

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN**

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Trabajo Fin de Grado

**ESTUDIO DE TÉCNICAS ÓPTICAS DE
IMAGEN PARA LA CARACTERIZACIÓN DE
MEDIOS BIOLÓGICOS DE BAJO
CONTRASTE**

**(Study of Optical Imaging Techniques for
Low Contrast Biological Media
Characterization)**

Para acceder al Título de

Graduado en

Ingeniería de Tecnologías de Telecomunicación

Autor: Ana Patricia Quintana Gómez



E.T.S. DE INGENIEROS INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACION

GRADUADO EN INGENIERÍA DE TECNOLOGÍAS DE TELECOMUNICACIÓN

CALIFICACIÓN DEL TRABAJO FIN DE GRADO

Realizado por: Ana Patricia Quintana Gómez

Director del TFG: Jose Luis Arce Diego y Félix Fanjul Vélez

Título: “Estudio de las técnicas ópticas de imagen para la caracterización de medios biológicos de bajo contraste”

Title: “Study of Optical Imaging Techniques for Low Contrast Biological Media Characterization”

Presentado a examen el día: 03/09/2021

para acceder al Título de

GRADUADO EN INGENIERÍA DE TECNOLOGÍAS DE TELECOMUNICACIÓN

Composición del Tribunal:

Presidente (Apellidos, Nombre): José Luis Arce Diego

Secretario (Apellidos, Nombre): Maria Isabel Pontón Lobete

Vocal (Apellidos, Nombre): Oscar Fernández Fernández

Este Tribunal ha resuelto otorgar la calificación de:

Fdo.: El Presidente

Fdo.: El Secretario

Fdo.: El Vocal

Fdo.: El Director del TFG

(sólo si es distinto del Secretario)

Vº Bº del Subdirector

Trabajo Fin de Grado Nº

(a asignar por Secretaría)

Este Trabajo Fin de Grado ha sido parcialmente financiado por el proyecto del Plan Nacional de I+D+i “Modificación mediante alta presión de las propiedades plasmónicas y luminiscentes de nanopartículas de metales y óxidos desnudas y recubiertas” (PGC2018-101464-B-I00), del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, cofinanciado con fondos FEDER y por la Fundación San Cándido.

Agradecimientos

A la Universidad de Cantabria como institución, por dotar de material, instalaciones y todas las facilidades posibles a la hora de tramitar cualquier proceso.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores del trabajo de fin de grado, José Luis Arce y Félix Fanjul por aconsejarme y ayudarme a lo largo de este proyecto. Realizar este interesante estudio con el apoyo del Grupo de Ingeniería Biomédica (Departamento TEISA) ha sido un privilegio para mi y por lo tanto agradezco a todos sus integrantes las labores desempeñadas durante estos años.

En segundo lugar, a mis familiares, en especial a mi abuela Mari Carmen "Tata", por inculcarme desde pequeña las ganas de aprender, de interesarme por cosas nuevas, estudiar y animarme hasta el final. Y a mis padres por darme todas las facilidades para poder cursar esta carrera universitaria.

A todos mis amigos de verdad que he ido conociendo a lo largo de la carrera, que han servido de apoyo en los días duros de biblioteca, y han hecho de los descansos para el café y las meriendas sean momentos dignos de un recuerdo especial.

A Ana y a Andrea por dar significado a la palabra amistad. Y a Gema por ser una hermana mayor durante todos estos años.

Y por último a Javi, por calmar las tormentas, y estar en las buenas y en las malas contra viento y marea, pasase lo que pasase.

Tabla de contenidos

Índice general	VI
Índice de tablas	VII
Índice de figuras	IX
1. Introducción	1
1.1. Importancia de las técnicas de imagen para medios de bajo contraste . . .	1
1.2. Motivación y objetivos	2
1.3. Estructura	2
2. Propiedades ópticas de los tejidos biológicos y efectos de los mecanismos de interacción	4
2.1. Introducción	4
2.2. Propiedades ópticas fundamentales	5
2.2.1. Refracción	5
2.2.1.1. Índice de refracción	5
2.2.1.2. Reflexión y refracción	6
2.2.2. Dispersión	6
2.2.2.1. Dispersión en un área localizada	6
2.2.2.2. El límite Rayleigh	7
2.2.2.3. Régimen de Mie	7
2.2.3. Absorción	8
2.3. Transporte de la luz en los tejidos	9
2.3.1. Introducción a la teoría de radiación del transporte	9
2.3.2. El modelo de transporte de la radiación	9
2.3.2.1. Parámetros básicos	9
2.3.2.2. Ecuación de transporte de la radiación	10
2.3.3. Simulaciones de Monte Carlo	10
2.3.4. Model Kubelka-Munk	10
2.4. Propiedades de los tejidos	11
2.4.1. Índices de refracción	11
2.4.2. Propiedades de la dispersión	11
2.4.3. Propiedades de la absorción	12
2.4.3.1. La ventana terapéutica	12
2.4.3.2. Propiedades de absorción de los componentes de los tejidos	12
2.5. Mecanismos de interacción	15
2.5.1. Introducción	15
2.5.2. Interacción fotoquímica	16
2.5.2.1. Terapia fotodinámica	16
2.5.2.2. Bioestimulación	17

2.5.3.	Interacción térmica	17
2.5.3.1.	Generación de calor	18
2.5.3.2.	Transporte de calor	19
2.5.3.3.	Efectos del calor	20
2.5.3.4.	LITT.Termoterapia intersicial inducida por láser	20
2.5.4.	Fotoablación	22
2.5.4.1.	Modelo de fotoablación	22
2.5.4.2.	Citotoxicidad de la radiación UV	23
2.6.	Conclusiones	24
3.	Modelos ópticos para medios biológicos de bajo contraste	25
3.1.	Introducción	25
3.2.	Modelos de tejidos continuos y discretos	26
3.3.	Rango y distribución	27
3.3.1.	Rangos y tamaños	27
3.3.2.	Distribuciones	28
3.4.	Variaciones del índice de refracción y absorción	29
3.5.	Anisotropía tisular	31
3.6.	Fracción de volumen	35
3.7.	Orden espacial de las partículas	37
3.8.	Propiedades fractales	38
3.9.	Conclusiones	39
4.	Microscopio óptico de contraste de fase: hacia nuevas técnicas basadas en la imagen de fase cuantitativa	40
4.1.	Introducción	40
4.2.	Imagen de fase cuantitativa (QPI)	41
4.2.1.	QPI e investigación multimodal	42
4.2.2.	Imágenes en nanoescala y 3D	43
4.3.	Características de la imagen	44
4.3.1.	La imagen como operación lineal	44
4.3.2.	Resolución	44
4.3.3.	Relación Señal Ruido (SNR)	45
4.3.4.	Contraste y relación contraste/ruido	45
4.3.5.	Filtrado de imagen	46
4.3.5.1.	Filtro paso bajo	46
4.3.5.2.	Filtro paso Banda	46
4.3.5.3.	Filtro paso Alto	47
4.4.	Luz microscópica	47
4.4.1.	Teoría de la imagen de Abbe	48
4.4.2.	Microscopio de contraste de fase de Zernike	49
4.5.	Conclusiones	51

5. Diferentes enfoques de la técnica QPI: Análisis y métodos	52
5.1. Introducción	52
5.2. Posibles combinaciones con dos geometrías	53
5.2.1. Método fuera del eje combinado con desplazamiento de fase	53
5.2.2. Método de desplazamiento de fase combinado con luz blanca	54
5.2.3. Método desplazamiento de fase y trayectoria común	55
5.2.4. Método fuera del eje y trayectoria común	56
5.2.5. SLIM. Método de trayectoria común y luz blanca	57
5.2.6. iSLIM	58
5.3. Conclusiones	59
6. Análisis comparado de los métodos QPI <i>label-free</i>	60
6.1. Introducción	60
6.2. QPI como método sin etiqueta	61
6.3. Otros métodos de imagen <i>label-free</i>	61
6.4. Conclusiones	64
7. Conclusiones	65
8. Bibliografía	67

Índice de tablas

1.1. Capítulos y sus títulos	2
3.1. Diámetro células de la sangre	27
3.2. Medidas estructuras intracelulares	28
3.3. Medidas con la técnica PS OCT ó tomografía de coherencia óptica sensible a la polarización	33
6.1. Tabla métodos <i>label-free</i> por absorción	63
6.2. Tabla métodos <i>label-free</i> por refracción	63
6.3. Tabla métodos <i>label-free</i> por Scattering	63
6.4. Tabla métodos <i>label-free</i> por Modos vibracionales	64
6.5. Tabla métodos <i>label-free</i> por Autofluorescencia	64

Índice de figuras

2.1.	Imagen de la luz incidente [7].	6
2.2.	Ventana terapéutica representada entre las líneas discontinuas, comprende el rango de 600 a 1400nm [7].	12
2.3.	Representación de la absorción del agua [7].	14
2.4.	Mapa interacción tejido-láser [16]	15
2.5.	Esquema terapia fotodinámica [16].	17
2.6.	Tiempos de relajación térmica del agua [7].	19
2.7.	Temperaturas críticas para que ocurra la necrosis celular [16]	21
2.8.	Setup experimental del LITT [7]	22
2.9.	Fracción superviviente de células de ovario de hámster chino tras la irradiación UV[16]	23
3.1.	Perfil de índice hipotético formado al medir el índice de refracción a lo largo de una línea en una dirección arbitraria a través de un volumen de tejido blando [17].	29
3.2.	Espectro de absorción de la piel y la aorta [18].	30
3.3.	Sistema de cilindros de longitud dieléctrica [18]	32
3.4.	Ilustración esquemática de la organización laminar del estroma de la córnea [17]	35
3.5.	Contenido en 1mm ³ desangre.	36
3.6.	Volumen de la sangre	36
4.1.	(a)QPI de una neurona. (b) Imagen obtenida haciendo la primera derivada a la imagen anterior. (c) Imagen obtenida haciendo el módulo cuadrado del gradiente asociado a la imagen a. (d) Imagen obtenida con el Laplaciano de a [20].	43
4.2.	Ilustración de contraste bajo y alto de la imagen [20]	46
4.3.	Señal con ruido [20]	47
4.4.	Señal tras un filtro de alta frecuencia [20]	47
4.5.	Señal tras un filtro paso bajo [20]	47
4.6.	Formación de la imagen coherente en un microscopio [20].	48
4.7.	(a) Fenómeno de la interferencia, (b) Descomposición de la frecuencia del campo resultante [20]	49

4.8.	Efecto del filtro paso bajo por el objetivo del microscopio [20].	50
4.9.	(a)Campo claro y (b) imagen tras contraste de fase [20]	51
5.1.	Implementación del sistema DRIMAPS con un microscopio Jamin-Lebedeff [20]	54
5.2.	Montaje experimental del FPM [23]	55
5.3.	Montaje experimental del método DPM [20]	56
5.4.	Montaje experimental del SLIM [20]	57
5.5.	Montaje experimental del iSLIM [23]	58

Capítulo 1

Introducción

1.1. Importancia de las técnicas de imagen para medios de bajo contraste

En la actualidad existen cantidad de técnicas de imagen ópticas que nos ayudan a ver el interior de un cuerpo de manera no invasiva, a partir de estas surge la necesidad de buscar y crear nuevas técnicas de imagen para medios de bajo contraste[1].

Los medios de bajo contraste óptico son aquellos que tienen una varianza del índice de refracción pequeña [2], este trabajo se basa en el análisis de las técnicas ópticas que permiten obtener estas imágenes.

El índice de refracción de un medio determina la velocidad de la luz de este. La varianza de estos índices de refracción da lugar a la dispersión, refracción y reflexión [3], y a su vez repercute en que el contraste de la imagen analizada sea mayor o menor.

Como ya sabemos el contraste de una imagen se define como la diferencia de intensidad que existe entre un punto y otro [4]. Es correcto pensar que analizar imágenes cuyo contraste es menor, será más complejo que el caso contrario, ya que delimitar zonas o incidir en los detalles de una imagen con estas características es mucho más costoso. Por eso, es tan importante avanzar en este tipo de técnicas de imagen para medios de contraste débil, ya que los microscopios convencionales tienen sus limitaciones a la hora de estudiar casos de este tipo [5].

Gracias al desarrollo de estas técnicas que se ha producido en las últimas décadas, obtenemos infinidad de aplicaciones biomédicas [6] que nos son de gran ayuda en proyectos médicos.

