resultados presentados en el Capitulo 3 estan basados en la posibilidad de adquirir los datos de la Transformada de Fourier de una célula biológica en tiempo real. En este sentido, se han desarrollado técnicas experimentales que permiten la obtención del patrón de difracción de la célula "in vivo" (Hutzler, 1977). Estas técnicas requieren de la utilización de un sistema de microscopio que, convenientemente manipulado, posibilita trabajar sobre el patrón de difracción formado en el plano focal posterior del objetivo de microscopio.

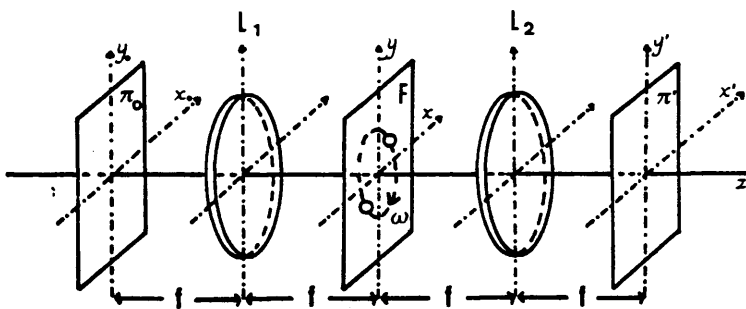
Los resultados experimentales que se describen en este capítulo se han obtenido con una técnica más convencional (Wohlert et al, 1978), analizándose la respuesta en el plano de Fourier de una réplica fotográfica de la célula biológica. El dispositivo utilizado es un difractómetro de alta resolución que permite obtener dos tipos de datos: a) Registro fotográfico del patrón de difracción; b) Señal analógica a la salida del difractómetro.

Para poder comparar los datos experimentales con los obtenidos en el análisis teórico es preciso aproximar el modelo a las condiciones de experimentación. Esto supone calcular la función de transmisión de la réplica fotográfica de la célula teniendo en cuenta por un lado, las características ópticas de la célula biológica y por otro, que el registro fotográfico de la misma se ha realizado con la técnica de contraste de fase.

Obtenidos los valores numéricos de los parámetros que intervienen en la nueva función de transmisión, se aplica el análisis de Fourier de forma análoga a como se ha realizado en el capítulo anterior. Los patrones de difracción teóricos pueden ser comparados con los experimentales, lo que permite extraer conclusiones sobre la validez del modelo teórico considerado.



(a)



(b)

Fig. 6.- Esquema del montaje experimental de:
 (a) Difractómetro.
 (b) Sistema $4f$ de filtrado espacial.

El estudio experimental ha sido realizado en el Departamento de Física de la Universidad de Bremen (RFA). El difractor que se utiliza en la obtención de los resultados experimentales ha sido diseñado y construido en dicho departamento bajo la dirección del Prof. S. Boseck.

4.2.- DESCRIPCION DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.

En la Fig. 6a se esquematiza el dispositivo utilizado. La fuente, tal y como se indica en la figura, es un laser de He-Ne y 5 mW de potencia de salida efectiva. El haz procedente de esta fuente incide sobre un objetivo de microscopio (1), en cuya focal se sitúa un filtro espacial al objeto de filtrar los máximos secundarios del haz difractado. La luz divergente es colimada por el doblete acromático (3), obteniéndose un haz paralelo que ilumina normalmente al objeto. El plano objeto, (T), tiene posibilidades de translación y rotación en planos perpendiculares al eje óptico del difractor. En el plano focal posterior, (F), del doblete acromático (4) se obtiene la figura de difracción del objeto. Los dos dobletes acromáticos son de iguales características y constan de dos lentes de longitudes focales 1500 y 1185 mm respectivamente. La constante del sistema óptico es $1,293 \text{ mm}^{-2}$.

En el plano focal F se coloca una cámara fotográfica que permite registrar el patrón de difracción sobre una película. En este estudio se utiliza una película de alta resolución, en concreto, AGFAPAN 25 (Agfa Gevaert 15 DIN).

Este sistema experimental también presenta la posibilidad de sustituir la cámara fotográfica por un detector consistente en un array de 500 canales con un límite de resolución de 0.12 mm^{-1} . Los datos así obtenidos son procesados y representados gráficamente.

4.3.- DESCRIPCION DEL OBJETO.

En este capítulo, y como ya se ha indicado, se analiza la figura de difracción de células parabásales. Estas células son totalmente transparentes (objetos puros de fase), y el estu-

dio de su figura de difracción se realiza a partir de la imagen que de las mismas se obtiene en un microscopio óptico (Leitz Universal) por el método de contraste de fase.

Las células están inmersas en un medio salino de concentración adecuada para evitar que sufran deformaciones estructurales.

En la Fig. 3 y en la plancha II se muestran las células utilizadas. La primera ha sido obtenida con un aumento de 100x pudiéndose observar el núcleo, citoplasma y membrana de forma diferenciada. Sobre el citoplasma, y dispuestos aleatoriamente, puede distinguirse el paraplasma o conjunto de inclusiones tales como los condriosomas, centrosomas, aparato de Golgi, vacuolas, etc. La plancha II muestra la disposición en empalizada característica de las células epiteliales. Parece pues más interesante trabajar con células individuales, en las que no exista presión ni influencia de otras células sobre sus paredes. Cuando están aisladas tienden de forma natural a adquirir una geometría muy próxima a la circular, como se ha considerado en el modelo teórico anteriormente estudiado.

El material fotográfico que se utiliza para la obtención de los negativos es el indicado en el apartado anterior.

4.4.- DESCRIPCION DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Los resultados que se analizan son de dos tipos atendiendo a como han sido obtenidos. Los primeros corresponden a la figura de difracción que se obtiene cuando el plano objeto está en reposo. Este es el método convencional y lo designaremos por caso estático. Los segundos corresponden al caso en que el plano objeto está girando alrededor del eje óptico con velocidad angular constante. A este caso se le designa por caso dinámico. En la plancha IV pueden compararse los patrones de difracción que se obtienen con uno y otro método para un objeto sintético que presenta simetría circular. El patrón de difracción no se modifica por el hecho de que el objeto este rotando y se aprecia cómo mejora la nitidez del espectro. En el capítulo siguiente se discuten los efectos derivados de la rotación, demostrándose cómo

el régimen dinámico rompe la coherencia temporal, desapareciendo los efectos debidos a ésta, como es el moteado presente en la figura de difracción estática de la plancha IV.

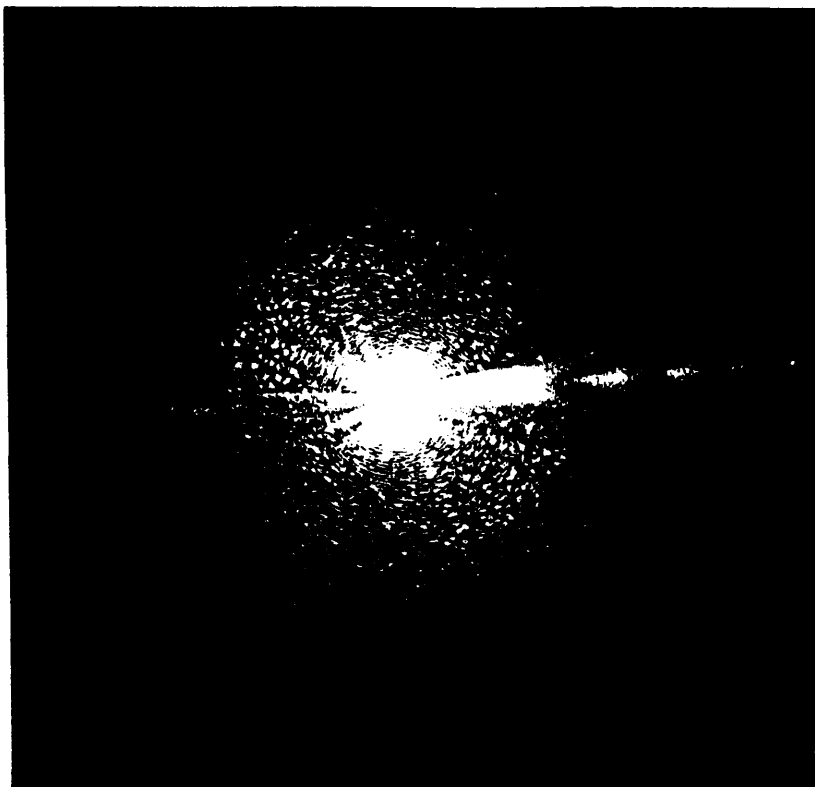
Las planchas IA y IB muestran los espectros obtenidos para la célula de la Fig. 3 con los métodos estático y dinámico respectivamente. En la plancha IA se pueden ver componentes de alta frecuencia sobrepuestas con el patrón de Airy. Estas componentes son debidas al núcleo y a los órganos celulares contenidos en el citoplasma, que, como puede observarse en la Fig. 3, presentan zonas rectas con un cierto paralelismo pudiendo ser asimiladas a una estructura periódica.

Este fenómeno desaparece cuando la célula está rotando como se evidencia en la plancha IB, donde el patrón de difracción es el correspondiente a un objeto con simetría circular. En esta última plancha los tiempos de exposición se han ido aumentando progresivamente. De esta forma es posible ver los órdenes de difracción próximos al máximo central cuando el tiempo de exposición es grande ($t > 1''$), mientras que los asociados a frecuencias más altas aparecen para tiempos menores ($t < 1''$). El máximo central satura mucho la película creando un halo que impide la visión clara de los anillos correspondientes a frecuencias más bajas. La unidad de tiempo de exposición tomada en la realización de la cuña es $15''$.

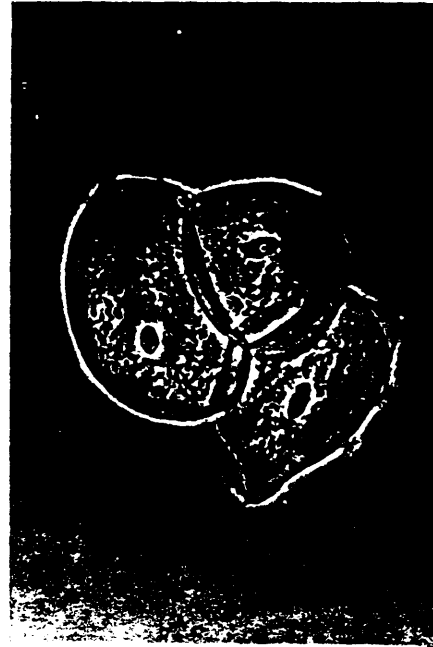
En la plancha III se muestra el patrón de difracción que se obtiene para el conjunto de células en empalizada. La heterogeneidad en tamaños y formas hace que en lugar de reforzarse la figura de difracción asociada a una sola célula, se obtenga un espectro promedio del cual no es posible extraer información completa sobre las características morfológicas de una individual.