1.2. Motivación y objetivos

La motivación principal de este trabajo es estudiar y proponer desde un punto científico-técnico las técnicas de imagen que en los últimos años se han desarrollado para la caracterización precisa de los citados medios biológicos.

Con el fin de alcanzar dicho objetivo principal este trabajo se estructura siguiendo los objetivos parciales que a continuación se explican:

- Revisar las propiedades ópticas y los mecanismos básicos de interacción luz medio biológico.
- Analizar y proponer modelos ópticos de medios biológicos de bajo contraste.
- Estudiar y describir los fundamentos de las técnicas de imagen óptica de aplicación en la caracterización de este tipo de medios, así como sus parámetros de medida básicos y sus limitaciones.
- Describir dichas técnicas, los últimos y recientes avances científico-técnicos y sus aplicaciones para la obtención de imágenes in-vivo.

1.3. Estructura

A continuación se muestra una tabla con la organización de los Capítulos de este proyecto:

CAPÍTULO 1	INTRODUCCIÓN
CAPÍTULO 2	PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS TEJIDOS BIOLÓGICOS Y EFECTOS DE LOS MECANISMOS DE INTERACCIÓN
CAPÍTULO 3	MODELOS ÓPTICOS PARA MEDIOS BIOLÓGICOS DE BAJO CONTRASTE
CAPÍTULO 4	MICROSCOPIO ÓPTICO DE CONTRASTE DE FASE: HACIA NUEVAS TÉCNICAS BASADAS EN LA IMAGEN DE FASE CUANTITATIVA
CAPÍTULO 5	DIFERENTES ENFOQUES DE LA TÉCNICA QPI: ANÁLISIS Y MÉTODOS
CAPÍTULO 6	ANÁLISIS COMPARADO DE LOS MÉTODOS QPI "FREE-LABEL"
CAPÍTULO 7	CONCLUSIONES

Tabla 1.1: Capítulos y sus títulos

En el **Capítulo 1** se realiza una pequeña introducción a la temática principal del trabajo.

En el **Capítulo 2** se explican las propiedades ópticas de los tejidos biológicos y los mecanismos de interacción luz-tejido.

En el **Capítulo 3** se explican las principales características de los modelos ópticos de contraste débil.

En el **Capítulo 4** se trata el microscopio óptico de contraste de fase así como sus características y aplicaciones.

En el **Capítulo 5** se hace un recorrido por los diferentes enfoques de la técnica QPI.

En el **Capítulo 6** se expone la importancia de los métodos sin etiqueta.

En el **Capítulo 7** se presentan las conclusiones finales del trabajo.

Capítulo 2

Propiedades ópticas de los tejidos biológicos y efectos de los mecanismos de interacción

2.1. Introducción

Este primer capítulo se centra en proporcionar una introducción a las propiedades ópticas de los tejidos humanos [7], fijándose en como estas propiedades encajan con la descripción del transporte de la luz.

El capítulo consta de dos grandes bloques, el primero va desde la sección 2 de Propiedades ópticas fundamentales, hasta la sección 5. En esta parte, se tratarán temas de gran importancia. Para empezar hablamos de lo más básico, de como afecta la propagación de la luz en un tejido biológico, pasando por el transporte de la luz en los tejidos, dónde se explicarán diferentes modelos que proceden de las variedades de las propiedades ópticas, hasta volver a acabar explicando un poco más detallado las propiedades de los tejidos, donde se hablará del índice de refracción, y las propiedades ópticas que comentábamos en la primera sección aplicadas a los tejidos.

El segundo gran bloque habla de los múltiples mecanismos de interacción que son creados al aplicar la luz láser a los tejidos biológicos. Como existe gran diversidad de mecanismos y muchos tejidos diferentes esto da lugar a un número muy alto de combinaciones de los parámetros experimentales, por eso se agrupan en cinco categorías de interacción, fotoquímicas, térmicas, fotoablación, ablación inducida por plasma y fotodisrupción.

Se entiende “luz” como la porción del espectro electromagnético con longitudes de onda de vacío en el rango de 1m a 100nm. La descripción cuántica de la luz en términos de fotones es imprescindible para entender el intercambio de energía y momento entre la luz y la materia. Por otro lado, el término fotónica, se refiere al conjunto de fenómenos de

ondas electromagnéticas.

Desde un punto de vista físico los fenómenos pueden describirse de dos formas, en primer lugar, el término clásico se refiere a las teorías en las que la luz se considera un campo electromagnético oscilante que puede contener un rango continuo de energías, mientras que el modelo cuántico las ondas de luz son “cuantos” de energía conocidos como fotones. Cada fotón tiene una energía proporcional a la frecuencia de la onda electromagnética. Existen dos parámetros importantes de las ondas electromagnéticas, por un lado, la fase, esta da lugar a las interferencias y a la difracción. Y por otro lado la polarización que nos indica la dirección del vector campo eléctrico.

La teoría cuántica introduce la idea del intercambio de energía en forma de fotones entre la luz y la materia.

Debido a los efectos de la dispersión múltiple en la propagación de la luz en los tejidos el enfoque de la teoría electromagnética usamos el modelo conocido como teoría del transporte de la radiación, que ignora otros fenómenos ondulatorios como la polarización y la interferencia y se centra en el transporte de energía luminosa en el medio[8].

2.2. Propiedades ópticas fundamentales

En esta sección necesitamos tener en cuenta tres propiedades básicas que afectan a la propagación de la luz en un tejido biológico[4]. Estas son: la refracción, dispersión y absorción. Para entender y explicar este capítulo supondremos que los medios considerados son sistemas isotrópicos.

2.2.1. Refracción

La refracción es el cambio de dirección y lentitud que experimenta una onda al pasar de un medio a otro con distinto índice refractivo. Solo se produce si la onda incide oblicuamente sobre la superficie de separación de los dos medios y si estos tienen índices de refracción distintos. La refracción se origina en el cambio de velocidad de propagación de la onda señalada.

2.2.1.1. Índice de refracción

El índice de refracción de un medio determina la velocidad de la luz en este, y los cambios en él de refracción, ya sean continuos o bruscos, dan lugar a la dispersión, la refracción y la reflexión.

Dado que los tejidos son heterogéneos en su composición, puede ser necesario conocer los índices de refracción de los distintos componentes del tejido, por ejemplo, para calcular

las propiedades de dispersión.

El índice de refracción (n) en un medio homogéneo nos describe sus propiedades ópticas lineales, λ representa la longitud de onda y $\alpha(\lambda)$ representa la atenuación de la onda. Su forma completa para un índice de refracción complejo (1) es:

$$n(\lambda) = n(\lambda) - i * \alpha(\lambda) \quad (2.1)$$

La parte imaginaria es la atenuación y la parte real se define como la velocidad de la luz en el medio en el que estamos.

2.2.1.2. Reflexión y refracción

La reflexión se produce cuando una onda luminosa se propaga por un material con un índice de refracción determinado encuentra un límite con un segundo material con un índice diferente, esto hace que la trayectoria que sigue la luz se redirija. Esta situación ilustrada la encontramos más adelante (Figura 1). La relación entre el ángulo de incidencia y el ángulo de refracción para la luz transmitida viene dada por la ley de Snell (2).

$$\sin \rho_2 = \frac{n_1}{n_2} * \sin \rho_1 \quad (2.2)$$

En la siguiente imagen observamos la luz incidente en un medio donde tras pasar por la frontera sufre refracción. El ángulo de la zona 2 (ρ_2) viene dado en función del ángulo de la zona 1 (ρ_1) y de los diferentes índices de refracción de cada zona n_1 y n_2 .

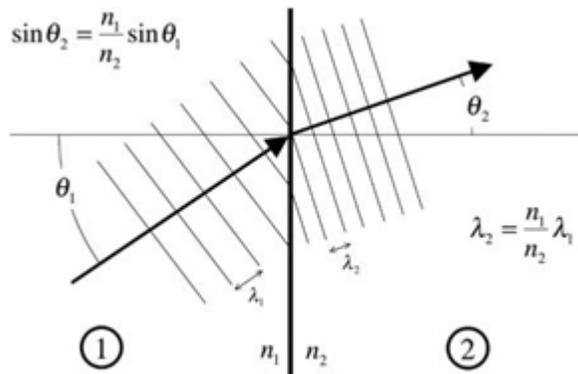


Figura 2.1: Imagen de la luz incidente [7].

2.2.2. Dispersión

2.2.2.1. Dispersión en un área localizada

La dispersión aparece cuando tenemos un material externo en una región dentro del material propio de esta área. Lo que provoca es que parte de la luz incidente se redirija a

ángulos de la partícula que se dispersa.[9]

En la fotónica biomédica, los procesos de dispersión son importantes tanto para el diagnóstico como para las aplicaciones terapéuticas:

- **Aplicaciones de diagnóstico**

La dispersión depende de muchos parámetros como el tamaño, la morfología y la estructura de los componentes de los tejidos. Las variaciones de estos componentes dependiendo de cada enfermedad afectaría a las propiedades de la dispersión lo cual nos proporciona medios para fines de diagnóstico y aplicaciones de imagen.

- **Aplicaciones terapéuticas**

Los parámetros de Scattering o dispersión podemos usarlos para determinar dosimetría óptica de la luz y obtener diferentes resultados para saber cómo se responde a diferentes terapias contra enfermedades.

En la práctica podemos clasificar la dispersión en tres categorías respecto al tamaño de la longitud de onda del objeto: en el límite de Rayleigh el tamaño del dispersor es más pequeño, mientras que en el régimen de Mie el tamaño del dispersor es comparable a la longitud de onda y en el límite geométrico la longitud de onda es mucho menor que el dispersor.

2.2.2.2. El límite Rayleigh

Lo que se conoce como el límite de Rayleigh se produce cuando la luz se dispersa por un tejido mucho más pequeño que la longitud de onda del fotón. Estos tejidos o estructuras incluyen componentes celulares como membranas y objetivos extracelulares.

Si se cuenta con la condición de la luz como ondas electromagnéticas, no como fotones, el resultado que se obtiene es un momento dipolar en el dispersor. Este momento dipolar oscila en el tiempo con la frecuencia del campo incidente, y emite una radiación dipolar.

A la dispersión de Rayleigh se le llama “elástica” cuando la energía del fotón dispersado coincide con la del fotón incidente. Por el contrario, el término “inelástico” se refiere al hecho de que el fotón dispersado pierda energía, esto ocurre en la dispersión Raman, la diferencia con la elástica es que esta última es mucho más fuerte.

2.2.2.3. Régimen de Mie

La teoría de Mie [10] se aplica para procesos donde las aproximaciones de Rayleigh no son válidas, hablamos de regiones donde el tamaño del dispersor y la longitud de onda son comparables. Se aplica en objetos esféricos como estructuras celulares, como mitocondrias y núcleos.

Cada estructura biológica posee un patrón exacto de dispersión que dependerá de la forma detallada de cada partícula.

Como se comentaba antes la teoría de la dispersión de Mie se desarrolló específicamente para partículas esféricas, aunque comúnmente se utiliza para referirse a la dispersión de partículas de forma arbitraria.

2.2.3. Absorción

El proceso de absorción implica la extracción de energía de la luz por parte de una especie molecular. Este proceso es muy importante en la fotónica biomédica y cuenta con diferentes aplicaciones:

- **Aplicaciones de diagnóstico**

Las transiciones entre dos niveles de energía de una molécula que están bien definidas a longitudes de onda específicas se usan como huella espectral de la molécula.

- **Aplicaciones terapéuticas**

La luz láser produce efectos en tejidos con fines terapéuticos gracias a la absorción de energía, lo cual genera que un átomo cambie de un estado a otro, a este proceso se le denomina transición.

Las regiones del espectro en las que esto ocurre se conocen como bandas de absorción.

En general, hay tres tipos básicos de procesos de absorción: electrónicos, vibracionales y rotacionales.

Absorción con niveles electrónicos. Este proceso ocurre cuando una molécula absorbe energía de excitación, y se eleva a un nivel de los estados siguientes excitados. La intensidad de absorción depende de la intensidad de la radiación de excitación.

Absorción con niveles vibracionales. Una transición vibracional se produce cuando una molécula pasa de un estado vibracional a otro. Normalmente estas transiciones vibracionales se corresponden con las energías de los fotones.

Absorción con niveles de rotación. Entendemos los niveles rotacionales como los diferentes estados de rotación de una molécula. Estos niveles están asociados a orbitales moleculares que describen la distribución de los electrones en la molécula. Una transición electrónica ocurre cuando se transfiere un electrón de un orbital molecular a otro.

Las transiciones electrónicas se producen tanto en los átomos como en las moléculas, mientras que las transiciones vibracionales y rotacionales se producen sólo en las moléculas.

Al igual que se puede absorber la energía también puede disiparse ópticamente mediante la emisión de un fotón, o intercambiando energía cinética con otros grados de libertad. Un proceso en el que una pequeña cantidad de energía absorbida se disipa de forma no radiante y el resto se emite como un fotón en la transición de vuelta al estado básico es conocido como luminiscencia, a su vez se puede dividir en fluorescencia y fosforescencia.

2.3. Transporte de la luz en los tejidos

En términos de propagación de la luz la mayoría de los tejidos humanos se consideran opacos, estos funcionan como estructuras heterogéneas y presentan variaciones espaciales en sus propiedades ópticas. Estas variaciones hacen que estos tejidos sean fuertes dispersores de luz.[8]

2.3.1. Introducción a la teoría de radiación del transporte

La propagación en los tejidos se puede clasificar en dos tipos: coherente e incoherente, la primera es referida a la capacidad de un campo luminoso de mantener una relación de fase definida en espacio y tiempo, esta interferencia es un patrón de manchas que aparece cuando la luz coherente se refleja en una superficie rugosa o un medio de dispersión, por otro lado la fuente incoherente es una bombilla incandescente, a diferencia de la luz laser o coherente no presenta ese patrón de manchas que se comentaba al principio.

Dentro de los tejidos la luz que se dispersa puede presentar propiedades coherentes e incoherentes.

La dispersión múltiple es un fenómeno muy importante en estos sistemas, mediante un modelo sencillo se puede ilustrar el origen de estos efectos y su relación con la dispersión simple y múltiple.

2.3.2. El modelo de transporte de la radiación

La dispersión múltiple suprime la naturaleza ondulatoria de la luz, por lo tanto, en lugar de seguir las ondas de luz se puede seguir solo la energía que contienen.

2.3.2.1. Parámetros básicos

El medio por el que se propaga la energía luminosa se caracteriza principalmente por tres parámetros:

- Coeficiente de absorción μ_a .
- Coeficiente de dispersión μ_s .

- Función "fase" de dispersión ρ .

En el modelo que se explica, una sola partícula es la responsable tanto de la absorción como de la dispersión, por lo tanto, las densidades numéricas de las partículas dispersoras y absorbentes son las mismas.

2.3.2.2. Ecuación de transporte de la radiación

La ecuación fundamental con la que describimos la propagación de la luz es la ecuación de transporte de la radiación. Entendemos la luz como una colección de fotones localizados e incoherentes.

Si seguimos un paquete de energía luminosa a lo largo del tiempo, vemos que mientras se propaga en el espacio el paquete pierde energía debido a la absorción y la dispersión, pero también gana energía de la luz dispersada hacia otras direcciones. Estos procesos se ven reflejados en la relación de transporte de radiación (2.3) :

$$\hat{s} * I(r, \hat{s}) = -(\mu_a + \mu_s) * I(r, \hat{s}) + \frac{\mu_a + \mu_s}{4\pi} \int_4 \pi \rho(\hat{s} * \hat{s}') * I(r, \hat{s}') d\Omega' \quad (2.3)$$

Consideremos un pequeño paquete de energía luminosa definido por su posición, $r(t)$, y su dirección de propagación \hat{s} . Siguiéndolo a lo largo del intervalo de tiempo dt mientras se propaga en el espacio, el paquete pierde energía debido a la absorción y la dispersión fuera de \hat{s} pero también gana energía de la luz dispersada en el paquete dirigido desde otras direcciones y de cualquier fuente local de la luz en $r(t)$.

2.3.3. Simulaciones de Monte Carlo

En los casos más realistas se resuelven con técnicas numéricas, el método más utilizado es el de Monte Carlo [12]. Este método incluye una amplia clase de métodos que utilizan números aleatorios para la resolución de un problema. En concreto, Monte Carlo se adapta bien a las necesidades de los problemas de luz en los tejidos porque se basa en el mismo marco de la teoría de transporte de la radiación.

La simulación de Monte Carlo se basa en el comportamiento aleatorio en los juegos de azar donde las principales atracciones son los juegos de azar de los casinos. Se aplica el mismo fenómeno con las trayectorias de los fotones que se propagan dentro de los tejidos, ya que presentan un valor incierto. A medida que el número de fotones en la simulación crece, mas exactos serán las predicciones de este método.

2.3.4. Model Kubelka-Munk

Desarrollaron un conjunto de ecuaciones útiles que proporcionaron los fundamentos para muchos estudios cuantitativos de absorción, dispersión y procesos de luminiscencia. Las ecuaciones describen el hecho de que el haz de luz viaja en la dirección de transmisión

, a su vez la intensidad disminuye debido a los procesos de absorción y dispersión y al contrario se gana intensidad gracias al haz que viene de la otra dirección.

El gran interés en este modelo fue su utilidad para investigar las propiedades ópticas de los medios difusos [9]. Se desarrolló un método que utiliza esta teoría para permitir la cuantificación de los espectros de reflectancia de los tejidos con el fin de estudiar los cambios cinéticos.

2.4. Propiedades de los tejidos

2.4.1. Índices de refracción

Los fenómenos de dispersión, refracción y reflexión al igual que la velocidad de la luz en un medio son dependientes del índice de refracción.

El índice de refracción de un tejido se aproxima como la media ponderada por volumen de los valores de sus constituyentes. El agua suele ser en su mayoría gran parte de los tejidos y tiene un índice de $n=1,33$.

En la escala superior de los índices de refracción esta con $n=1,6$ esto se encuentra en la capa epidérmica de la piel, más concretamente en las partículas de melanina. Los propios tejidos enteros como partes del cerebro, el pulmón, o la aorta se encuentran dentro de un rango de 1,36 a 1,4. Los fluidos extracelulares van de 1,35 a 1,38. Y en los tejidos grasos se sitúa en torno a 1,45. En los tejidos duros como puede ser el esmalte dental el índice de refracción vuelve a subir a 1,62 pero se mantiene dentro del espectro visible.

2.4.2. Propiedades de la dispersión

La dispersión como se ha explicado en capítulos anteriores aparece ante un cambio del índice de refracción. Si nos centramos en los medios celulares, los dispersores son los orgánulos subcelulares, sus dimensiones están comprendidas entre 100nm y 6 μ m. Estas estructuras son cilíndricas y su tamaño varía dependiendo del tipo de célula. El mayor de los orgánulos celulares es el núcleo de la célula, junto con el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.

Las células varían en forma y tamaño entre los diferentes tipos de tejidos con dimensiones de micras. Una célula aislada puede ser un fuerte difusor, pero en cambio dentro de un tejido la dispersión es en gran medida de origen subcelular.

Los tamaños característicos de las variaciones a pequeña escala son de longitud sub-onda y la dispersión es de tipo Rayleigh.

2.4.3. Propiedades de la absorción

2.4.3.1. La ventana terapéutica

La ventana terapéutica se trata de un rango espectral que se extiende de 600 a 1300nm, desde la región naranja del espectro visible hasta el NIR.

La capacidad de la luz para penetrar en los tejidos depende de la intensidad con la que absorben la luz, dentro del rango que antes se comentaba los tejidos dejan pasar perfectamente la luz [13].

A longitudes de onda más cortas, las biomoléculas son más absorbentes, es el caso del ADN. Con la hemoglobina la absorción llega a aumentar dos órdenes de magnitud a medida que la longitud de onda se acerca a la región de los 600nm. En el extremo de la ventana la penetración está limitada debido a las propiedades de absorción del agua.

En la siguiente figura vemos un diagrama de la ventana terapéutica de los tejidos, junto con las propiedades de absorción de varios componentes de los tejidos.

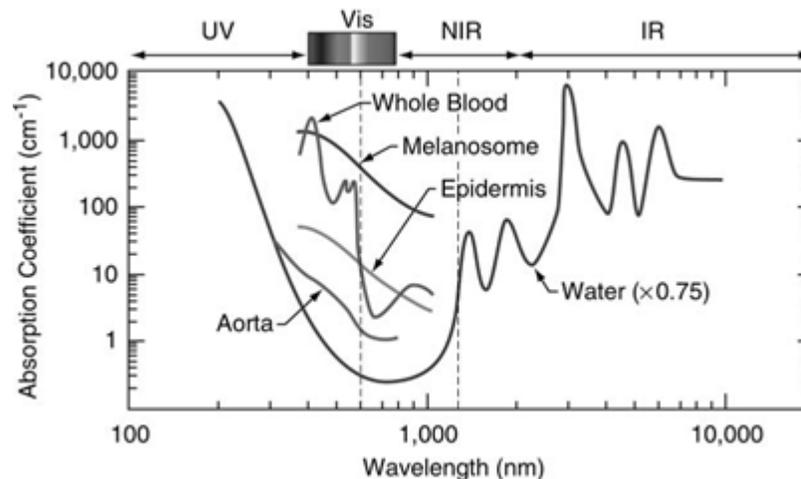


Figura 2.2: Ventana terapéutica representada entre las líneas discontinuas, comprende el rango de 600 a 1400nm [7].

2.4.3.2. Propiedades de absorción de los componentes de los tejidos

Las moléculas absorben fotones cuando coincide la energía del fotón con un intervalo entre estados energéticos internos. Algunos de los absorbentes más relevantes son el ADN, los aminoácidos, las proteínas, y las melaninas.

Aminoácidos y proteínas. Son fuertes absorbentes para longitudes de onda menores de 300nm y tienen picos locales en el rango de 260 a 280 nm. El NADH es nicotamida adenina dinucleótico es una coenzima encontrada de células vivas, pueden utilizarse para

monitorizar una reacción de los tejidos biológicos.[14]

La piel. La piel se extiende a lo largo de todo nuestro cuerpo, sirve para proteger a los órganos internos, y podemos separarla en tres capas:

Por un lado, la *capa exterior es la epidermis*. Dentro de la epidermis en su parte más externa formada por millones de células cutáneas muertas que son continuamente sustituidas por células vivas. Los melanocitos se encuentran entre las células basales de la epidermis, son los encargados de la producción de melanina, el responsable del color de la piel.

Debajo de la epidermis se encuentra la *dermis*, formada por apéndices de la piel como los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas, rodeadas de tejido fibroso.

Por último, la capa subyacente, denominada *tejido subcutáneo*, en ella encontramos células productoras de grasa y tejido fibroso.

Melaninas. Las melaninas son las encargadas de proporcionar la pigmentación a la piel. Cuenta con un amplio espectro de absorción que se hace más potente a medida que las longitudes de onda decrecen. Se encuentran en el rango visible entre los 400 y 700nm.

Sangre y hemoglobina. Juegan un papel muy importante para muchas aplicaciones diagnósticas y terapéuticas en la medicina láser y el diagnóstico médico [15]. La hemoglobina se encuentra en el tejido biológico, transportan el 97% del oxígeno de la sangre. Este sistema molecular relativamente grande tiene un alto grado de deslocalización de electrones, esto provoca una disminución de la energía necesaria para que se produzca una transición.

Las propiedades ópticas de la sangre dependen en gran medida de parámetros fisiológicos.

La sangre sigue el mismo comportamiento de absorción de la hemoglobina y el agua.

Las diferencias entre la sangre y la melanina o hemoglobina son que aunque estas dos últimas son fuertes absorbentes dentro de la ventana de diagnóstico, en los tejidos encontramos concentraciones relativamente bajas y por esta razón no afectan a los procesos de transmisión, en cambio cuando la luz incide en un vaso sanguíneo, se encuentra una fuerte absorción.

El agua. El rango de absorción del agua se encuentra entre 700 y 1100 nm, lo podemos observar en la siguiente figura. Dentro de la ventana de transmisión del agua, se observa que la absorción es bastante baja, pero sigue contribuyendo de forma significativa a la atenuación global del tejido.

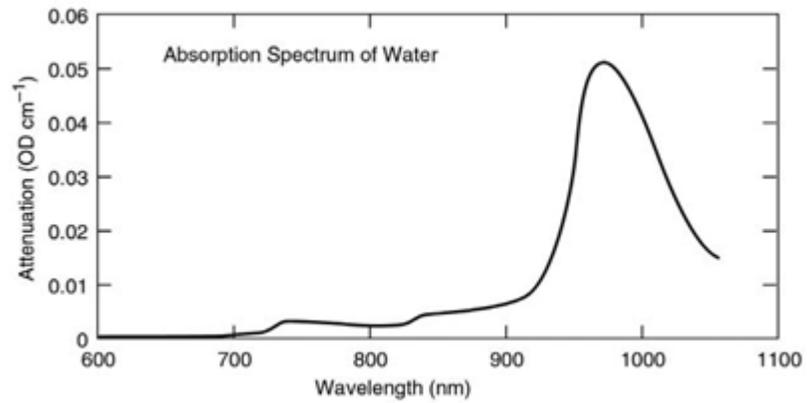


Figura 2.3: Representación de la absorción del agua [7].