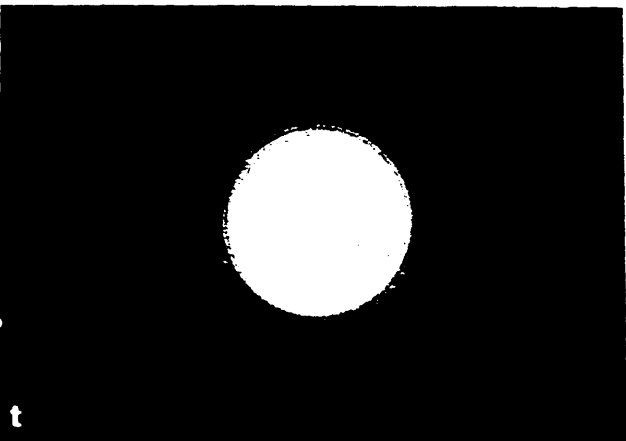
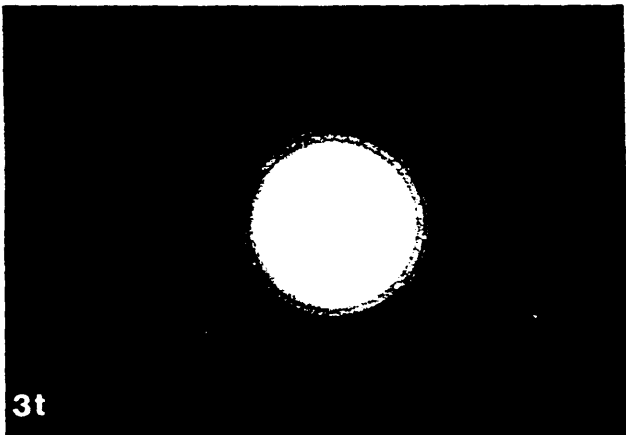
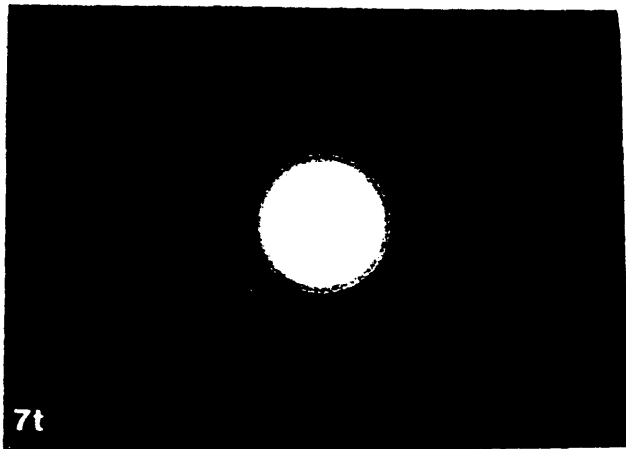
En las Figs. 7, 8 y 9 se muestran los difractogramas obtenidos con el detector descrito en el apartado 4.1, del negativo de la Fig. 3.

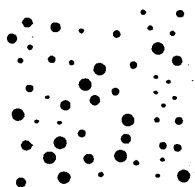
El patrón de difracción de la Fig. 7 corresponde al caso en que la célula tiene sus dimensiones mayores orientadas de forma paralela al eje x, mientras que el de la Fig. 8 se ha obtenido cuando son paralelos al eje y. El espectro de la Fig. 9 se



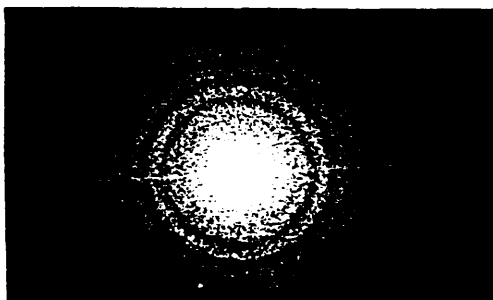
PLANCHA 1A



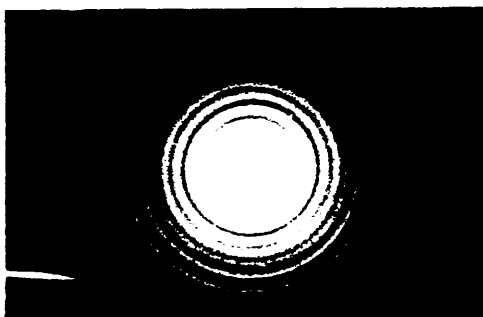




a) Objeto estadístico formado por círculos de diferente diámetro.



b) Patrón de difracción estático



c) Patrón de difracción dinámico

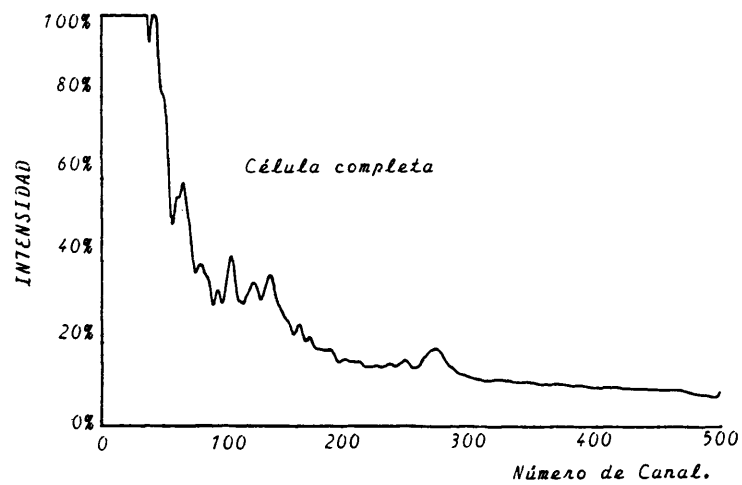
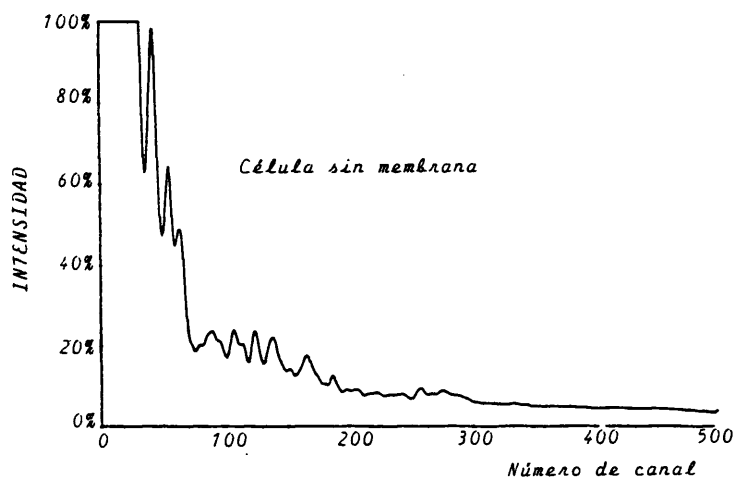


Fig. 7.- Diffractogramas de la célula cuando está orientada paralelamente al eje x.
 (a) con el diafragma de 5 mm.
 (b) con el diafragma de 10 mm.

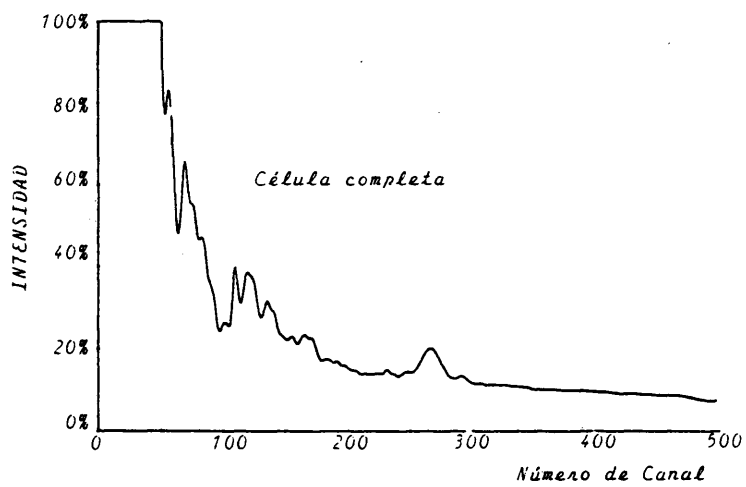
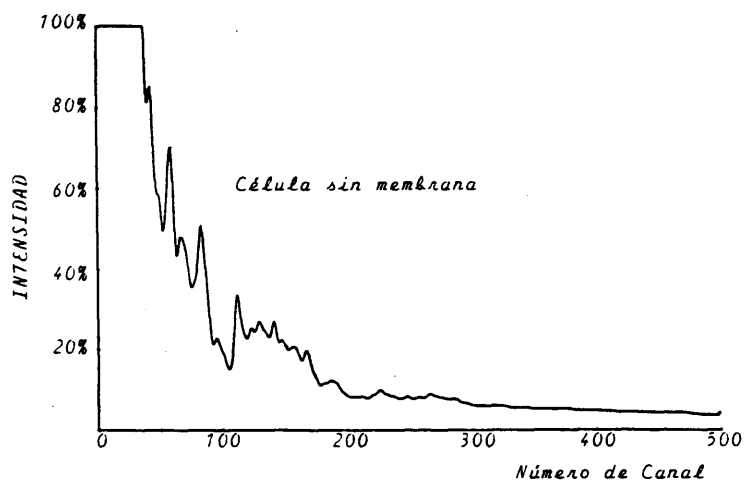


Fig. 8.- Difractogramas de la célula cuando está orientada paralelamente al eje y .
 (a) con el diafragma de 5 mm.
 (b) con el diafragma de 10 mm.

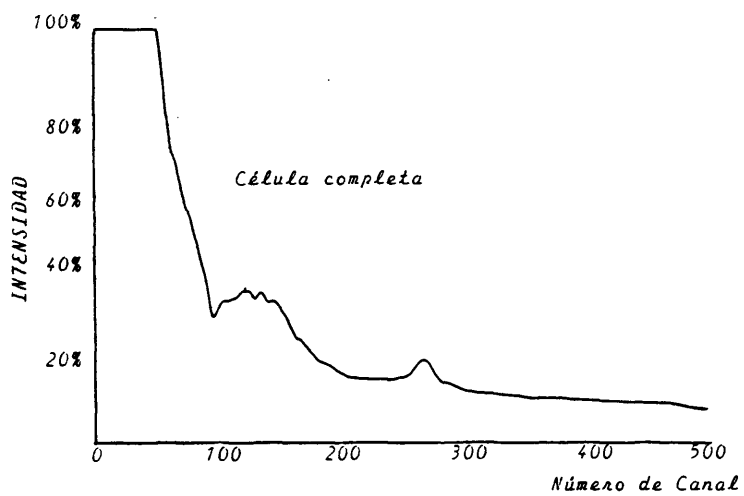
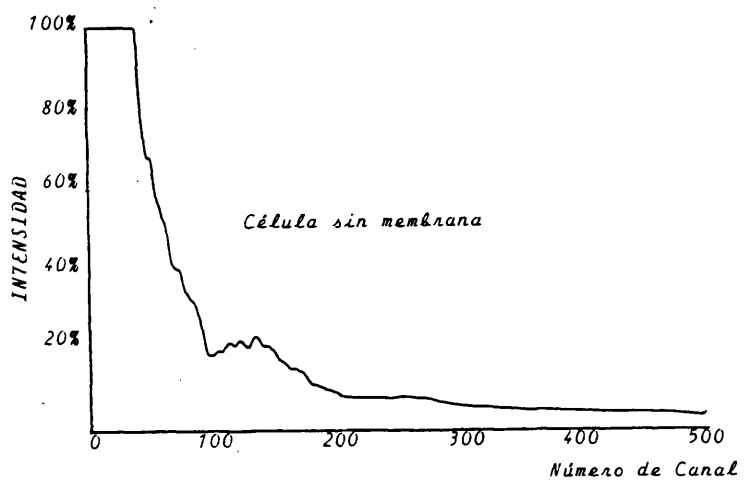


Fig. 9.- Difractogramas de la célula cuando está girando alrededor del eje óptico.
 (a) con el diafragma de 5 mm.
 (b) con el diafragma de 10 mm.

obtiene cuando el objeto esta sometido a un regimen dinámico. En todas ellas se muestra la distribución de intensidad en dos situaciones distintas. Las gráficas designadas por (a) se obtienen colocando en el plano objeto un diafragma de 5 mm de diámetro y en las designadas por (b), el tamaño es de 10 mm. Con este último, la membrana queda diafragmada y por tanto el espectro que se obtiene está relacionado con las estructuras interiores de la célula.

Dada la complejidad que presenta el objeto es difícil relacionar las frecuencias a las que aparecen los máximos con los detalles que éste presenta. No obstante tanto en los resultados de la Fig. 7 como en los de la 8, el primer máximo se produce siempre en 1.492 mm^{-1} . También es destacable que cuando se utiliza el diafragma de 5 mm no aparece el máximo correspondiente a 9.5 mm^{-1} . De aquí podría deducirse que esta frecuencia está relacionada con la membrana celular, eliminada cuando se utiliza el diafragma de menor diámetro.