2.5. Mecanismos de interacción

2.5.1. Introducción

Existen múltiples mecanismos de interacción estos son producidos al aplicar la luz láser a los tejidos biológicos. Esta diversidad en los mecanismos viene dada por las características específicas de los tejidos, así como los parámetros láser. Como se comenta en capítulos anteriores las propiedades ópticas más importantes con los coeficientes de reflexión, absorción y dispersión. En este capítulo se tratarán las propiedades térmicas como la conducción del calor [9].

Hoy en día el número de posibles combinaciones de los parámetros experimentales es ilimitado, por eso los clasificamos principalmente en cinco categorías de tipos de interacción. Se trata de interacciones fotoquímicas, térmicas, fotoablación, ablación inducida por plasma y fotodisrupción. En este capítulo se analizan los principios físicos que rigen estas interacciones.

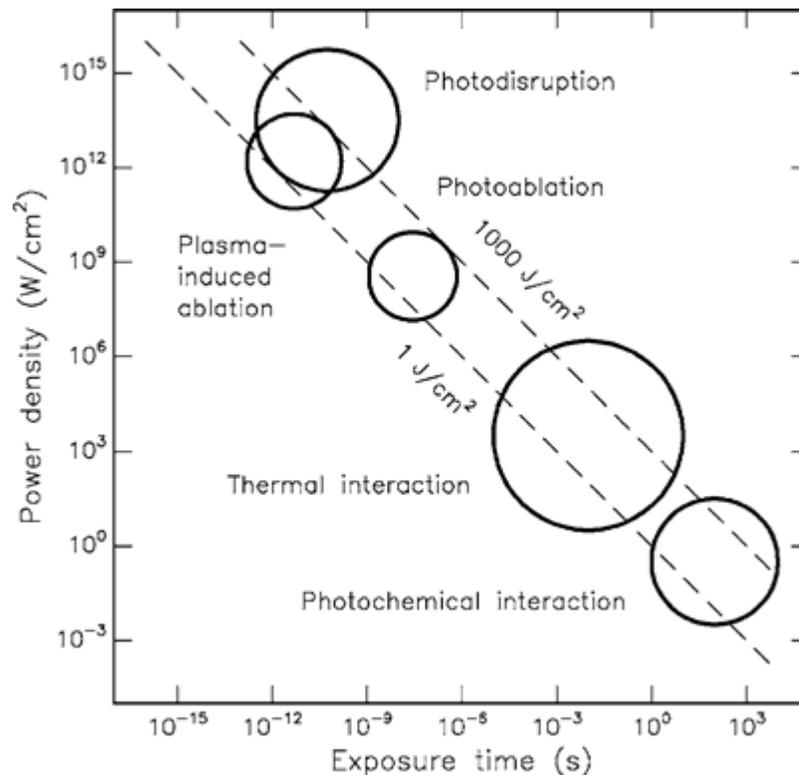


Figura 2.4: Mapa interacción tejido-láser [16]

En la anterior figura se muestra un mapa logarítmico doble con los cinco tipos básicos de interacción. En el eje de ordenadas se expresa la densidad de potencia o irradiancia,

mientras que en la abscisa representa el tiempo de exposición en segundos. En ella vemos como la densidad de energía total para las aplicaciones médicas del láser oscila entre 1 J/cm² y 1000 J/cm².

2.5.2. Interacción fotoquímica

A través de las observaciones empíricas de la luz induciendo efectos y las reacciones químicas en las macromoléculas o tejidos surge el grupo de las interacciones fotoquímicas. Dentro del campo de la física médica del láser, estos mecanismos de interacción fotoquímica desempeñan un papel importante durante la terapia fotodinámica (TFD).

Las interacciones fotoquímicas tienen lugar a densidades de potencia muy bajas y tiempo de exposición largos. La selección cuidadosa de los parámetros del láser produce una distribución de la radiación en el tejido que está determinada por la dispersión. Se utilizan en la mayoría de los casos longitudes de onda dentro del rango visible.

2.5.2.1. Terapia fotodinámica

En la actualidad la idea de la terapia fotodinámica se ha convertido en uno de los principales pilares del tratamiento moderno del cáncer.

La terapia fotodinámica se realiza de la siguiente manera: en primer lugar se inyecta un fotosensibilizador en una vena del paciente, las horas siguientes se distribuye un derivado de la hematoporfirina por todos los tejidos blandos, exceptuando el cerebro. Después de 48-72 horas, la mayor parte se elimina del tejido sano. La irradiación láser suele tener lugar después del tercer día y hasta el séptimo día después de la inyección si son necesarios varios tratamientos.

El procedimiento general de la terapia fotodinámica se ilustra en la figura 2.5

La principal aplicación en el campo de la terapia fotodinámica es el tratamiento de tumores pero no es la única aplicación. Se ha estudiado posibles efectos bactericidas de las porfirinas activadas por láser, y el efecto de diferentes fotosensibilizadores sobre una bacteria común de las placas dentales.

El campo de la terapia tumoral fotodinámica acaba de empezar a desarrollarse. Aunque se ha avanzado mucho en el tratamiento aún queda mucho por investigar. Las conclusiones a sacar deben ser cuidadosas respecto a su eficiencia, indicaciones y posibles contraindicaciones. Los resultados deben ser comprobados con otros métodos mínimamente invasivos de tratamiento de tumores, como por ejemplo la exposición a la radiación ionizante.

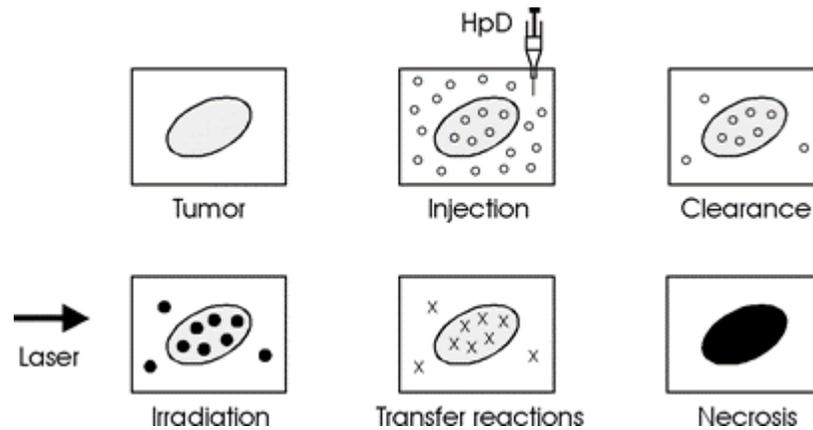


Figura 2.5: Esquema terapia fotodinámica [16].

2.5.2.2. Bioestimulación

Hasta ahora el término bioestimulación no ha sido bien definido científicamente. Los posibles efectos de las potencias láser extremadamente bajas en los tejidos biológicos han sido objeto de controversia. Existen casos en los que se han observado la curación de heridas y propiedades antiinflamatorias de las fuentes de luz roja. Pero la realidad es que sólo en unos pocos estudios, los resultados pudieron ser verificados por grupos de investigación independientes.

Los estudios más significativos sobre bioestimulación demuestran la variedad de posibles campos de aplicación. También es de comentar que sólo se trataron muy pocos pacientes y no se establecieron ciertos prototipos clínicos.

2.5.3. Interacción térmica

El término interacción térmica se refiere a un amplio grupo de tipos de interacción, donde el aumento de la temperatura local es el camino de parámetro significativo.

Los efectos térmicos pueden ser inducidos por radiación láser de onda continua o pulsada, mientras que los procesos fotoquímicos se rigen a menudo por una vía de reacción específica.

Dependiendo de la duración y el valor máximo de la temperatura tisular alcanzada se distinguen distintos efectos.

A continuación se presentan modelos detallados de generación de calor, transporte de calor y los efectos térmicos asociados.

Coagulación.

Para detectar la zona coagulada se hace teñiendo el tejido con hematoxilina, vemos como el tejido coagulado aparece más oscuro que el resto de los tejidos.

Vaporización.

La vaporización se denomina a veces como un efecto termomecánico debido al aumento de presión. Al aumentar la presión el agua absorbe la longitud de onda lo que conduce a la vaporización dentro de estas capas. Este aumento de presión conduce a microexplosiones localizadas.

Carbonización.

A temperaturas superiores a unos 100^oc el tejido comienza a carbonizarse, es decir, se libera carbono, lo que provoca un ennegrecimiento del color. Para las aplicaciones médicas del láser, la carbonización debe evitarse en cualquier caso.

Fusión.

Se produce por la tensión térmica que proviene de un gradiente de temperatura local. La duración del pulso de unos pocos microsegundos es lo suficientemente larga como para permitir un aumento suficiente de la temperatura.

La temperatura es el elemento que modela todas las interacciones térmicas entre el láser y el tejido.

A continuación vamos a establecer los fundamentos de esta respuesta a la interacción térmica. A nivel microscópico los efectos térmicos tienen su origen en la absorción, esto ocurre con un aumento de temperatura que origina la transferencia de energía fotónica a energía cinética.

El grado de daño en el tejido depende principalmente de la magnitud, el tiempo de exposición y la ubicación del calor depositado en el tejido.

2.5.3.1. Generación de calor

Mediante el proceso descrito en el apartado anterior, se genera calor dentro del tejido mediante una exposición al láser. La deposición de calor en el tejido se debe únicamente a la luz que se absorbe en el tejido.

2.5.3.2. Transporte de calor

En el terreno de las interacciones reales entre el láser y el tejido, se tiene que tener en cuenta las pérdidas de calor. Éstas pérdidas tienen su base en la conducción del calor o la radiación de este.

Un ejemplo típico de la convección de calor en los tejidos es la transferencia de calor debido al flujo sanguíneo.

Debido a las temperaturas moderadas y a la baja microcirculación y el aporte de sangre y oxígeno a los tejidos alcanzan en la mayoría de las interacciones láser-tejido, la radiación de calor puede despreciarse a menudo.

Si se quiere tratar la descomposición térmica de los tejidos, es importante ajustar la duración del pulso láser para minimizar el daño térmico a las estructuras adyacentes, y obtener así la menor necrosis posible. En cambio el daño térmico del tejido no descompuesto es insignificante.

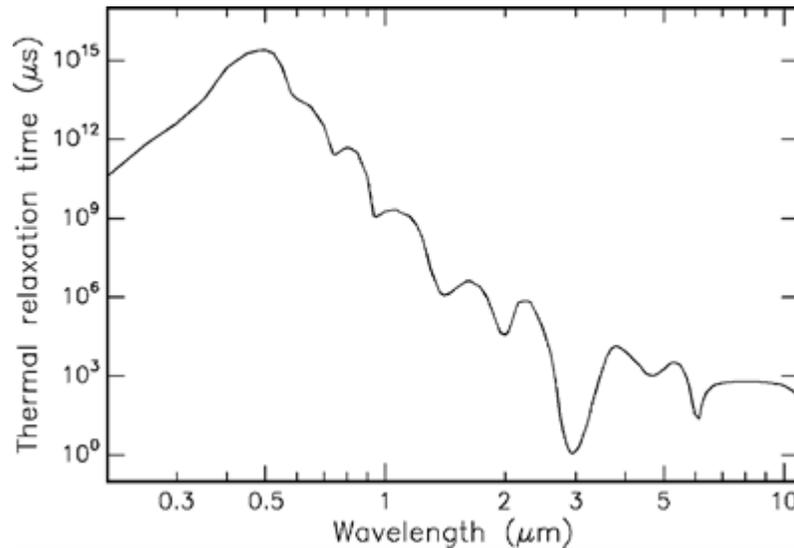


Figura 2.6: Tiempos de relajación térmica del agua [7].

En la figura anterior se muestran los tiempos de relajación térmica del agua. En esta figura se observa que el tiempo de relajación térmica más cortos ocurre en el pico de absorción del agua cerca de $3\mu\text{s}$. Por lo tanto, las duraciones de los pulsos láser no suelen estar relacionadas con el daño térmico.

2.5.3.3. Efectos del calor

Se pueden estimar valores aproximados de las temperaturas alcanzables, aunque estas pueden ser múltiples dependiendo del tipo de tejido y de los parámetros del láser que se elijan. En este apartado se hablará de las alteraciones tisulares más importantes.

Suponiendo una temperatura corporal de 37°C y hasta los 41°C no se observan efectos relevantes. Uno de los efectos por los que esto se podría modificar es la conformación de moléculas.

A partir de los 42°C a 50°C se usa el término único de hipertermia, y en el caso de que esta hipertermia dure más de varios minutos un porcentaje significativo del tejido sufrirá necrosis.

Si nos vamos a temperaturas superiores de 50°C se observa una reducción de la actividad enzimática, lo que provoca una reducción de la transferencia de energía dentro de la célula. Esto provoca una reducción de las células supervivientes.

A 60°C se produce la desnaturalización de las proteínas y el colágeno, lo que provoca la coagulación del tejido y la necrosis de las células.

Por encima de estas temperaturas la permeabilidad de la membrana aumenta drásticamente, rompiendo el equilibrio de las concentraciones químicas.

A 100°C comienza la vaporización de las moléculas de agua. Debido a la vaporización se produce un aumento del volumen lo cual provoca que se creen burbujas de gas que inducen a rupturas mecánicas y a la descomposición térmica de los fragmentos de tejido.

Con temperaturas superiores a 100°C el efecto creado es carbonización que es observable por el ennegrecimiento del tejido y la expulsión de humo.

En la siguiente figura se ilustra cómo se relacionan la temperatura crítica y la duración temporal correspondiente si se pretende que se produzcan daños irreversibles.

2.5.3.4. LITT. Termoterapia intersicial inducida por láser

LITT, Laser-Induce Interstitial Thermotherapy, es una novedosa técnica de tratamiento de tumores denominada termoterapia intersticial inducida por láser. Se usa para tratamiento de varios tipos de tumores, como pueden ser retina, cerebro, próstata... y se ha convertido en una herramienta bien establecida en la cirugía mínimamente invasiva (CMM).

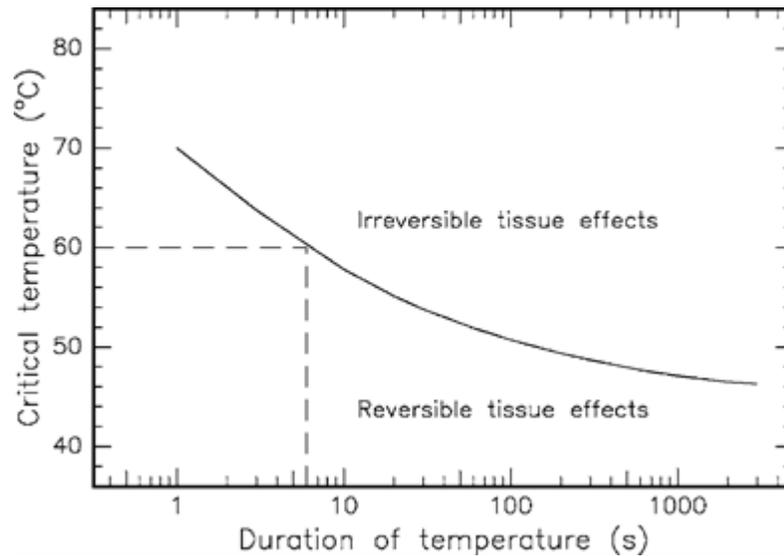


Figura 2.7: Temperaturas críticas para que ocurra la necrosis celular [16]

La idea principal es colocar un aplicador láser adecuado dentro del tejido que se va a coagular, lograr la necrosis calentando las células a una temperatura por encima de los 60°C.

Para aplicar con seguridad esta técnica es necesario conocer la zona de daño final. Especialmente en el ámbito de la neurocirugía para evitar lesiones de los tejidos sanos adyacentes y las estructuras sensibles.

La potencia del láser, la exposición al láser, la geometría del aplicador y las propiedades térmicas y ópticas del tejido, son aspectos a tener en cuenta para calcular la extensión espacial de la zona de daño.

Las zonas más profundas se alcanzan por el mecanismo de dispersión de la luz que por la conducción del calor.

Se utilizan unos aplicadores mejorados que dispersan la luz láser isotrópicamente en todas las direcciones espaciales.

Para coagular con seguridad grandes volúmenes de tejido con un gradiente de temperatura moderado, utilizamos la luz láser emitida desde un extremo del distal del fiber, por otro lado, el catéter protege el fiber de la tensión mecánica, y la refrigeración del catéter puede ayudar a evitar daños térmicos en la punta de la fibra.

En general se distinguen dos tipos de aplicadores LITT, por un lado están los dispersores de superficie y por otro los dispersores de volumen.

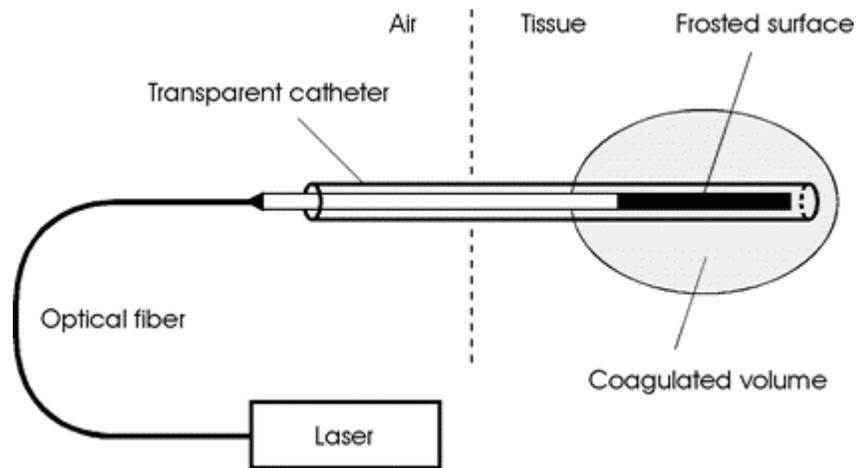


Figura 2.8: Setup experimental del LITT [7]

En los dispersores de superficie, la luz se dispersa en la superficie del aplicador, esto provoca un perfil de dispersión menos homogéneo. Mientras que en los dispersores de volumen, la luz es dispersada por pequeños centros de dispersión distribuidos por todo el volumen del aplicador. El material está hecho de cuarzo bruto y los centros de dispersión por lo tanto consisten en pequeñas burbujas de gas.

2.5.4. Fotoablación

La propuesta de la fotoablación es descomponer un material después de exponerlo a una irradiación láser muy intensa. La profundidad está determinada por la energía del pulso hasta un cierto límite de saturación.

Las principales ventajas de esta técnica de ablación residen en la precisión del proceso de grabado. En la actualidad es una de las técnicas más exitosas para la cirugía refractiva de la córnea. Con ello se puede tratar la miopía, hipermetropía o astigmatismo.

2.5.4.1. Modelo de fotoablación

Se utiliza este sencillo modelo para explicar la fotoablación. En la siguiente imagen tenemos la curva de ablación de la córnea de conejo. Esta sección de la curva de ablación la podemos encontrar en cualquier tipo de tejido.

Podemos observar un umbral I_{ph} no muy agudo, para ello se observa la pendiente de la curva se aproxima a cero cuando se intercepta con la abscisa. Este resultado se debe a la

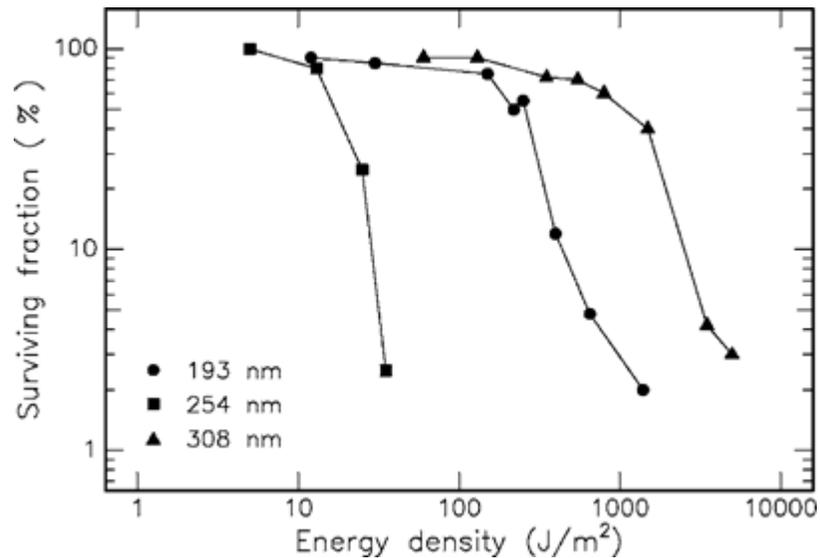


Figura 2.9: Fracción superviviente de células de ovario de hámster chino tras la irradiación UV[16]

inhomogeneidad del fragmento. Para una descripción matemática debe tenerse en cuenta la forma temporal de los pulsos láser.

2.5.4.2. Citotoxicidad de la radiación UV

La citotoxicidad es un tipo de reacción inmunitaria por la que una célula o microbio determinados se recubren con anticuerpos y son destruidos por ciertos tipos de glóbulos blancos.

El efecto de la radiación UV sobre las células y tejidos biológicos se inicia mediante reacciones fotoquímicas de los cromóforos que contienen. Estos efectos citotóxicos de la radiación UV han sido investigados por varios grupos, en general se puede concluir que la capacidad relativa de la radiación láser para causar defectos en el ADN disminuye en el orden de $248\text{nm} > 193\text{nm} > 308\text{nm}$.

Se han realizado varios estudios para evaluar los peligros potenciales de la radiación láser UV. Por lo general, los efectos de uno o dos láseres de excímeros se compararon entre sí y con lámparas de Hg de baja presión.

En la figura se puede observar la fracción superviviente de células de ovario de hámster después de la exposición a tres fuentes de luz diferentes. Al comparar el láser ArF a 193 nm y el láser XeCl a 308 nm, este último es menos citotóxico.

En general la dificultad para juzgar la gravedad de los efectos reside en largos periodos de seguimiento durante los cuales pueden desarrollarse las enfermedades. Por ejemplo, a

los pocos años de haber realizado una cirugía de la córnea con láseres excímeros, observan una frecuencia opaca en el interior de la córnea, la cual tiene un origen desconocido que podría atribuirse a alteraciones celulares, sin llegar a producir tumores corneales.

2.6. Conclusiones

Como consecuencia de lo expuesto en este capítulo es importante que quede recalado la importancia de las propiedades ópticas fundamentales y como afectan a la propagación de la luz en un tejido. Siendo así la refracción, dispersión y absorción los procesos más significativos.

En cuanto al transporte de la luz en los tejidos, como se comentaba, las variaciones que sufren en términos de propagación de la luz la mayoría de tejidos humanos hacen que sean fuertes dispersores de luz. El modelo más reseñable es el de Transporte de la radiación ya que en lugar de seguir las ondas de luz, se extrae la energía que contienen.

En relación con lo expuesto acerca de los mecanismos de interacción, las interacciones fotoquímicas son características para densidades de potencia muy bajas y tiempo de exposición largos, mientras que la interacción térmica se rigen a menudo por una vía de reacción específica, y estas a su vez dependiendo de la duración se distinguen en distintos efectos, y por último la fotoablación trata de descomponer un material al exponerlo a una irradiación láser muy intensa. Que es en la actualidad una de las técnicas más exitosas para la cirugía de la córnea.

Capítulo 3

Modelos ópticos para medios biológicos de bajo contraste

3.1. Introducción

Un tejido biológico es un medio ópticamente no homogéneo y absorbente, se tiene en cuenta las propiedades de dispersión y absorción de sus componentes ya que son las que condicionan la propagación de la luz dentro de un tejido biológico. Los parámetros más importantes en la propagación de medios turbios son el tamaño, la forma y la densidad de las partículas.

Los medios de bajo contraste óptico son aquellos que tienen una varianza del índice de refracción pequeña. La varianza de estos índices de refracción da lugar a la dispersión, refracción y reflexión, y a su vez repercute en que el contraste de la imagen analizada sea mayor o menor.

Por eso, es tan importante avanzar en este tipo de técnicas de imagen para medios de contraste débil, ya que los microscopios convencionales tienen sus limitaciones a la hora de estudiar casos de este tipo.

Actualmente se está centrando mucha atención en la investigación de las propiedades de polarización de la propagación de la luz en medios de dispersión intensa, sin dejar de lado la naturaleza vectorial de la propagación de las ondas de luz que tiene especial importancia en los tejidos transparentes.