En la Tabla I se dan los valores de las frecuencias espaciales de los máximos comunes a todos los patrones de difracción obtenidos. De esta relación se deduce que hay una frecuencia fundamental, que corresponde a la diferencia de frecuencias entre máximos cuyo valor es 0.477 mm^{-1} .

4.5.- COMPARACION CON LOS RESULTADOS TEORICOS.

4.5.1.- Cálculo de la función de transmisión asociada a una transparencia.

La función de transmisión compleja de una transparencia en un sistema óptico coherente es (Cathey, W.T., 1974):

$$t(r,\theta) = \sqrt{\tau_n(r,\theta)} e^{i\zeta(r,\theta)} \quad (4.1)$$

donde $\tau_n(r,\theta)$ representa la transmitancia en intensidad de la transparencia revelada. ζ es la fase que introduce la película como consecuencia de las variaciones de espesor que se producen al ser expuesta y revelada. Con el subíndice n se indica que la función de transmisión se define para el negativo de la película.

La transmitancia en intensidad del film está relacionada con la intensidad incidente durante la exposición en la forma:

$$\tau_n = k_n \tau_0^{-\gamma_n} \quad (4.2)$$

donde k_n y γ_n dependen del tipo de película. Ambos se determinan a través de la curva densidad óptica - logaritmo de la exposición o curva H&D (Cathey, W.T., 1974). La pendiente de la zona lineal de la curva es el factor γ . k_n es una constante positiva e igual a $10^{D_0} T^{-\gamma_n}$, siendo D_0 el punto de intersección de la zona lineal con el eje de ordenadas y T el tiempo de exposición.

La amplitud de la función de transmisión, $t(r, \theta)$, queda determinada si se conoce la intensidad que llega a la película durante la exposición. En este caso los negativos han sido realizados en un microscopio óptico con la técnica de contraste de fase, ya que el objeto es de fase. En consecuencia, la función de transmisión de la célula será la expresada en la Eq. (2.17). Las fases ϕ_N, ϕ_C y ϕ_M , correspondientes a cada zona de la célula, son debidas a las diferencias entre los índices de refracción de cada región de la célula y el medio. Se considera que estas fases son constantes y muy pequeñas.

La técnica de contraste de fase (Zernike, F., 1935), consiste en colocar en el plano focal posterior del objetivo de microscopio una lámina que intercepta el haz no difractado por el objeto, retardándolo o adelantándolo sobre la luz difractada por el mismo. Se demuestra que la intensidad que llega al plano imagen es proporcional a las diferencias de fase estructurales del objeto. En el caso concreto que se está estudiando será:

$$\tau_0(r) = 1 \pm \begin{cases} 2 \phi_N & 0 \leq r \leq d_N/2 \\ 2 \phi_C & d_N/2 < r \leq d_C/2 \\ 2 \phi_M & d_C/2 < r \leq d_T/2 \end{cases} \quad (4.3)$$

suponiendo que la lámina no absorbe luz. Con esta definición τ_0 depende solamente de la variable radial r . El signo depende de si la lámina retarda o avanza el haz directo. Sustituyendo esta última ecuación en (4.1) se obtiene que:

$$t(r, \theta) = k_n^{\frac{1}{2}} \left[1 \pm \begin{pmatrix} 2 \phi_N \\ 2 \phi_C \\ 2 \phi_M \end{pmatrix}^{-\gamma_n/2} \right] \cdot e^{i\zeta(r, \theta)} \quad \begin{cases} 0 \leq r \leq d_N/2 \\ d_N/2 \leq r \leq d_C/2 \\ d_C/2 \leq r \leq d_T/2 \end{cases} \quad (4.4)$$

En el plano de difracción B del dispositivo descrito en el Apartado 4.2, la distribución de amplitud de difracción asociada a esta función de transmisión será:

$$\psi(r, \theta) = (1/i\lambda f) \exp(ikf) \exp(ikr_0^2/2f) \text{TF} \{t(r, \theta)\} \quad (4.5)$$

donde TF designa la Transformada de Fourier.

Teniendo en cuenta las relaciones entre la operación de convolución y la Transformada de Fourier (Papoulis, A., 1968).

$$\psi(r_0, \theta) = (1/i\lambda f) \exp(ikf) \exp(ikr_0^2/2f) \text{TF}\{t_0(r)\} * \text{TF}\{e^{i\zeta(r, \theta)}\} \quad (4.6)$$

donde $t_0(r)$ representa los términos que multiplican a la exponencial en la Eq. (4.4).

La película utilizada se ha analizado en un interferómetro Mach-Zehnder concluyéndose que las variaciones de fase a que da lugar el film modifican, de forma poco significativa, el espectro en la zona de altas frecuencias. Por tanto, en la Eq. (4.6) podemos despreciar la Transformada de Fourier del término de fase al considerarla equivalente a una δ -Dirac, con lo cual, la amplitud de difracción solo dependerá de la variable radial r_0 del plano de Fourier y, por lo tanto, la Transformada de Fourier puede sustituirse por la Transformada de Bessel-Fourier. Teniendo en cuenta esto, se opera en la Eq. (4.6) llegando a:

$$\psi(r_0) = (1/i\lambda f) \exp(ikf) \exp(ikr_0^2/2f) 2\pi k_n^{\frac{1}{2}} \sum_{j=1}^3 A_j(r_0) \quad (4.7)$$

siendo:

$$A_1(r_0) = \left\{ (1 \pm 2\phi_N)^{-\gamma_n/2} - (1 \pm 2\phi_C)^{-\gamma_n/2} \right\} \frac{d_N^2}{4} \frac{J_1(\pi \rho d_N)}{\pi \rho d_N} \quad (4.8)$$

$$A_2(r_0) = ((1 \pm 2\phi_C)^{-\gamma_n/2} - (1 \pm 2\phi_M)^{-\gamma_n/2}) \frac{d_C^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_C)}{\pi\rho d_C} \quad (4.9)$$

$$A_3(r_0) = (1 \pm 2\phi_M)^{-\gamma_n/2} \frac{d_T^2}{4} \frac{J_1(\pi\rho d_T)}{\pi\rho d_T} \quad (4.10)$$

las amplitudes de difracción del núcleo, citoplasma y membrana, respectivamente.

4.5.2.- Resultados numéricos.

Con objeto de establecer comparaciones entre los resultados experimentales y los resultados obtenidos con el modelo teórico propuesto, a partir de estas últimas ecuaciones se evalúa la distribución de intensidad de difracción.

Los valores dados a los parámetros en este cálculo, medidos en un microscopio comparador, son los siguientes:

- Diámetro del núcleo: $d_N = 1.332 \pm 0.001$ mm
- Diámetro del citoplasma: $d_C = 6.882 \pm 0.001$ mm
- Diámetro total: $d_T = 7.558 \pm 0.001$ mm

que corresponden a las dimensiones promedio de la célula mostrada en la Fig. 3.

Los valores de ϕ_N , ϕ_C y ϕ_M se obtienen midiendo la transmisión de las distintas partes de la célula en el negativo de la Fig. 3 con un microscopio preparado para medidas fotométricas (Amplival Zeiss-Jena). Las medidas se han realizado asignando al citoplasma la máxima transmisión, lo cual significa que ϕ_C es el nivel de referencia elegido. Sustituyendo en la Eq. (4.4) se obtiene que:

$$k_n = 0.265$$

y, por lo tanto:

$$\phi_N - \phi_C = 0.334 \text{ rad.}$$

$$\phi_M - \phi_C = 0.440 \text{ rad.}$$

que, al mismo tiempo, supone considerar que $\phi_N > \phi_C$ y que $\phi_M > \phi_C$, lo que significa que la lámina utilizada en el contraste de fase avanza, en fase, el haz directo respecto del difractado.

El factor γ de la película se calcula realizando una cu
ña densitométrica con AGFAPAN 25 y utilizando como revelador REFI
NAL y 6.5 minutos de revelado. De esta forma se ha determinado un
factor:

$$\gamma = 0.692109$$

Las constantes del sistema óptico son las indicadas en
el Apartado 4.2.

El intervalo de frecuencias sobre el que se ha hecho el
estudio del espectro coincide con el mostrado en las gráficas ex-
perimentales, es decir, de 0 a 17.5 mm^{-1} .

En las gráficas de la Fig. 10 se muestra la distribución
de intensidad que se obtiene en este caso. Para poder apreciar más
claramente todo el espectro se elimina el máximo central y, de es-
ta forma, se observa cómo la distribución de intensidad presenta
una fuerte oscilación modulada por una señal de baja frecuencia.
Esta última está producida por el núcleo de la célula.

En las gráficas de la Fig. 11 se muestra el espectro que
se obtiene cuando la distribución de intensidad anterior se prome-
dia, integrando en intervalos de 0.12 mm^{-1} . El tamaño del interva-
lo coincide con el límite de resolución asignado al detector utili-
zado para obtener las gráficas de las Figs. 7, 8 y 9. Al igual
que antes, se elimina el máximo central para, así, poder observar
el espectro para frecuencias mayores.

Comparando las gráficas obtenidas con los resultados ex-
perimentales se observa que:

- 1) La proporción en el nivel de energía de las señales
correspondientes a los máximos experimentales es su-
perior al de los teóricos.
- 2) Las diferencias entre las frecuencias asociadas a los
máximos distan 0.48 mm^{-1} , tanto para los valores teó-
ricos como para los experimentales. Vease la Tabla I.
- 3) La desviación entre los valores teóricos y los expe-
rimentales es 0.11 mm^{-1} .

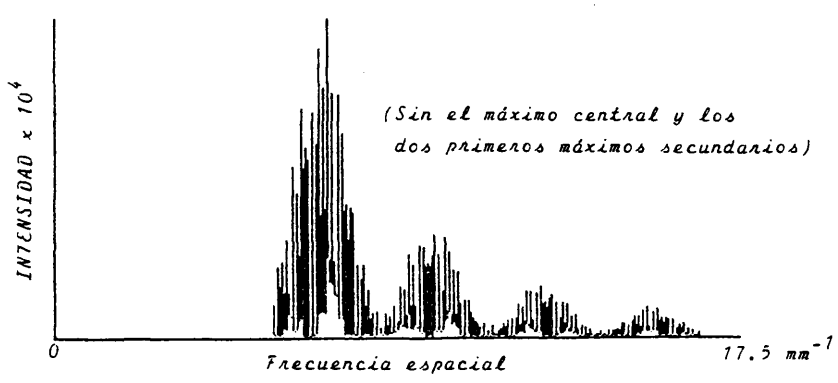
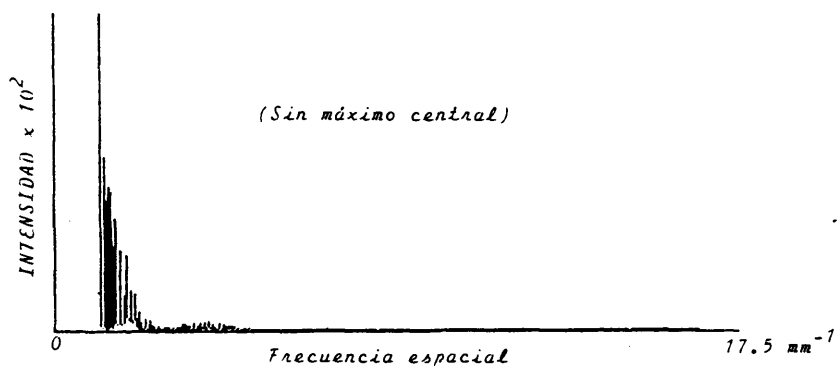


Fig. 10.- Intensidad total de difracción correspondiente a la función de transmisión teórica (Eq. 4.4), asignada a la transparencia.