Las ondas de luz en los medios de dispersión se manifiestan como la polarización de una luz inicialmente no polarizada o como la despolarización de un haz inicialmente polarizado que se ha propagado en un medio.

Existen varias formas de entender la anisotropía, por un lado la anisotropía de pola-

rización tisular se muestra como una birrefringencia lineal y está causada por estructuras fibrosas. La anisotropía de forma se llama cuando el índice de refracción del medio es mayor a lo largo de las fibras que a lo ancho. Algunas moléculas de las estructuras de tejidos, como por ejemplo la keratina o la glucosa, son responsables de lo que se denomina anisotropía material de los tejidos.

Para poder desarrollar un modelo óptico apropiado para el tejido particular que se está considerando debemos extraer la información e interpretar los resultados experimentales de la radiación dispersa, ya que contiene diferente información característica sobre los tamaños y formas de los elementos estructurales del tejido, su orientación, constantes ópticas y otros parámetros.

En este capítulo se tratan cuestiones como los diferentes enfoques en el modelado, tejidos continuos y discretos. Estos son caracterizados por diferentes tamaños, e índices de refracción y por ello se tratan de formas diferentes.

Seguido de la sección que acabamos de comentar pasamos a hablar del rango y distribución de las células, y en como varían estos en los diferentes elementos.

Las variaciones en el índice de refracción y de absorción son importantes ya que nos transmiten información directa del tejido que vamos a analizar, con ello podemos crear el espectro de absorción, y sacar valiosos datos.

En la siguiente sección la anisotropía tisular es la protagonista, se explica esta propiedad de la materia, al igual que la birrefringencia de forma. Y por último para acabar de conocer las propiedades de las partículas discretas, se trata la fracción de volumen ocupada por las partículas, también conocida como la densidad de empaquetamiento, y la organización espacial de las partículas.

En la última sección se comenta sin entrar en mucho detalle, qué son los fractales, el concepto fractal, la dimensión fractal, así como las propiedades fractales de los sistemas aleatorios.

3.2. Modelos de tejidos continuos y discretos

Actualmente se utilizan dos enfoques para el modelado de tejidos, por un lado tejidos modelados como un medio con una distribución espacial aleatoria continua de parámetros ópticos, estos los conocemos como tejidos continuos.

Estos tejidos son caracterizados por estructuras con una amplia gama de tamaños, y la mayoría cuentan con inhomogeneidades del índice de refracción con una escala espacial variable. El hecho es de fundamental importancia en diferentes ocasiones para comprender

las peculiaridades de la transferencia de radiación en los tejidos, y su vez para la solución del problema en inverso de la reconstrucción de la estructura tisular.

Por otro lado, tenemos los tejidos discretos, su nombre viene de que están modelados por un conjunto discreto de dispersores. El mejor ejemplo de un sistema que corresponda a un modelo discreto de partículas es la sangre.

Este tipo de modelado de tejidos se ha utilizado para describir la dependencia angular de las características de polarización en radiación dispersa.

Los medios biológicos están modelados como conjuntos de partículas esféricas homogéneas, esto es así debido a la forma que tienen medios como las células o microorganismos que suele ser similar a esferas o elipsoides. Existen también modelos de tejidos más simples en los que los sistemas de partículas esféricas no interactúan.

La teoría de Mie explica un modelo donde se tiene en cuenta este tipo de estructuras de las partículas esféricas, es decir, las esferas multicapa y las esferas con no homogeneidad radial, anisotropía y actividad óptica.

3.3. Rango y distribución

3.3.1. Rangos y tamaños

El tamaño de las células y de la estructura de los tejidos de los elementos varían entre algunas docenas de nanómetros y cientos de micrómetros.

Dentro de las células de sangre pueden variar entorno a los siguientes parámetros:

Tipo	Tamaño (μm)
Eritrocitos	7,1-9,2
Leucocitos	8-22
Plaquetas	2-4

Tabla 3.1: Diámetro células de la sangre

En los tejidos fibrosos o tejidos que contienen capas de fibras, como pueden ser la córnea, madre dura, músculo, mitocardio, tendón, cartílago... están compuestos por microfibras y sus diámetros típicamente rondan entre los 10-400nm. Y su longitud entra en un rango de entre 10-25 μm a unos pocos de milímetros.

Adicionalmente, existen variedad de estructuras de la célula que determinan la dispersión de la luz en los tejidos.

Tipo	Tamaño
Núcleo celular	$5 - 10\mu m$
Mitocondria, lisosomas y perisomas	$1 - 2\mu m$
Ribosomas	20 nm

Tabla 3.2: Medidas estructuras intracelulares

3.3.2. Distribuciones

En la óptica de sistemas las típicas distribuciones son Gaussianas, gamma o de tamaño de potencia. En cuanto a la distribución del tamaño de las partículas dispersas, no existe una función de tamaño de distribución universal que describa todos los tejidos con la misma adecuación, dependiendo del tejido puede ser monodispersiva o por el contrario muy amplia.

La polidispersión se explica mediante el uso de la distribución gamma o la distribución logarítmica sesgada de los diámetros, secciones transversales o volúmenes de los dispersores.

$$\eta(a) = a^\mu * \exp(-\mu\beta) \tag{3.1}$$

La anterior fórmula explica la función de distribución de radios gamma aplicable a tejidos turbios. En ella μ es la mitad del ancho de la distribución y a es el radio de dispersión más probable.

Para proporcionar un buen modelo de tejido patológico se necesita un sistema de dos fases que a su vez está compuesto por un conjunto de partículas pequeñas del mismo tamaño y una fracción menor de las más grandes.

Cuando se habla de las células epiteliales y sus estructuras de dispersión de núcleos, se usan distribuciones de tamaño log-normal de partículas esféricas o elipsoidales ligeramente alargadas.

$$\eta(a) = (1/a\sigma\sqrt{2 * \pi} * \exp-[ln(a) - ln(a_m)]^2/2\sigma^2 \tag{3.2}$$

Si se trata de una descripción de la dispersión por partículas de forma más compleja, existen diferentes procedimientos como por ejemplo el método de matrices T. Para modelarse se usan dispersores las propias células como agregados de partículas esféricas.

3.4. Variaciones del índice de refracción y absorción

Las variaciones locales del índice de refracción son provocadas en gran medida por las componentes tisulares, dentro de estas nos referimos a las fibras del tejido conjuntivo, orgánulos citoplasmáticos, núcleos celulares y gránulos de melanina.

La figura de a continuación muestra un perfil de índice hipotético formado midiendo el índice de refracción a lo largo de una línea en una dirección arbitraria a través de un tejido. Las diferentes características de los índices depende de los elementos.

En este modelo, las variaciones del índice pueden estar representadas por un volumen estadísticamente equivalente de partículas discretas [14] que tienen el mismo índice pero diferentes tamaños. Los anchos de los picos cuando se mide índice real son proporcionales a los diámetros de los elementos, mientras que sus alturas dependen del grado de refracción de cada elemento en relación con el de sus alrededores.

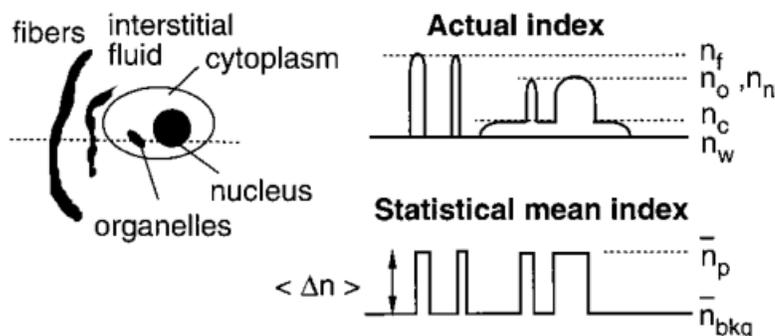


Figura 3.1: Perfil de índice hipotético formado al medir el índice de refracción a lo largo de una línea en una dirección arbitraria a través de un volumen de tejido blando [17].

Nuestro objetivo aquí es modelar el origen de las variaciones del índice por un volumen estadísticamente equivalente de partículas discretas que tienen el mismo índice pero diferentes tamaños.

La ley de Gladstone y Dale se utiliza en materiales no homogéneos donde los índices de refracción de las fibrillas, el medio intersticial y el tejido en sí. Esta ley establece que el valor resultante representa un promedio de los índices de refracción de los componentes relacionados con sus fracciones de volumen:

$$\bar{n} = \sum_{i=1}^N n_i f_i \sum_i f_i = 1 \quad (3.3)$$

La explicación reside en n es el índice de refracción, la f se refiere al volumen de los componentes individuales y N el número de componentes.

En la siguiente figura viene representados las bandas de absorción de hemoglobina sanguínea y algunos otro cromóforos, en la mayoría de los tejidos la región visible es insignificante.

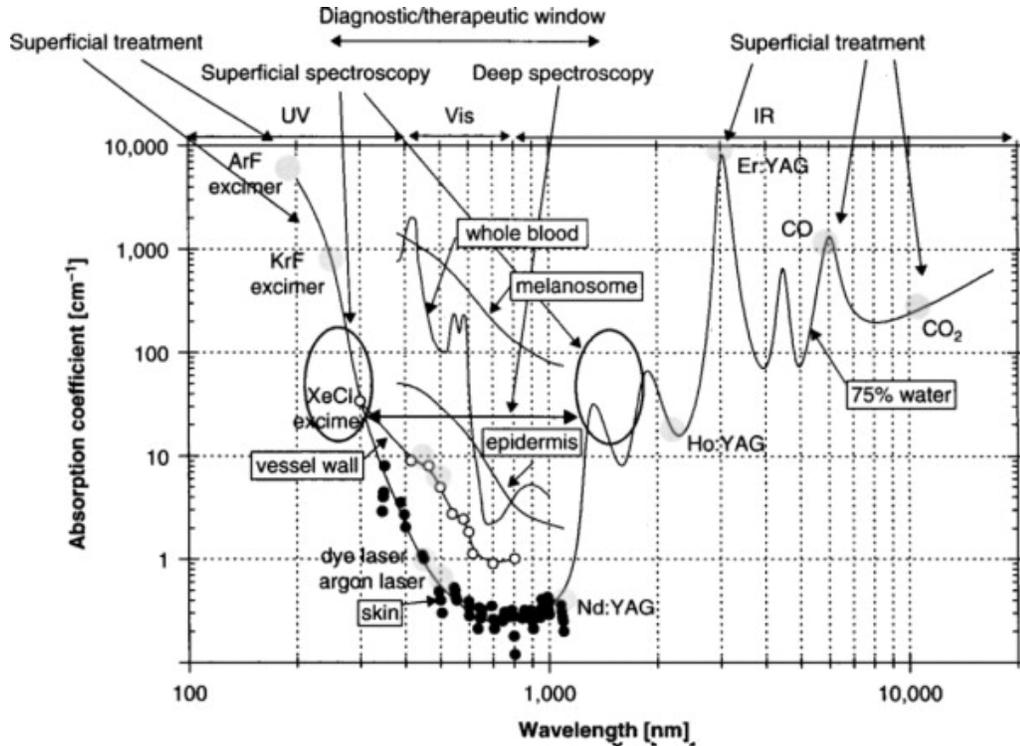


Figura 3.2: Espectro de absorción de la piel y la aorta [18].

Dentro de la ventana de diagnóstico en la región más cercana a los rayos UV tenemos las bandas de absorción de las moléculas. Las inhomogeneidades del tejido tienen tamaños comparables o menores que las longitudes de onda visibles o NIR y pequeños índices relativos de refracción.

En la parte derecha de la imagen tenemos la región IR la absorción en esta se define esencialmente por el agua contenida en los tejidos. Para la mayoría de los tejidos el parámetro de las partículas $x = \frac{2*\pi*r}{\lambda}$ varía en un rango de entre $0,1 < x < 100$. La absorción de partículas es bastante pequeña en este rango de longitud de onda.

Queda por resaltar que las inhomogeneidades del tejido tienen tamaños comparables o menores que las longitudes de onda visibles o NIR y pequeños índices relativos de refracción.

3.5. Anisotropía tisular

La anisotropía (opuesta de isotropía) es la propiedad general de la materia según la cual cualidades como elasticidad, temperatura, conductividad, velocidad de propagación de la luz, etc., varían según la dirección en que son examinadas.