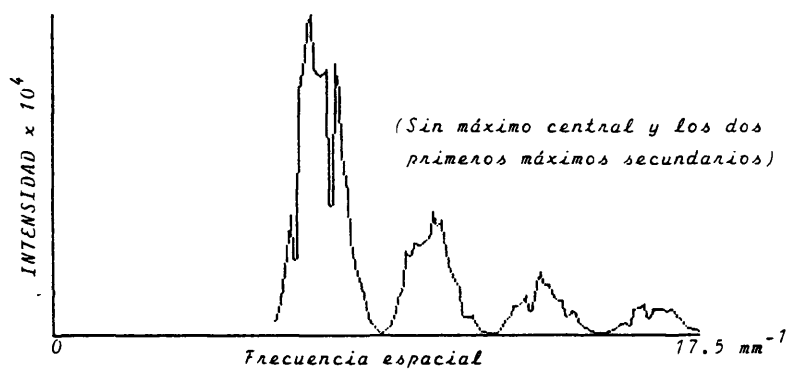
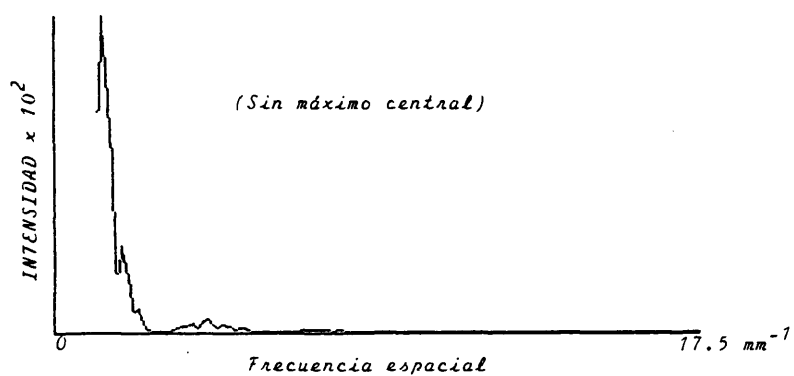


Fig. 11.- Integración de la distribución de intensidad total de difracción de la Fig. 10, en intervalos de 0.12 mm⁻¹.

4) Sobre el patrón de difracción de las planchas IA y IB, también puede observarse una señal de frecuencia alta modulada de forma bastante similar a la obtenida en la Fig. 10.

TABLA I

Frecuencias espaciales, experimentales y teóricas, asociadas a los máximos de intensidad

<u>Frecuencias experimentales</u> (mm ⁻¹)	<u>Frecuencias teóricas</u> (mm ⁻¹)
1.492	1.370
1.970	1.850
2.448	2.330
2.925	2.810
3.403	3.290
3.880	3.770
4.358	4.250
.....
.....
9.672	9.530

Nota: En ambos resultados existen otras frecuencias intermedias.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 4.

- 1.- CATHEY, W.T.: "Optical Information Processing and Holography". (Ed. John Wiley & Sons, N.Y., 1974). Capítulo 6.
- 2.- EIKHORST, W.: "Methoden der Quantitativen Erfassung Metallographisch Entwickelter werkstoffgefüge durch Bildanalytische Kenngrößen". Bremen Universität, Diplm. Grad. Phys., 1980. Diciembre.
- 3.- GOODMAN, J.W.: "Introduction to Fourier Optics" (Ed McGraw-Hill, N.Y., 1968). Capítulo 7.
- 4.- HUTZLER, P.J.S.: "Spatial frequency filtering and its application to microscopy". Applied Optics, 16, No. 8, pp. 2264-76 (1977).
- 5.- PAPOULIS, A.: "Systems and Transforms with application in Optics". (Ed. McGraw-Hill, N.Y., 1968). Capítulo 2.
- 6.- WOHLERS, R. et al.: "Screening of cervical cytological samples using coherent optical processing". Part 2. Applied Optics, 17, No. 1, pp. 35-42 (1978).
Part 3: Ibid, pp. 43-51.
- 7.- ZERNIKE, F.: "Das Phasenkontrastersehen bei der Mikroskopischen Beobachtung". Z. Tech. Phys., 16, pp. 454 (1935).

CAPITULO 5

FILTRADO ESPACIAL DINAMICO. INTERPRETACION Y APLICACIONES

5.1.- INTRODUCCION.

Las técnicas de filtrado de frecuencias espaciales constituyen una herramienta imprescindible en el procesado óptico de la señal (Casasent, 1978). Estas técnicas permiten modificar el espectro de frecuencias espaciales asociado a un determinado objeto y, así, poder obtener una mayor información sobre el mismo.

La aplicación de estas técnicas al estudio de células biológicas tiene por objeto el poder llegar a tener información discriminada de cada parte de las mismas. De acuerdo con esto, en este capítulo se estudian los resultados que se obtienen con filtros diferentes y se pone de relieve que las técnicas de filtrado dinámico son las que presentan mayores ventajas.

Estas técnicas son de reciente desarrollo y consisten, básicamente, en que el filtro se encuentra girando en torno al eje óptico, en el plano de Fourier. En este trabajo el filtro utilizado está constituido por un par de aberturas circulares, de igual diámetro y equidistantes del eje óptico, de forma que cuando está rotando actúa, aproximadamente, como un filtro pasa banda, con la ventaja de que la imagen filtrada es de mayor nitidez. Esto es debido a que el ruido procedente del grano de la película desaparece. Al mismo tiempo se observa un sistema de franjas que tienden a reforzar los contornos del objeto.

Hay que señalar que este método se aplica fundamentalmente a objetos con simetría circular y la célula biológica, como se puso de manifiesto en el Capítulo 4, puede ser considerada como un objeto de estas características.

Debido a que en la bibliografía no se encuentra una descripción matemática detallada, ni una interpretación suficiente de los fenómenos que conlleva el filtrado dinámico, hemos creído necesario dedicar gran parte de este capítulo a profundizar en este

estudio y a proporcionar una explicación satisfactoria del mismo.

No obstante, Powell y Stetson (1965) tratan un problema similar al realizar un análisis interferométrico vibracional por reconstrucción de frente de ondas. En este trabajo se obtiene una respuesta adicional que depende de la función de Bessel de orden cero y primera clase, que podría ser interpretada como una función de modulación que se superpone a la respuesta holográfica. Esta respuesta adicional sería también responsable del sistema de franjas proporcional a la amplitud de vibración del objeto estudiado.

Por otro lado, Vander Lugt (1967) discute el efecto del filtro *jitter*. En su explicación teórica considera que una parte de la señal de salida tiene dependencia temporal, razón por la cual toma promedios temporales. En el trabajo, el autor introduce un proceso gaussiano aleatorio para hacer intervenir el movimiento del filtro.

Los resultados obtenidos en este capítulo (M.L. Calvo, M. Chevalier y S. Boseck, 1984) proporcionan una interpretación satisfactoria, tanto del proceso como de los resultados.

5.2.- TECNICAS DE FILTRADO ESTADICO. DISCUSION Y RESULTADOS EXPERIMENTALES.

En la Fig. 6b se presenta un esquema de un sistema $4f$ de filtrado de frecuencias espaciales.

En el plano π_0 de dicha figura se sitúa un objeto cuya función de transmisión es $t(x_0, y_0)$. En el plano focal posterior F de la lente L_1 se obtiene la Transformada de Fourier del objeto. Sean (x, y) las coordenadas asociadas a dicho plano y (f_x, f_y) las frecuencias espaciales definidas como: $f_x = x/\lambda f$; $f_y = y/\lambda f$. La lente L_2 , de igual longitud focal que L_1 , forma la imagen filtrada del objeto en el plano imagen π' , donde las coordenadas se denotan por (x', y') .

Sea el filtro utilizado, tal y como muestra la Fig. 6b, un par de aberturas circulares, de radios r_1 y r_2 , situadas, en principio, a diferente distancia del eje óptico. La función filtro

puede escribirse como sigue:

$$H(f_x, f_y) = H_1(f_x, f_y) + H_2(f_x, f_y) \quad (5.1)$$

donde:

$$H_i = \text{circ} \left[\frac{\sqrt{(f_x^2 + f_y^2)}}{r_i} \right] = \delta(f_{x0} - f_{x_i}) \cdot \delta(f_{y0} - f_{y_i}) \quad (5.2)$$

$$i = 1, 2$$

siendo (f_{x0}, f_{y0}) las coordenadas del origen en el plano de Fourier y (f_{x_i}, f_{y_i}) las coordenadas de posición de la abertura i . La función $\text{circ}(\rho)$ se define como:

$$\text{circ}(\rho/r) = \begin{cases} 1 & ; \rho \leq r \\ 0 & ; \rho > r \end{cases}$$

Realizando el producto de convolución indicado en la Eq. (5.2) se obtiene:

$$H_i = \iint_{-\infty}^{\infty} \text{circ} \left[\frac{\sqrt{\zeta^2 + \eta^2}}{r_i} \right] \delta(f_{x0} - f_{x_i} - \zeta) \delta(f_{y0} - f_{y_i} - \eta) d\zeta d\eta \quad (5.3)$$

donde por (ζ, η) se denotan las variables mudas que intervienen en el producto de convolución. Por tanto:

$$H_i(f_x, f_y) = \text{circ} \left(\frac{\sqrt{(f_{x_i} - f_{x0})^2 + (f_{y_i} - f_{y0})^2}}{r_i} \right) \quad (5.4)$$

Nota: En todo lo que sigue denotaremos con símbolos del alfabeto griego a las variables mudas sobre las cuales se realizan las operaciones de convolución.

La respuesta g que se obtiene en el plano imagen es:

$$g = \text{TF}^{-1}(\text{TH}) \quad (5.5)$$

donde con TF^{-1} se designa la Transformada de Fourier inversa (Cathay, W.T., 1974) y con T , la Transformada de Fourier asociada al objeto.

Sustituyendo en (5.5) la expresión (5.1), se tiene que:

$$TF^{-1}(TH) = TF^{-1}(T(H_1 + H_2))$$

y considerando la linealidad de la Transformada de Fourier,

$$TF^{-1}(TH) = TF^{-1}(TH_1) + TF^{-1}(TH_2)$$

El Teorema de convolución (Papoulis, A., 1968) nos permite escribir esta última expresión de la siguiente manera:

$$g = TF^{-1}(TH) = t * h_1 + t * h_2 \quad (5.6)$$

siendo $h_i = TF^{-1}H_i$, y:

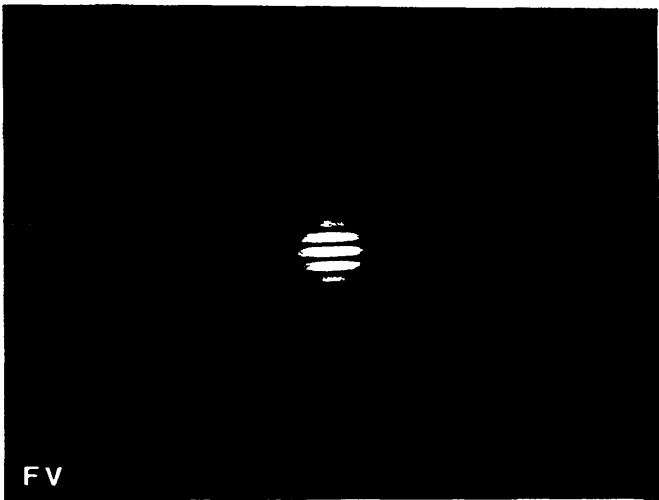
$$t * h_i = \iint_{-\infty}^{\infty} t(\zeta, \eta) h_i(x' - \zeta, y' - \eta) d\zeta d\eta$$

La intensidad en el plano imagen se obtiene mediante la expresión:

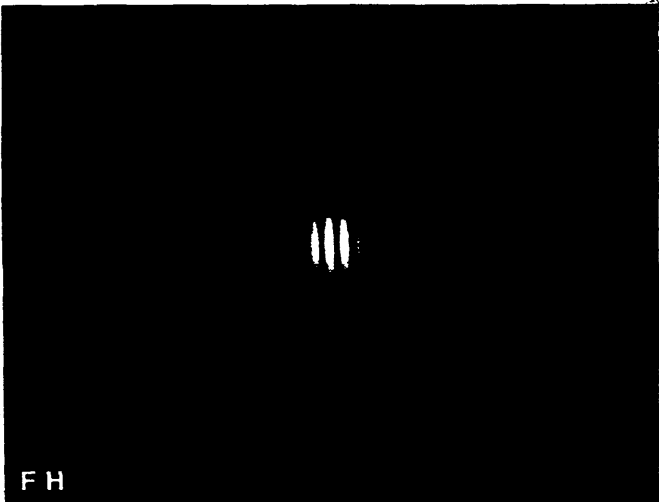
$$|g|^2 = |t * h_1|^2 + |t * h_2|^2 + 2 \operatorname{Re} ((t * (h_1 + h_2))(t * (h_1 + h_2))^*) \quad (5.7)$$

En esta última expresión los dos primeros términos de la derecha representan la respuesta cuadrática de cada uno de los filtros H_1 y H_2 , y el tercero es un término interferencial. Cuando las dos aberturas circulares de la función filtro son de radios iguales y se encuentran a la misma distancia del eje óptico, los resultados que se obtienen son los indicados en la Plancha VI. En la Plancha V se muestra el patrón de difracción típico asociado a las dos aberturas. La diferencia entre las figuras que aparecen en las planchas radica en la orientación de la línea que une los centros de los agujeros. En la Fig. FV, ésta es paralela al eje Y, y en la FH, paralela al eje X. El motivo de incluir estas figuras es el de facilitar la comprensión de los resultados que se muestran en la Plancha VI y siguientes.

En la Plancha VI se observa que las franjas originadas por el término interferencial están moduladas por las variaciones estructurales del objeto. Las imágenes filtradas de esta forma

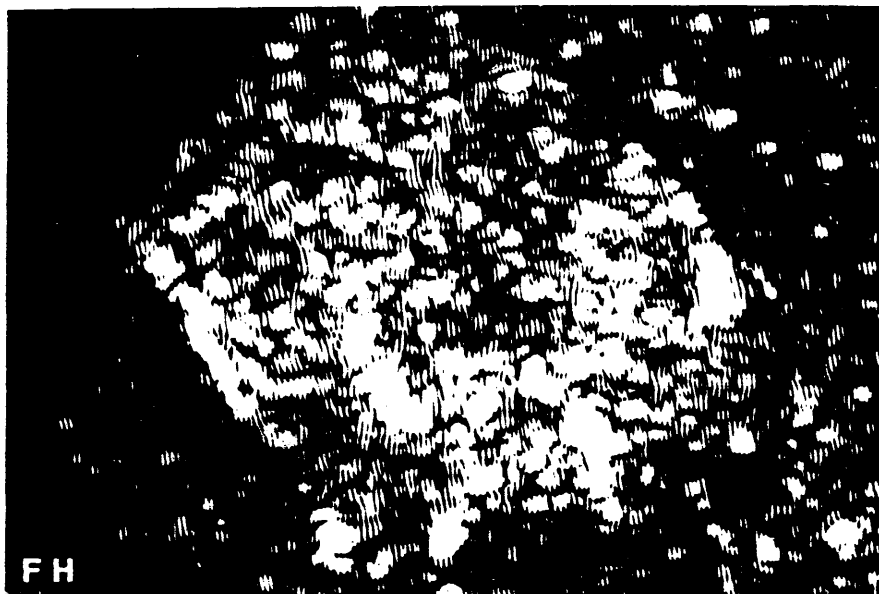
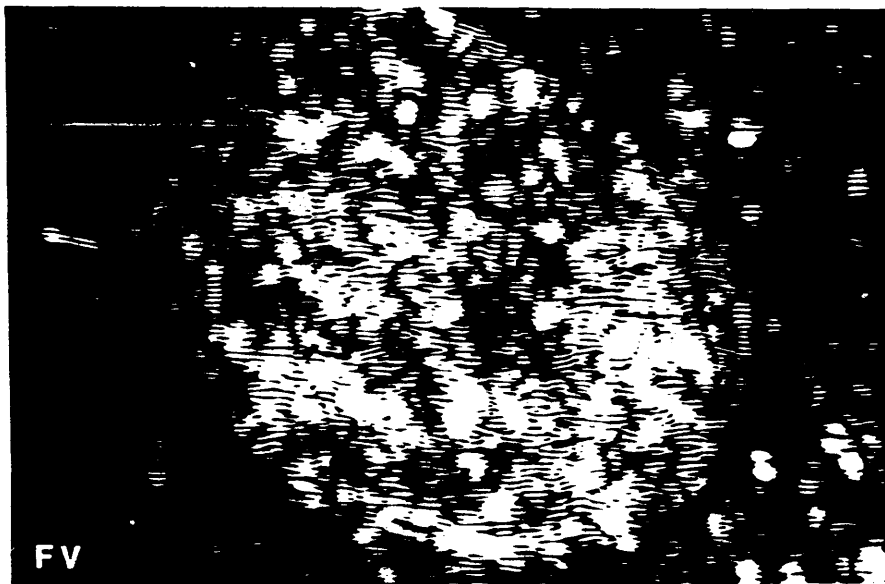


FV



FH

PLANCHA V



PLANCHA VI

pierden nitidez y solamente las líneas del contorno que coinciden con la orientación de las franjas se refuerzan, aunque muy debilmente.

5.3.- FILTRADO DE FRECUENCIAS ESPACIALES DINAMICO. DESCRIPCION MATEMATICA.

El régimen dinámico consiste en que el plano de filtrado rota alrededor del eje óptico con una frecuencia angular ω . Por consiguiente, la función H_1 definida en la Eq. (5.2) presentará ahora una dependencia temporal de la forma:

$$H_1 = \iint_{-\infty}^{\infty} d\zeta d\eta \text{ circ } \left\{ (\zeta^2 + \eta^2)^{\frac{1}{2}} / r_1 \right\} \delta(f_{x_0} - \zeta - f'_{x_1} \cos \omega t) \cdot \delta(f'_{y_0} - \eta - f'_{y_1} \sin \omega t) \quad (5.8)$$

siendo ahora:

$$f_{x_1} = f'_{x_1} \cos \omega t \quad (5.9)$$

$$f_{y_1} = f'_{y_1} \sin \omega t \quad (5.10)$$

las frecuencias espaciales de posición de las aberturas con dependencia temporal.

La respuesta que se obtiene en el plano imagen se estudia en dos casos diferentes: el primero, suponiendo que el registro es coherente y el segundo, suponiendo que es incoherente.

5.3.1.- Registro coherente:

Considerar que el registro es coherente significa que en el plano π' tendremos:

$$g = | \langle t = h \rangle |^2$$

ya que ahora es preciso tomar promedios temporales. Partiendo de los resultados del Apartado anterior tendremos que:

$$\langle t = h \rangle = \langle t = h_1 \rangle + \langle t = h_2 \rangle \quad (5.11)$$

donde, al igual que antes, h , h_1 y h_2 son las Transformadas de Fourier inversas de H , H_1 y H_2 respectivamente.

Teniendo en cuenta la Eq. (5.2) y la definición de promedio temporal:

$$\langle t \cdot h_j \rangle = (t \cdot TF^{-1}(\text{circ}(\sqrt{\xi^2 + \eta^2}/r_j)) \cdot (1/T) \int_{\tau_0}^{\tau_0+T} d\tau e^{2\pi i R_j \cos \omega(\tau - \tau_0)} e^{-2\pi i \nu_0 \tau} \quad (5.12)$$

donde:

$$R_j = ((x' - \chi)^2 f_{x_j}^2 + (y' - \mu)^2 f_{y_j}^2)^{1/2}$$

El valor final de esta integral depende del comportamiento del término exponencial $\exp(-2\pi i \nu_0 \tau)$. Cuando este término, que representa la oscilación de la onda incidente, oscile mucho más rápidamente que el término exponencial $\exp(2\pi i R_j \cos \omega \tau)$, procedente del filtrado, el integrando tenderá a cero. Este es el caso más probable, ya que una onda de luz visible oscila con una frecuencia ν_0 muy alta, del orden de 10^{14} Hz. Parece aceptable suponer que la frecuencia de rotación del filtro será siempre mucho menor que la de oscilación de la luz laser, por lo que con un sistema de filtrado dinámico el registro coherente se destruye y no puede ser detectado.

5.3.2.- Registro incoherente.

En este caso, la respuesta en el plano imagen es:

$$\langle |t \cdot h|^2 \rangle = \langle |t \cdot h_1|^2 \rangle + \langle |t \cdot h_2|^2 \rangle + \langle (t \cdot h_1)(t \cdot h_2)^* \rangle + \langle (t \cdot h_1)^*(t \cdot h_2) \rangle \quad (5.13)$$

Si tenemos en cuenta la Eq. (5.12), al tomar el módulo al cuadrado de $(t \cdot h)$, se cancela el término exponencial $\exp(-2\pi i \nu_0 \tau)$. Esto significa que el registro incoherente nunca se anula. Por otro lado, este registro no dependerá del periodo de oscilación de la onda incidente.

El producto de convolución $(t \cdot h_j)$ puede escribirse de forma simplificada como sigue:

$$t \cdot h_j = \iint_{-\infty}^{\infty} d\chi d\mu \omega_j(\chi, \mu, x', y') e^{2\pi i R_j \cos(\omega T - \alpha_j)} \quad (5.14)$$

donde:

$$\omega_j(\chi, \mu, x', y') = t(x_0, y_0) \iint_{-\infty}^{\infty} d\zeta d\eta \operatorname{circ}((\zeta^2 + \eta^2)^{\frac{1}{2}}/r_j) \cdot e^{2\pi i ((x' - \chi)\zeta + (y' - \mu)\eta)} \quad (5.15)$$

y, por tanto, contiene toda la dependencia espacial del producto.

Hay que destacar que el término exponencial en la Eq. (5.14) representa una respuesta periódica que se obtendrá en el plano imagen π' . Entonces:

$$\langle |t = h_j|^2 \rangle = (1/T) \int_0^T d\tau |t = h_j|^2 \quad (5.16)$$

Sustituyendo las Eqs. (5.14) y (5.15) en (5.16) y desarrollando cálculos en los que se tiene en cuenta la invariancia temporal en la traslación y las propiedades de las funciones de Bessel de primera clase, la Eq. (5.16) puede escribirse de la siguiente manera:

$$\langle |t = h_j|^2 \rangle = \iiint d\chi d\mu d\chi' d\mu' \omega_j(\chi, \mu, x', y') \omega_j^*(\chi', \mu', x', y') \cdot \left[J_0(2\pi R_j) J_0(2\pi R_i') + 2 \left(\sum_{k=1}^{\infty} J_{2k}(2\pi R_j) J_{2k}(2\pi R_i') \cos(2k(\alpha_i' - \alpha_j)) + \sum_{k=0}^{\infty} J_{2k+1}(2\pi R_j) J_{2k+1}(2\pi R_i') \cos((2k+1)(\alpha_i' - \alpha_j)) \right) \right] \quad (5.17)$$

donde $i, j = 1, 2$

Así pues, la respuesta en intensidad de cada filtro depende de un término que oscila y que está expresado por una serie de funciones de Bessel. Considerando las propiedades de las funciones de Bessel esta última expresión puede simplificarse (Apéndice E) resultando:

$$\langle |t = h_j|^2 \rangle = \iiint d\chi d\mu d\chi' d\mu' \omega_j(\chi, \mu, x', y') \omega_j^*(\chi', \mu', x', y') \cdot J_0 \left\{ 2\pi \left(f_{x_j}^2 (\chi - \chi')^2 + f_{y_j}^2 (\mu - \mu')^2 \right)^{\frac{1}{2}} \right\} \quad (5.18)$$

Comparando este resultado con el obtenido en el caso es tático, se observa la aparición de un producto de convolución en tre la función de Bessel de orden cero y la función ω_j . El argumento de J_0 depende de las frecuencias espaciales con dependencia temporal (f'_{x_j}, f'_{y_j}) y la función ω_j solo tiene dependencia espacial.

5.3.3.- Expresión final del término de interferencia de la Eq.(5.13).