Muchos tejidos biológicos son ópticamente anisotrópicos. La anisotropía lineal de las estructuras fibrosas que forman el medio extracelular es el principal responsable de la birrefringencia tisular.[17]

Según lo anteriormente comentado el índice de refracción de un medio a su vez varía, por lo que aumenta más a lo largo de una fibra a que a lo largo de una sección transversal.

Lo que se conoce como birrefringencia de forma es una estructura de tejido específica. Esta crea un sistema compuesto por cilindros paralelos que origina un medio birrefringente uniaxial con el eje óptico paralelo a los ejes de los cilindros.

La birrefringencia de forma se da en una gran variedad de tejidos, como la córnea del ojo, el tendón, el cartílago, etc.

El tendón está formado principalmente por fibras de colágeno paralelas densamente empaquetadas. Entre los haces de fibras de colágeno hay fibroblastos largos y elípticos en forma con diámetros de entre 20 y 40nm. La estructura ordenada de fibras de colágeno paralelas a un solo eje hace que el tendón sea un tejido altamente birrefringente.

Las arterias son una estructura mucho más compleja que el tendón. La capa media está formada en su mayoría por células musculares lisas estrechamente empaquetadas con un diámetro medio de 15 a 20 μm . La capa más externa de los vasos consiste en un tejido conectivo fibroso con un diámetro de 11-23 μm .

El miocardio por otra parte, contiene fibras orientadas a lo largo de dos ejes diferentes. Consiste en su mayor parte en fibras musculares cardíacas dispuestas en láminas que se enrollan alrededor de los ventrículos y las aurículas. Es birrefringente ya que el índice de refracción a lo largo del eje de la fibra muscular es diferente al de la dirección transversal.

La birrefringencia de forma viene dada cuando la fase óptica relativa entre los componentes de polarización ortogonal es distinta de cero para la luz dispersada hacia adelante. Una vez que se han hecho múltiples eventos de dispersión directa, la diferencia de fase relativa va en aumento y es ahí donde se introduce un retardo similar al observado en materiales cristalinos birrefringentes entre los componente de polarización ortogonal.

El retardo de fase δ , entre componentes de polarización ortogonal, es proporcional a la distancia recorrida a través del medio birrefringente.

$$\delta = \frac{2\pi\Delta nd}{\lambda} \quad (3.4)$$

El aumento en el retardo de fase puede caracterizarse por una diferencia Δn en el índice de refracción efectivo para la luz polarizada a lo largo y perpendicular al eje largo de las estructuras lineales. Es por esta razón por la que en la fórmula anterior se da uso para estructuras lineales organizadas.

Para que un medio sea birrefringente uniaxial y positivo se debe cumplir la siguiente condición:

$$\Delta_n = (n_e - n_o) > 0 \quad (3.5)$$

a su vez es característica de un medio de cilindros paralelos, con su eje óptico paralelo a los ejes de los cilindros.

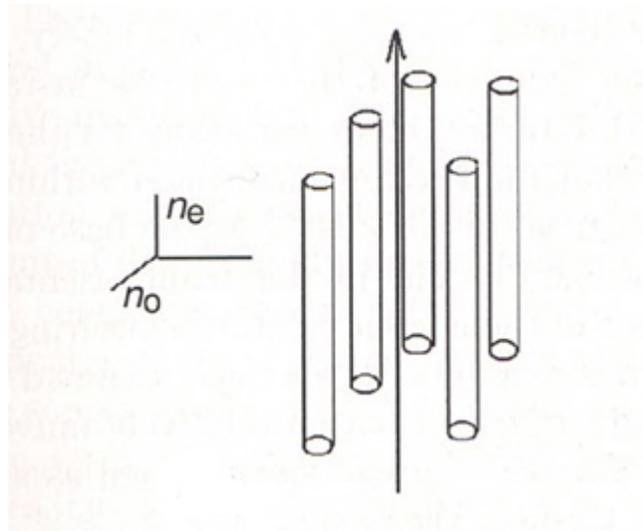


Figura 3.3: Sistema de cilindros de longitud dieléctrica [18]

Existen dos casos diferentes, por un lado el definido por un campo eléctrico incidente dirigido paralelo al eje del cilindro denominado como "extraordinario", y un caso con el campo eléctrico incidente perpendicular a los ejes del cilindro denominado "ordinario". La diferencia entre el índice de uno y de otro, lo que denominamos $(n_e - n_o)$ es una medida de la birrefringencia de un medio compuesto por cilindros.

Cuando se da el límite de Rayleigh, es decir, se cumple λ diámetro del cilindro, la forma de birrefringencia se convierte en:

$$\Delta_n = (n_e - n_o) = \frac{f_1 f_2 (n_1 - n_2)^2}{f_1 n_1 + f_2 n_2} \quad (3.6)$$

donde f_1 se corresponde a la fracción de volumen de los cilindros, f_2 es la fracción de volumen de la sustancia $n_1 n_2$ son los índices correspondientes.

La utilidad de la birrefringencia de forma es aplicada en la microscopía biológica como instrumento para estudiar la estructura celular. Conociendo n_1 y n_2 se puede evaluar la fracción de volumen ocupada por las partículas. El signo de la diferencia observada del índice de refracción ocupa a la capa de partículas más cercanas a la de la varilla o la placa. Para separar la birrefringencia de la forma y los materiales de las partículas, los índices de refracción de las partículas y la sustancia fundamental deben coincidir, porque la birrefringencia de la forma desaparece como $n_1 = n_2$.

El dicroísmo lineal ó diatenuación, se refiere a la atenuación de onda diferente para dos polarizaciones ortogonales, en un sistema formado por cilindros largos o placas, lo que le da su nombre es la diferencia entre las partes imaginarias de los índices efectivos o de refracción. Los valores positivos o negativos de la diferencia dependen de la relación entre los tamaños y las constantes ópticas de los cilindros o placas.

La orientación predominante de las fibras colágenas en diferentes regiones de la córnea da lugar a la birrefringencia y al dicroísmo.

Una nueva técnica, la tomografía de coherencia óptica sensible a la polarización, permite una alta precisión en la medida de la birrefringencia lineal en tejidos turbios. Los siguientes datos han sido recogidos mediante esta técnica:

Tipos de tejidos	Medida
Músculo de roedor	$1,4x10^{-3}$
Tendón porcino	$4,2x10^{-3}$
Cartílago bovino	$3x10^{-3}$
Tendón bovino	$3,7x10^{-3}$

Tabla 3.3: Medidas con la técnica PS OCT ó tomografía de coherencia óptica sensible a la polarización

La magnitud de la birrefringencia y la diatenuación están relacionadas con la densidad y otras propiedades de las fibras de colágeno, donde la orientación de los ejes nos da la información acerca de las fibras de colágeno. En cuanto la amplitud y la orientación de la birrefringencia de la piel y el cartílago no están tan uniformemente distribuidas como en el tendón.

La densidad de las fibras de colágeno en la piel y cartílago no son tan uniformes como en el tendón, y la orientación de las fibras de colágeno no están tan ordenadas.

Existen cambios transitorios en la birrefringencia que nos dan información funcional de algunos sistemas biológicos. Por lo tanto, estos cambios pueden indicar cambios en la funcionalidad, estructura o viabilidad de los tejidos.

La birrefringencia lineal y el dicroísmo nos muestran actividad óptica pero además existen muchos componentes tisulares para ello. Si se utiliza la investigación con luz polarizada, la quiralidad de la molécula que se deriva de su estructura molecular asimétrica se obtiene una serie de efectos característicos llamados genéricamente actividad óptica.

Por otra parte, otra actividad bien conocida es la capacidad de la actividad óptica de rotar el plano de la luz polarizada linealmente en un eje de propagación. La cantidad de rotación depende de la concentración molecular de crisálida, la longitud de la trayectoria a través del medio y la longitud de la onda de luz.

Una molécula quiral puede definirse como aquella que no se puede superponer con su imagen especular. El término quiral se usa para describir moléculas que se relacionan de la misma manera que la mano derecha e izquierda, es decir que son imágenes especulares y no se superponen.

Los tejidos que contienen componentes quirales muestran actividad óptica. Existe un especial interés en los medios turbios quirales que está impulsado por la atractiva posibilidad de una monitorización óptica in situ no invasiva de la glucosa en pacientes diabéticos. La pérdida de información dentro de los tejidos turbios es significativa y los efectos debidos a la pequeña cantidad de glucosa disuelta son difíciles de detectar.

En las estructuras de tejidos complejos, los componentes quirales agregadas a partículas son los responsables de la actividad óptica de los tejidos. Algunos ejemplos de tejidos anisotrópicos más sofisticados son, por ejemplo, la córnea del ojo que puede ser representada como un sistema de láminas que se puede observar en la siguiente fotografía:

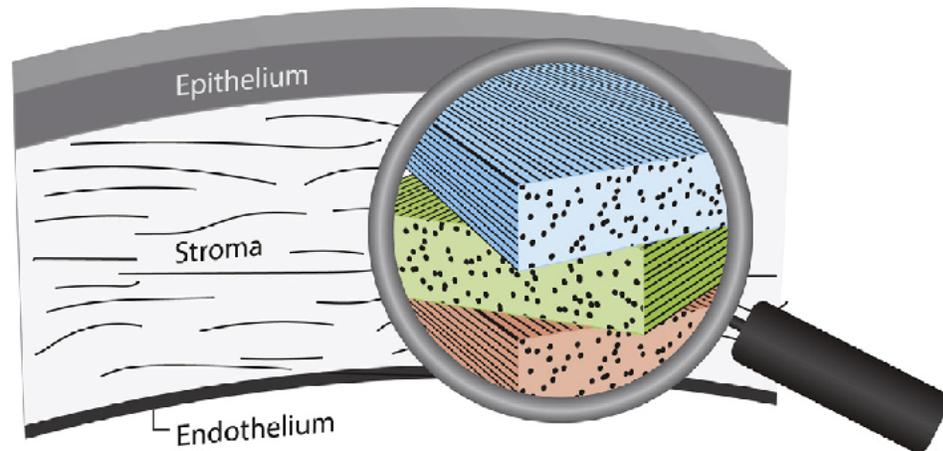


Figura 3.4: Ilustración esquemática de la organización laminar del estroma de la córnea [17]

3.6. Fracción de volumen

La fracción de volumen ocupada por las partículas ó la densidad de empaquetamiento, es una cualidad que caracteriza a un conjunto de partículas discretas. Existen además de la fracción de volumen de las partículas, más características que definen las propiedades ópticas de un conjunto, por ejemplo, el tamaño de las partículas. Estas influyen directamente en el índice de reactivación, la anisotropía óptica y otras características.

Para obtener la fracción de volumen de partícular en un determinado tejido, se utilizan micrografías electrónicas de cortes de tejido. Es una forma sencilla de dar uso a la técnica de corte de tejido.

Esta técnica puede suponer errores sistemáticos, que provienen del corte transversal de partículas 3D dentro del corte examinado. Tales errores conducen a la distorsión de la fracción de volumen ocupada por la dispersión de partículas que también puede lograrse mediante el pesaje de un tejido nativo y el reposo seco.

La fracción de volumen ocupada por las partículas de dispersión en tejidos como la córnea, músculo y las lentes de los ojos, ocupa desde un 20 a 40 %.

En la siguiente imagen se refleja el contenido de la parte sólida de la sangre en $1mm^3$.



Figura 3.5: Contenido en 1mm³desangre.