Operando de forma análoga a como se ha hecho en el apar tado anterior, el término interferencial de la Eq. (5.13) será:

$$\langle (t = h_1)^n (t = h_2)^n \rangle = \iiint \int d\chi \, d\mu \, d\chi' \, d\mu' \, \omega_1^n(\chi', \mu', x', y') \omega_2(\chi, \mu, x', y') J_0(u_{12}) \quad (5.19)$$

El argumento de la función de Bessel es:

$$u_{12} = 2\pi(R_1'^2 + R_2'^2 - 2 R_1' R_2' \cos(\alpha_1' - \alpha_2'))^{\frac{1}{2}} \quad (5.20)$$

y:

$$\langle (t = h_1) (t = h_2)^n \rangle = \iiint \int d\chi \, d\mu \, d\chi' \, d\mu' \, \omega_1(\chi, \mu, x', y') \omega_2^n(\chi', \mu', x', y') J_0(u_{21}) \quad (5.21)$$

con:

$$u_{21} = 2(R_1^2 + R_2'^2 - 2 R_1 R_2' \cos(\alpha_1 - \alpha_2'))^{\frac{1}{2}} \quad (5.22)$$

El término total de interferencia se obtiene sumando las Eqs. (5.19) y (5.21). Teniendo en cuenta las siguientes relaciones:

$$\begin{aligned} R_1^2 + R_2'^2 &= (x' - \chi)^2 f_{x_1}'^2 + (y' - \mu)^2 f_{y_1}'^2 + \\ &+ (x' - \chi)^2 f_{x_2}'^2 + (y' - \mu)^2 f_{y_2}'^2 \end{aligned} \quad (5.23)$$

y:

$$R_1 R_2' \cos(\alpha_2' - \alpha_1) = f_{x_1}' f_{x_2}' (x' - \chi) (x' - \chi') + f_{y_1}' f_{y_2}' (y' - \mu) (y' - \mu') \quad (5.24)$$

y, por tanto, el argumento de la función de Bessel de la Eq.(5.21) será:

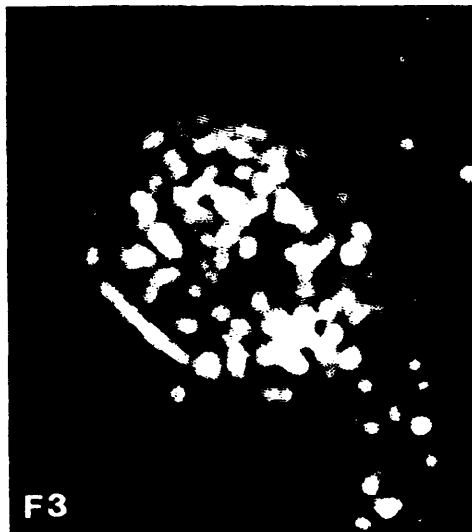
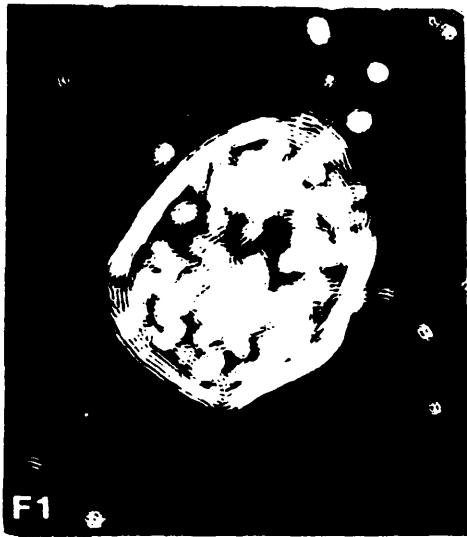
$$u_{21} = R_1^2 + R_2'^2 - 2 R_1 R_2' \cos(\alpha_1' - \alpha_1) = \left[(x' - \chi) f_{x_1}' - (x' - \chi') f_{x_2}' \right]^2 + \left[(y' - \mu) f_{y_1}' - (y' - \mu') f_{y_2}' \right]^2 \quad (5.25)$$

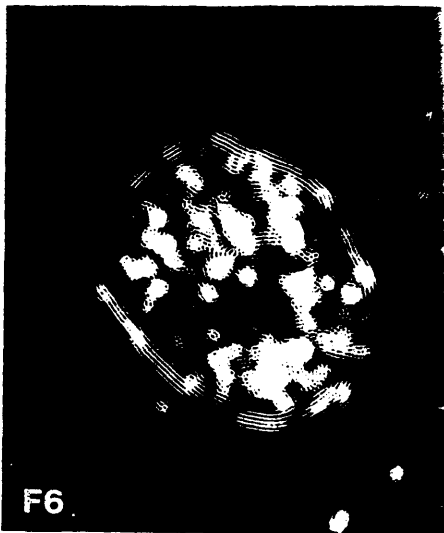
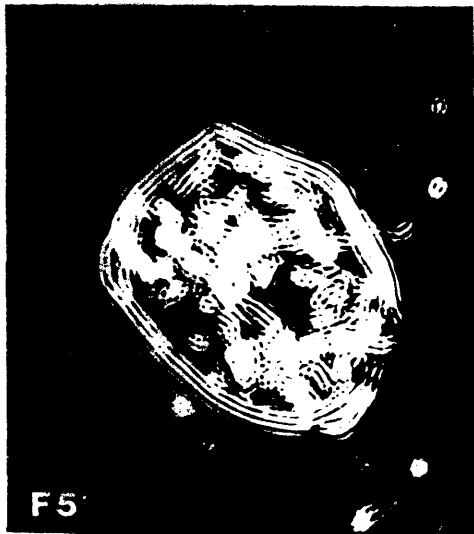
Esta última expresión demuestra que el argumento de J_0 es función de las frecuencias espaciales con dependencia temporal y de las variables (x', y') asociadas al plano imagen π' . El término interferencial, al igual que los términos cuadráticos, da lugar a una convolución temporal entre J_0 y las funciones con dependencia espacial $\omega_1 \omega_j'$, cuyos efectos se observan en el plano imagen.

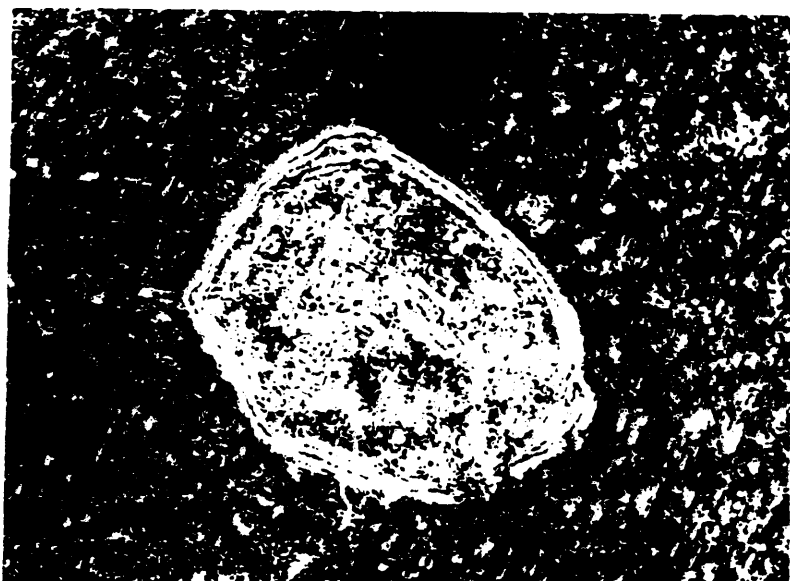
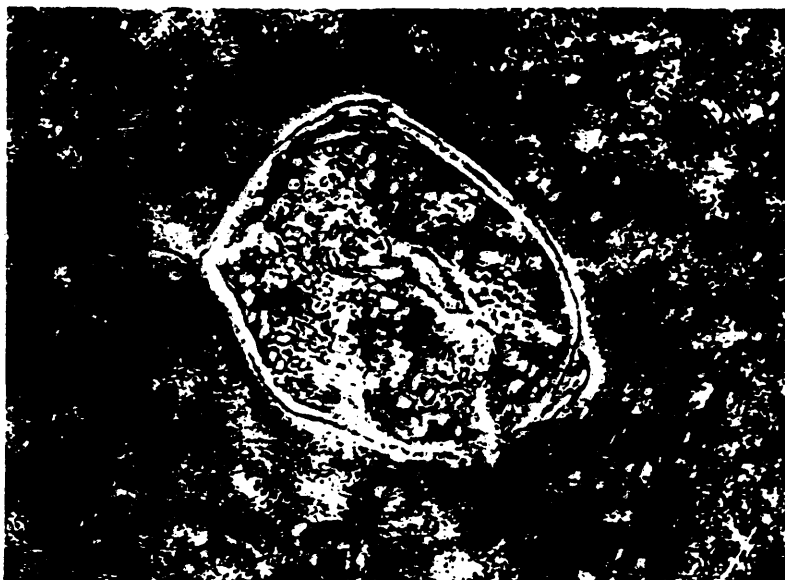
5.3.4.- Resultados experimentales.

Las planchas VII y VIII muestran las imágenes filtradas dinámicamente de la célula de la Fig. 3. Los filtros utilizados son de las mismas características que los descritos en el apartado 5.2, y, cuando giran, pueden asimilarse a un filtro pasa-banda. Los registros que se presentan en estas planchas se han obtenido variando las dimensiones de las aberturas del filtro y su distancia al eje óptico. En la Tabla I se muestran las características de cada uno de los filtros utilizados.

En todos los casos el núcleo de la célula no aparece, mientras que la membrana y los órganos celulares presentes en el citoplasma tienen los bordes realzados. Hay que señalar que algunas de las estructuras que aparecen en las imágenes filtra-







das pueden ser debidas bien a impurezas presentes en la preparación, bien a polvo en el sistema óptico.

TABLA I

<u>FILTRO</u>	<u>RANGO DE FRECUENCIAS</u> (mm^{-1})	<u>DISTANCIA AL CENTRO</u> (mm)
F1	2.3 - 4.9	3.0
F2	3.0 - 6.7	3.0
F3	6.1 - 8.7	6.0
F4	6.5 - 10.4	6.0
F5	1.6 - 4.2	3.5
F6	3.5 - 6.1	4.0
F7	5.5 - 8.1	5.5
F8	7.4 - 10.0	6.0

Si comparamos estos resultados con los obtenidos en el caso estático, observamos cómo las imágenes filtradas dinámicamente presentan una mayor nitidez y, al realizarse los bordes, una mayor definición.

En la plancha IX se muestran las imágenes filtradas de la célula con dos filtros paso alto de 1 y 3 mm respectivamente. En ambas es posible ver la inversión de contraste, fenómeno característico de este tipo de filtros. En las imágenes siguen observándose todas las partes características de la célula y debido a ello este método no resulta interesante para obtener información diferenciada.

5.4.- CONCLUSIONES:

Los resultados experimentales ponen de relieve que cuando se utiliza la técnica de filtrado dinámico, sobre las imágenes es posible observar un fenómeno interferencial. En la bibliografía no se encuentra una explicación satisfactoria a este fenómeno y, por este motivo, se realiza un desarrollo temático que permite interpretar los resultados experimentales. Las conclusiones obtenidas con este estudio son:

- La respuesta coherente se destruye.
- La respuesta detectada corresponde a un registro incoherente.
- La dependencia temporal de la respuesta en intensidad incoherente produce un término interferencial no nulo que se superpone a las respuestas individuales incoherentes. Este término da lugar a un sistema de franjas cuya anchura depende de la separación entre las aberturas.
- Se observa un reforzamiento del contorno de la célula, así como de los órganos celulares presentes en el citoplasma. Comparando estos resultados con los obtenidos en el caso estático, se aprecia cómo la imagen correspondiente al filtrado dinámico tiene una mayor resolución y nitidez. Esto es debido a que desaparece el ruido procedente del grano de la película.
- Los resultados ponen de manifiesto cómo el método de filtrado dinámico posibilita obtener información diferenciada de las distintas partes del objeto.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 5.

- 1.- ABRAMOWITZ, A. & STEGUN, I.: "Handbook of Mathematical Functions". (Ed. Dover Publications, N.Y., 1972). p. 363.
- 2.- CALVO, M.L., CHEVALIER, M. & BOSECK, S.: ICO - 13 Conference-Digest "Optics in Modern Science and Technology". Sapporo (Japan). 1984. p.p. 256 - 257.
- 3.- CASASENT, D.: "Optical Data Processing Applications". Topics in Applied Physics. (Ed. Springer - Verlag, Berlin, 1978). Vol. 23.
- 4.- CATHEY, W.T.: "Optical Information Processing and Holography". (Ed. John Wiley & Sons, N.Y., 1974). Cap. 1.
- 5.- Papoulis, A.: "Systems and Transforms with Applications in Optics". (Ed. McGraw-Hill, N.Y., 1968). Cap.2.
- 6.- POWELL, R.L. & STETSON, K.A.: "Interferometric Vibration Analysis by Wavefront Reconstruction". J. Opt. Soc. Am., 55, 1593. 1965.
- 7.- VANDER LUGT, A.: "The effects of the Small Displacements of Spatial Filters". Applied Optics, 6, 1221. 1967.

CONCLUSIONES GENERALES

- 1.- Se ha estudiado teóricamente la amplitud del campo transmitido por un medio dieléctrico, ópticamente inhomogéneo y bidimensional en aproximación eikonal. Este estudio permite, al establecer la relación entre campo incidente y campo transmitido; definir la función de transmisión asociada al medio como producto de dos términos, uno de amplitud y otro de fase.
- 2.- Se ha definido un modelo matemático para la función de transmisión de una célula biológica. En este modelo se considera a la membrana de la célula como parte diferenciada del citoplasma, asignándole como coeficiente de atenuación una función parabólica. Con este comportamiento se puede conocer la influencia de esta parte de la célula sobre el patrón de difracción.
- 3.- Se demuestra, a partir de la amplitud tridimensional de scattering en aproximación eikonal, que la sección eficaz total de esparcimiento coincide con la intensidad difractada en régimen de Fraunhofer. Con este resultado, la difracción producida por un objeto bidimensional puede considerarse como un caso particular del scattering de luz.
- 4.- Se ha obtenido la expresión analítica de la amplitud total de difracción asociada a la función de transmisión óptica definida para la célula biológica. Teniendo en cuenta las posibles propiedades ópticas de las células biológicas, se han estudiado distintas aproximaciones en el patrón de difracción.
- 5.- Se han analizado numericamente las expresiones analíticas de la amplitud total y de la distribución de intensidad. Esto ha permitido establecer la influencia de los parámetros (factores de transmisión y fases) en el patrón de difracción.
- 6.- Se ha procesado, utilizando un difractómetro de alta resolución con salida analógica, la transparencia de una célula biológica. Los difractogramas obtenidos han permitido realizar un estudio comparativo con los resultados teóricos, observándose que existe una buena coincidencia entre los valores de las fre

cuencias espaciales asociadas a los máximos teóricos y experimentales. Esto permite asegurar que, al menos, para el tipo de células analizadas experimentalmente, el modelo teórico elegido tiene validez.

- 7.- Se ha desarrollado experimentalmente una técnica de filtrado dinámico de frecuencias espaciales. Al no existir en la bibliografía ninguna descripción matemática adecuada del fenómeno, se ha realizado un estudio que permite poner de manifiesto que el filtrado dinámico destruye el registro coherente y solamente es detectable la señal incoherente. Esta última depende de un término interferencial que da lugar a la aparición de franjas en las imágenes filtradas, que tienden a reforzar los contornos del objeto y de sus componentes.

APENDICE A

ESTUDIO DE LA CONVERGENCIA DE LA SERIE:

$$S(z) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(2k+1) \Gamma(k-1/2)}{\Gamma(k+5/2)} J_{2k+1}(z)$$

Para el estudio de la convergencia de la serie consideraremos que las funciones de Bessel pueden ser sustituidas por una serie en la forma:

$$J_{\nu}(z) = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{(-)^m (z/2)^{(\nu+2m)}}{m! \Gamma(\nu+m+1)}$$

(Abramowitz and Stegun, 1972), dando lugar a:

$$S(z) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(2k+1) \Gamma(k-1/2)}{\Gamma(k+5/2)} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{(-)^m (z/2)^{(2k+1+2m)}}{m! \Gamma(2k+1+m+1)}$$

Tomando valores absolutos en el segundo sumatorio y sacando factor común todos aquellos factores que no dependen del índice, tenemos:

$$|S(z)| < \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(2k+1) \Gamma(k-1/2)}{\Gamma(k+5/2)} (z/2)^{(2k+1)} \cdot \sum_{m=0}^{\infty} \frac{(z/2)^{2m}}{\Gamma(2k+1+m+1) m!}$$

Considerando que $\Gamma(m+1) = m!$, en el denominador del segundo sumatorio tendremos que:

$$\Gamma(2k+1+m+1) = (2k+1+m)!$$

Atendiendo a la siguiente desigualdad:

$$(2k+1+m)! > (2k+1)!$$

tendremos que:

$$\frac{1}{(2k+1+m)!} < \frac{1}{(2k+1)!}$$

Entonces:

$$\begin{aligned} |S(z)| &< \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(2k+1) \Gamma(k-1/2)}{\Gamma(k+5/2)} (z/2)^{(2k+1)} \cdot \\ &\cdot \sum_{m=0}^{\infty} \frac{((z/2)^2)^m}{m! (2k+1)!} = \\ &= \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(2k+1) \Gamma(k-1/2)}{\Gamma(k+5/2)} \cdot \frac{(z/2)^{(2k+1)}}{(2k+1)!} \cdot \\ &\cdot \sum_{m=0}^{\infty} \frac{((z/2)^2)^m}{m!} \end{aligned}$$

Si ahora consideramos el desarrollo en serie de potencias de la función e^x :

$$e^x = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{x^m}{m!}$$

La serie se expresa como:

$$|S(z)| < \left(\sum_{k=0}^{\infty} \frac{(2k+1) \Gamma(k-1/2)}{\Gamma(k+5/2)} \frac{(z/2)^{(2k+1)}}{(2k+1)!} \right) e^{(z/2)^2}$$

que es una serie de potencias. Aplicando cualquiera de los criterios existentes para averiguar el campo de convergencia de una serie de potencias se obtiene que $S(z)$ es convergente para todo valor de z (Boas, M.L., 1966).

APENDICE B

CALCULO DE LA TRANSFORMADA DE FOURIER DE LA FUNCION DE TRANSMISION
ASOCIADA A UNA CELULA CON EL NUCLEO DESPLAZADO:

La función de transmisión asociada a una célula biológica con el núcleo desplazado fué definida en coordenadas polares en el Cap. 2 (ec. (2.13)), poniéndose de manifiesto que en esta situación la función no presenta simetría circular. Por esta razón, y para facilitar el cálculo de la transformada de Fourier, expresaremos la función de transmisión en coordenadas cartesianas:

$$t(x', y') = \begin{cases} t_N e^{i\phi_N} & (x' - a)^2 + (y' - b)^2 < (d_N/2)^2 \\ t_C e^{i\phi_C} & \begin{cases} x'^2 + y'^2 < (d_C/2)^2 \\ (x' - a)^2 + (y' - b)^2 > (d_N/2)^2 \end{cases} \\ t_M(x', y') e^{i\phi_M} & (d_C/2)^2 < x'^2 + y'^2 < (d_T/2)^2 \end{cases}$$

donde (a,b) son las coordenadas del centro del núcleo desplazado. Desdoblando los intervalos de definición y reagrupando convenientemente se llega a:

$$t(x', y') = \begin{cases} t_N e^{i\phi_N} - t_C e^{i\phi_C} & 0 < (x' - a)^2 + (y' - b)^2 < (d_N/2)^2 \\ t_C e^{i\phi_C} & 0 < x'^2 + y'^2 < (d_C/2)^2 \\ t_M(x', y') e^{i\phi_M} & (d_C/2)^2 < x'^2 + y'^2 < (d_T/2)^2 \end{cases}$$

Llamando $t_1(x', y')$, $t_2(x', y')$ y $t_3(x', y')$ a las funciones de transmisión definidas en cada intervalo, la función de transmisión puede expresarse como:

$$t(x', y') = t_1(x', y') + t_2(x', y') + t_3(x', y')$$

lo que permite calcular la transformada de Fourier como suma de las transformadas asociadas a cada una de las funciones. La transformada de Fourier de $t_1(x', y')$ será:

$$F(t_1(x', y')) = \iint_{-\infty}^{\infty} t_1(x', y') \exp \{-2\pi i (x_0 x' + y_0 y') / \lambda z\} dx' dy'$$

donde (x_0, y_0) y (x', y') son respectivamente las coordenadas asociadas al plano de difracción y al plano objeto.

Considerando la definición de $t_1(x', y')$ y su intervalo de definición podemos escribir:

$$F(t_1(x', y')) = \iint_{-\infty}^{\infty} X_{\{0 < (x' - a)^2 + (y' - b)^2 < (d_N/2)^2\}} (t_N e^{i\phi_N} - t_C e^{i\phi_C}) \exp \{-2\pi i (x_0 x' + y_0 y') / \lambda z\} . dx' dy'$$

donde $X_{\{int\}}$ es una función peso que vale la unidad en el intervalo definido en el subíndice y cero en el resto.

Haciendo uso de la propiedad del desplazamiento de la transformada de Fourier (Oran - Brighan, 1974), esta última integral será:

$$F(t_1(x', y')) = \exp \{-2\pi i (x_0 a + y_0 b) / \lambda z\} . \iint_{-\infty}^{\infty} X_{\{0 < x'^2 + y'^2 < (d_N/2)^2\}} (t_N e^{i\phi_N} - t_C e^{i\phi_C}) . dx' dy'$$

El integrando es ahora una función que presenta simetría circular y que, por tanto, pasando a coordenadas polares, puede calcularse la transformada de Bessel-Fourier:

$$\beta(t_1(r)) = \exp \{-2\pi i \bar{r}_0 \bar{E} / \lambda z\} 2\pi \int_0^{d_N/2} (t_N e^{i\phi_N} - t_C e^{i\phi_C}) r \cdot J_0(2\pi r' \rho) dr'$$

donde $\bar{r}_0 = (x_0, y_0)$ y $\bar{E} = (a, b)$.

Integrando obtenemos:

$$\beta(t_1(r')) = 2\pi \exp \{-2\pi i \bar{\rho} \bar{E}\} (t_N e^{i\phi_N} - t_C e^{i\phi_C}) \frac{d_N^2}{4} \frac{J_1(\pi \rho d_N)}{\pi \rho d_N}$$

Las funciones $t_2(x', y')$ y $t_3(x', y')$ presentan simetría circular y su transformada de Bessel-Fourier coincide con la calculada en el Cap. 2, Apartado 2.3.1 (ecs. (2.18) y (2.19)).

APENDICE C

DETERMINACION DEL NUMERO DE TERMINOS DE LA SERIE

QUE INTERVIENE EN LA INTENSIDAD DE DIFRACCION

Se ha de determinar en qué término truncamos la serie que interviene en el cálculo de la intensidad en el plano de difracción, Eqs. (2,9), (2.11) y (2.12).

Llamemos I_i a la suma de la serie truncada en el término "i".

Es preciso notar, que debemos atender principalmente a dos aspectos:

a) Acotación de la convergencia en valor.

El valor $|I_i(\rho) - I_{i+1}(\rho)|$ debe ser menor que $\epsilon_1(\rho)$ para todo ρ que pertenezca al intervalo de frecuencias espaciales estudiado ($0 - 50 \text{ mm}^{-1}$). Parece oportuno elegir la cota dos órdenes de magnitud menor que el valor de la función, es decir

$$\epsilon_1(\rho) = 10^{-2} |I_i(\rho)|$$

b) Las frecuencias espaciales en las que se presentan los mínimos y máximos relativos nos caracterizan el objeto analizado. Debemos, por tanto, cuidar que estas frecuencias no sufran variaciones importantes. Esto se puede expresar de la siguiente manera:

$$|\rho_i^m - \rho_{i+1}^m| < \epsilon_2$$

representando por ρ_i^m la frecuencia espacial de los máximos y mínimos relativos. El subíndice "i" significa que la serie se ha truncado en el término "i". La cota ϵ_2 puede fijarse en 0.5 mm^{-1} , dado que el intervalo de estudio de ρ es ($0 - 50 \text{ mm}^{-1}$).

Para determinar, en nuestro caso, la validez de aproximación en el truncamiento, con los requisitos señalados anteriormente, se ha procedido a calcular el valor de la suma cuando se

trunca en el primer término, segundo término y así hasta el término octavo (que contiene la función J_{15}). Obtenemos así la bondad de ajuste para el truncamiento en el séptimo término, $i = 7$ (que contiene la función J_{13}).

Se ha realizado el cálculo para valores que consideramos representativos, en concreto:

- Coeficiente de transmisión del citoplasma, t_C :
0.999999, 0.999, 0.99, 0.95 y 0.9
- Fase de la membrana, ϕ_M :
0.05 rad., 0.55 rad., 1.05 rad. y 1.55 rad.

La combinación de los cuatro valores de la fase con cada uno de los cinco valores del factor de transmisión han dado lugar a veinte tablas de valores, que han sido estudiadas de acuerdo con los criterios anteriormente descritos. De su análisis se deduce:

- Para $t_C = 0.999999$, las cotas se cumplen holgadamente, cualquiera que sea el valor de ϕ_M , cuando se trunca la serie en el sexto término (que contiene a J_{11}) y considerando el intervalo de frecuencias completo ($0-50 \text{ mm}^{-1}$).
- Para $t_C = 0.999$ y 0.99 , la cota ϵ_2 de posición de los puntos críticos se cumple satisfactoriamente, cualquiera que sea el valor de ϕ_M y en todo el intervalo de frecuencias, cuando se considera hasta el término que contiene a J_{11} .
Sin embargo, para satisfacer la cota ϵ_1 sobre el valor de la función en estos puntos críticos, y usando hasta el séptimo término (que contiene a J_{13}) hemos de restringir el intervalo de frecuencias espaciales a ($0-40 \text{ mm}^{-1}$). Esto significa que el tercer mínimo y el tercer máximo secundario no los podemos asegurar en valor, salvo que tomemos $\epsilon_1(\rho)$ como $0.1 |I(\rho)|$, en cuyo caso, se extiende el intervalo de frecuencias a 50 mm^{-1} .
La variación con ϕ_M del ajuste se muestra irrelevante.

- Para $t_C = 0.95$, incluyendo el término que contiene a J_{13} (el séptimo), podemos mantener las cotas establecidas, ϵ_1 y ϵ_2 , siempre que limitemos el intervalo de frecuencias a $0-40 \text{ mm}^{-1}$. Para frecuencias superiores a este valor, las cotas no son válidas y habría que elevar ϵ_2 hasta 1, y en cuanto a ϵ_1 debería subirse hasta $0.4 |I(\rho)|$. Por ello el tercer mínimo y tercer máximo secundario exigen tener en cuenta mayor número de términos en la serie. La variación de la bondad del ajuste es inapreciable con ϕ_M .
- Para $t_C = 0.9$ se observa el mismo comportamiento que en el caso anterior; pero para $\rho > 40 \text{ mm}^{-1}$ la cota ϵ_1 debe elevarse ahora hasta $0.8 |I(\rho)|$.

Por tanto, concluimos que el ajuste es tanto mejor cuanto mayor es el valor de t_C y su bondad no se ve afectada por el valor que tome ϕ_M .

Se concluye de las observaciones anteriores que los resultados de frecuencia y valor de la función para los puntos críticos, cumplen con las cotas preestablecidas, truncando la serie en el séptimo término, es decir, el que contiene a J_{13} . Esto sería válido incluso para $t_C = 0.95$ y 0.9 , ya que nos interesa sobretudo las frecuencias inferiores a 40 mm^{-1} . Pero para que el cálculo sea más uniforme en la bondad de aproximación, hemos tomado en estos dos casos, hasta el octavo término (J_{15}), con lo que se cumplen las cotas establecidas en todo el intervalo de frecuencias espaciales estudiado ($0-50 \text{ mm}^{-1}$).

Estas conclusiones justifican el truncamiento que ha sido usado para la realización de los cálculos del modelo teórico.

APENDICE D

ESQUEMA GENERAL DE LOS PROGRAMAS DE CALCULO

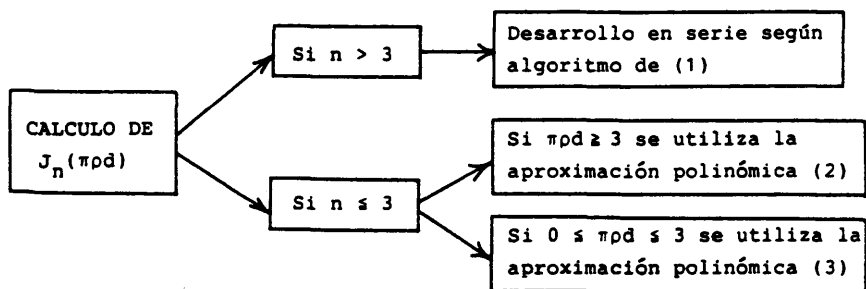
En este Apéndice se describen los bloques de cálculo más significativos seguidos para el análisis numérico de las ecuaciones obtenidas en el Capítulo 2.

Estas ecuaciones son las partes reales de las amplitudes de difracción asociadas al núcleo, $A_1(\rho)$, citoplasma, $A_2(\rho)$ y membrana, $A_3(\rho)$. En el caso en que el núcleo está desplazado del centro de simetría de la célula, designamos por $A_1'(\rho)$ a la amplitud del núcleo.

En todas las ecuaciones se aprecian dos tipos de expresiones: unas que dependen sólo de las características geométricas del modelo y otras que dependen de sus características ópticas.

Los parámetros asociados a las primeras (d_N , d_C y d_T), están ligados a la variable radial ρ a través de las funciones de Bessel. Por ello, se ha procedido en primer lugar a calcular estas funciones, creando un fichero de datos que es común a todos los casos que se obtienen cuando se varían las características ópticas del modelo.

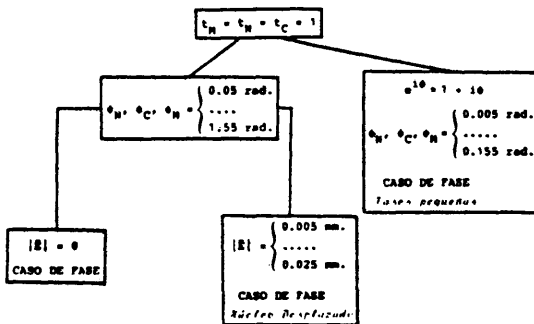
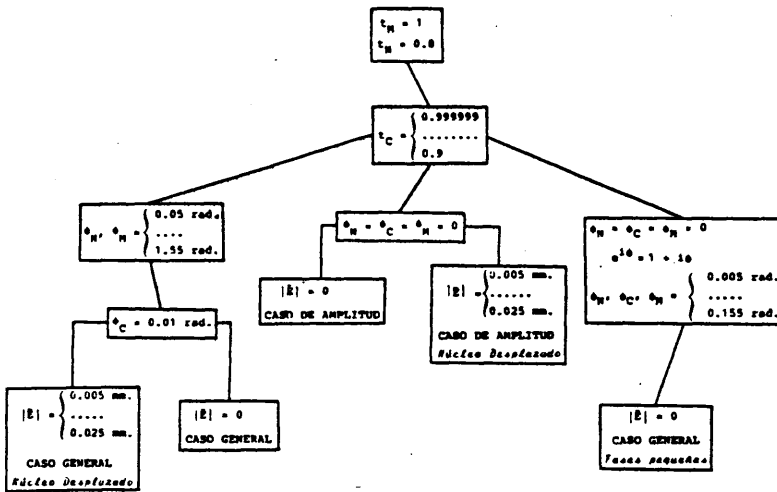
El procedimiento para el cálculo de las funciones de Bessel $J_n(\pi\rho d)$ se expone en el siguiente diagrama:



(Sobre el cálculo de las series $\sum_n J_n(\pi\rho d)$, veanse las consideraciones de acotamiento en el Apéndice C).

Con los siguientes diagramas se muestran los casos estudiados así como el método seguido, junto con los valores asignados a los parámetros involucrados en el cálculo.

DIAGRAMAS DE CALCULO



- (1) MILLER, A.R.: "Basic Programs for scientists and Enggineers". (Ed. SYBEX, N.Y., 1981). Capítulo 11.
- (2) ABRAMOWITZ, M. & STEGUN, I.: "Handbook of Mathematical Functions". (Ed. Dover Publications, N.Y., 1972). Sección 9, Fórmulas 9.4.3 y 9.4.6.
- (3) ABRAMOWITZ, M. & STEGUN, I.: "Handbook of Mathematical Functions". (Ed. Dover Publications, N.Y., 1972) Sección 9, Fórmulas 9.4.1 y 9.4.4.

APENDICE E

SIMPLIFICACION DE LA ECUACION (5.17) UTILIZANDO LAS PROPIEDADES DE LAS FUNCIONES DE BESSEL

La serie de la Eq. (5.17) se puede escribir como sigue:

$$\begin{aligned}
 S \equiv & J_0(2\pi R) J_0(2\pi R') + \sum_{k=1}^{\infty} J_{2k}(2\pi R) J_{2k}(2\pi R') \cos(2k(\alpha' - \alpha)) + \\
 & + \sum_{k=-\infty}^{-1} J_{2k}(2\pi R) J_{2k}(2\pi R') \cos(2k(\alpha' - \alpha)) + \\
 & + \sum_{k=0}^{\infty} J_{2k+1}(2\pi R) J_{2k+1}(2\pi R') \cos((2k+1)(\alpha' - \alpha)) + \\
 & + \sum_{k'=-\infty}^{-1} J_{2k'+1}(2\pi R) J_{2k'+1}(2\pi R') \cos((2k'+1)(\alpha' - \alpha))
 \end{aligned} \tag{E.1}$$

teniendo en cuenta la siguiente propiedad de las funciones de Bessel:

$$J_{-n}(w) = (-1)^n J_n(w)$$

donde w es una variable compleja genérica.

Es fácil comprobar que:

$$J_{-n}(2\pi R) J_{-n}(2\pi R') = (-1)^{2n} J_n(2\pi R) J_n(2\pi R') \cos(2k(\alpha' - \alpha))$$

Por tanto, el sumatorio doble: $2 \sum_{k=1}^{\infty}$ puede descomponerse en dos contribuciones:

$$\sum_{k=1}^{\infty} + \sum_{k=-\infty}^{-1}$$

y de igual manera, para los términos de orden impar:

$$\sum_{k=0}^{\infty} + \sum_{k'=-\infty}^{-1}$$

Entonces, la Eq. (E.1) se puede escribir como sigue:

$$S \equiv \sum_{k=-\infty}^{+\infty} J_k(2\pi R) J_k(2\pi R') \cos(k(\alpha' - \alpha)) \quad (\text{E.2})$$

Considerando las fórmulas de adición de Graf (Abramowitz, M & Stegun, I., 1972) para series de productos de funciones de Bessel, se tiene:

$$J_0(w) = \sum_{k=-\infty}^{+\infty} J_{2k}(u) J_k(v) \cos(k\beta) \quad (\text{E.3})$$

donde:

$$u = 2\pi R ; v = 2\pi R' ; \beta = \alpha' - \alpha$$

y

$$w = (u^2 + v^2 - 2uv \cos \beta)^{\frac{1}{2}}$$

Por tanto, la Eq. (E.2) puede expresarse como:

$$S \equiv J_0\left\{ 2\pi(R^2 + R'^2 - 2RR' \cos(\alpha' - \alpha))^{\frac{1}{2}} \right\}$$

Teniendo en cuenta la definición de las variables R y R' se llega a la expresión (5.18).

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- ABRAMOWITZ, M. & STEGUN, I.: "Handbook of Mathematical Functions". (Ed. Dover Publications, N.Y., 1972). pp. 363.