Las células ocupan un 35-45 % del volumen de la sangre, el restante 60 % es mayoritariamente plasma, como solución acuosa esencialmente transparente de sales

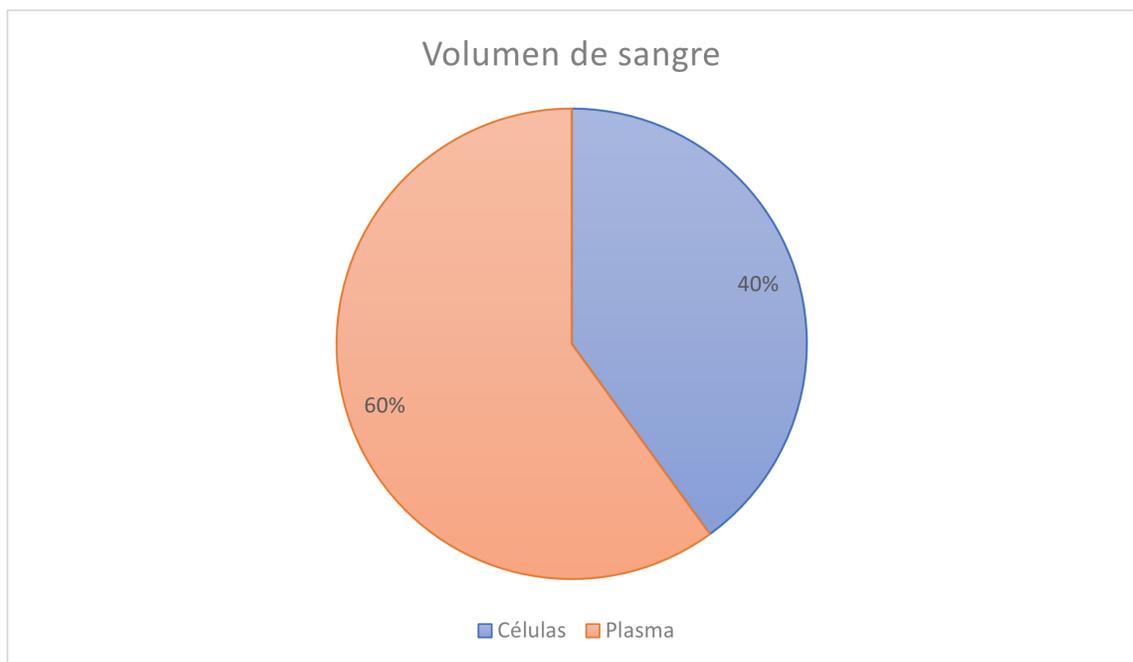


Figura 3.6: Volumen de la sangre

3.7. Orden espacial de las partículas

La organización espacial de las partículas que forman un tejido juega un papel sustancial en la propagación de la luz polarizada. La mayoría de los tejidos se componen de estructuras celular y subcelulares ubicadas muy próximas entre sí.

Cuando estas densidades son muy pequeñas, se produce una señal de dispersión incoherente por partículas independientes. Si esta fracción de volumen ocupada por las partículas es igual o superior a 0.01 - 0.1, aparecen efectos de concentración coherentes. Sin embargo, si la distribución del tamaño de las partículas es bastante estrecha, el empaquetamiento denso implica un cierto grado de orden de la disposición de las partículas.

El ordenamiento espacial es de suma importancia en el tejido óptico del ojo. En una gran variedad de otros tejidos, el ordenamiento espacial también es más o menos inherente, en particular en el tendón, el cartílago, la piel de la duramadre o el músculo. El alto grado de orden en los dispersores densamente empaquetados asegura una alta transmisión en la córnea y el cristalino del ojo. Las estructuras tisulares con variaciones periódicas estadísticamente ordenadas en el índice a escalas características de la longitud de onda de la luz, como los cristales de fotones, exhiben regiones espectrales de alta transmisión y bandas para las que la propagación de las ondas electromagnéticas está prohibida.

La siguiente expresión explica los efectos de correlación entre partículas que son importantes para sistemas con fracciones de volumen de dispersores superiores al 1-10%, ya que dependen del tamaño de las partículas:

$$Wp = \frac{(1 - f_s)^{p+1}}{[1 + f_s(p - 1)]^{p-1}} \quad (3.7)$$

Donde Wp es el factor de empaquetamiento, de un medio lleno con una fracción de volumen f_s . A su vez p es una dimensión de empaquetamiento que describe la velocidad a la que el espacio vacío entre los dispersores disminuye a medida que aumenta la densidad total.

El empaquetamiento de partículas esféricas mediante el empaquetamiento de partículas en forma de hija y de varilla se caracteriza por una p que se acerca a 1 y 2, respectivamente.

Por el hecho de que los elementos del tejido tienen todas estas formas diferentes y pueden exhibir simetría cilíndrica y esférica simultáneamente, la dimensión de empaquetamiento puede estar entre 1 y 5.

Con ayuda de la siguiente fórmula se calculan los coeficientes ópticos a altas concentraciones de partículas, cuando la distribución de tamaño $n(2a)$ debe ser reemplazado por la distribución corregida por correlación.

$$\eta'(2a) = \frac{[1 - \eta(2a)]^{p+1}}{[1 + \eta(sa)(p - 1)]^{p-1}} \eta(2a) \quad (3.8)$$

La mayoría de las propiedades de dispersión observadas de los tejidos blandos tratan el tejido como una colección de partículas dispersas, cuyas fracciones de volumen se distribuyen de acuerdo con una distribución logarítmica normal modificada por un factor de empaquetamiento, para explicar la dispersión correlacionada entre densidades de partículas empaquetadas.

3.8. Propiedades fractales

Un tejido biológico está compuesto generalmente por estructuras complejas con dimensiones que van desde varias docenas de nanómetros a varios milímetros, para investigar la relación entre las propiedades ópticas y las características estructurales se puede emplear una estructura similar a un fractal.

Los fractales son estructuras autosimilares invariantes de escala. Existen varios tipos de fractales, los que se encuentran en la naturaleza se conocen como fractales aleatorios y su estructura muestra autosimilitud solo en un sentido estático.

El concepto fractal permite describir sistemas aleatorios como polímeros, agregados coloidales y tejidos. La dimensión fractal es una medida de cómo el objeto fractal llena el espacio.

En cuanto a la dimensión fractal es una medida de cómo el objeto fractal llena el espacio. También nos puede dar información acerca de la complejidad o rugosidad observada en un objeto aleatorio, ya que existe una correspondencia entre la dimensión fractal y esta.

Las propiedades fractales de los sistemas aleatorios afectan fuertemente su capacidad de dispersión de la luz. La misma masa de partículas puede afectar de diferentes formas, como una pequeña dispersión en un grupo denso, y por otro lado como una dispersión significativamente mayor en uno fractal.

Los efectos fractales en la dispersión múltiple se observan incluso cuando los grupos fractales tienen tamaños más pequeños que la longitud de onda, cuando esto se cumple quiere decir que son sensibles a la polarización de la luz.

El análisis fractal puede proporcionar una base mucho más simple a la hora de analizar los tejidos, se puede aplicar ya que las distribuciones espaciales de los constituyentes de muchos tipos de tejidos satisfacen las condiciones de autosimilitud estática. Con esta au-

to semejanza estática podemos medir un objeto compuesto por bloques con regularidades estadísticas inherentes bajo la misma ley de potencia.

Los tejidos y células biológicas son medios ópticamente no homogéneos y ligeramente absorbentes en los rangos visible y NIR. En la aplicación de teorías o aproximaciones adecuadas para describir las interacciones de la luz polarizada con tipos particulares de tejido, es importante tener en cuenta el rango de tamaño, las formas típicas, los valores de los índices de refracción, las densidades y la disposición de los componentes tisulares que se quieran estudiar. Las propiedades ópticas y estructuras de las células, fibras y otros elementos que componen el tejido, afectan directamente a la propagación de la luz y a las interacciones con el tejido.

3.9. Conclusiones

Haciendo una recopilación de los temas tratados en este capítulo, concluimos que los parámetros más importantes en la propagación de medios turbios son el tamaño, la forma y la densidad de las partículas.

Para poder tener en cuenta este tipo de parámetros es importante saber diferenciar entre tejidos discretos, los cuales se utilizan para, entre otras cosas, describir la dependencia angular de las características de polarización, y los tejidos continuos, los cuales son modelados como un medio con una distribución espacial aleatoria.

La birrefringencia de forma y las ventajas que nos da conocer la anisotropía tisular, se aplica en la microscopía biológica como instrumento para estudiar la estructura celular.

Y por último si queremos una base algo más simple a la hora de analizar los tejidos, se realiza el análisis fractal. Este análisis se puede aplicar a las distribuciones espaciales de muchos tipos de tejidos.

Capítulo 4

Microscopio óptico de contraste de fase: hacia nuevas técnicas basadas en la imagen de fase cuantitativa

4.1. Introducción

El microscopio óptico fue un invento revolucionario y que desempeñó un papel fundamental en la revolución científica. Lleva más de cuatro siglos desarrollándose y abarcando un número cada vez más amplio de métodos.

A pesar de su larga historia, de más de cuatro siglos, el campo de la microscopía se ha ampliado continuamente, abarcando un número creciente de métodos. Los estudios y esfuerzos en este campo han sido dedicados a mejorar la resolución y el contraste.

En cuanto la resolución, el pionero fue Abbe que en 1873 demostró que el límite de la obtención de imágenes es de la mitad de la longitud de onda de la luz. Los investigadores trabajan en esta línea para poder acercarse el máximo a este límite.

Microscopía de contraste de fase cuantitativa es el nombre colectivo para un grupo de métodos de microscopía que cuantifican el desplazamiento de fase que se produce cuando las ondas de luz pasan a través de un objeto ópticamente más denso.

Objetos translúcidos, como una célula humana viva, absorben y dispersan pequeñas cantidades de luz. Esto hace difícil de observar en microscopios ópticos ordinarios objetos translúcidos. Lo que hacen estas técnicas, sin embargo, es inducir un cambio de fase que puede ser observado usando un microscopio de contraste de fase.

En la última década se han desarrollado varios métodos para superar la barrera de la barrera de difracción en la microscopía de fluorescencia de campo lejano.

Dentro del contraste existen dos tipos, por un lado el contraste endógeno o intrínseco se genera revelando las estructuras tal y como aparecen de forma natural. Y por otro lado, el contraste exógeno se produce uniendo un agente de contraste (por ejemplo, un tinte o colorante fluorescente) a la estructura de interés.

Este capítulo viene introducido por una explicación, así como un ligero repaso por la historia de la técnica QPI, dónde se explica los progresos realizados en los últimos 10-15 años hasta llegar a ser un campo centrado en la aplicación, que nos sirve para investigar células y tejidos.

En la sección de investigación multimodal se comenta cómo con unos simples cálculos numéricos como el gradiente, Laplaciano, etc. podemos obtener diferentes características de la imagen que analizamos. Acto seguido, se trata la imagen 3D también conocida como tomografía, como resolución de una propiedad física del objeto en las tres dimensiones.

En cuanto la tercera sección de Características de la imagen, se habla de las diferentes propiedades físicas que podemos analizar en una muestra.

Y por último se centra más en las Teorías de imagen de Abbe y el microscopio de Zernike, que marcaron un antes y un después en un tema tan importante como es la QPI.

4.2. Imagen de fase cuantitativa (QPI)

La imagen de fase cuantitativa (QPI) ha surgido como un método valioso para investigar células y tejidos. Funciona con muestras no marcadas, y es complementaria a la fluorescencia establecida.

Las imágenes representan mapas cuantitativos de los retrasos de la longitud del camino óptico introducidos por el espécimen, la QPI proporciona una medida objetiva de la morfología y la dinámica, libre de la variabilidad debida a los agentes de contraste.

Gracias a los enormes progresos realizados, sobre todo en los últimos 10-15 años, varias tecnologías se han hecho suficientemente fiables y se han trasladado a los laboratorios biomédicos. El campo de la QPI está pasando de ser un campo impulsado por el desarrollo de la tecnología a un campo centrado en la aplicación.

El principal obstáculo para generar un contraste intrínseco, es que por lo general las células vivas no absorben ni dispersan la luz de forma significativa, es decir, son transparentes.

Ernst Abbe describió la formación de imágenes como un fenómeno de interferencia,

a raíz de este concepto Zernike desarrolló la microscopía de contraste de fase, consiste en desplazar su fase relativa en un cuarto de longitud de onda e igualando aún más su potencia relativa. Esta técnica nos revela detalles internos de las estructuras transparentes sin necesidad de marcaje.

En 1940 Dennis Gabor comprendiendo la importancia de la información de fase propuso un nuevo enfoque para la obtención de imágenes, la holografía. Este método combina las dos ideas anteriores, y ve la obtención de imágenes como algo similar a la comunicación por radio.

La QPI combina esencialmente las ideas pioneras de Abbe, Zernike y Gabor. La imagen resultante es un mapa de desplazamientos de longitud de trayectoria asociados al espécimen. Esta imagen contiene información sobre el espesor local y el índice de refracción de la estructura.

4.2.1. QPI e investigación multimodal

A partir del conocimiento de la distribución de fase espacialmente resuelta, se pueden obtener fácilmente otras modalidades de visualización mediante simples cálculos numéricos.

En la siguiente figura, dividida en cuatro partes, se observa como en la parte (a) tomando el gradiente de una imagen de fase cuantitativa, se obtiene una imagen similar a la de la microscopía de contraste de interferencia que ocupa la posición (b).

Una ventaja de la QPI es que se adquiere una flexibilidad adicional para eliminar numéricamente la sombra. Esto se explica con la derivada de primer orden que cambia de signo a través de un borde y puede eliminarse tomando el módulo del gradiente. El resultado le vemos en la parte (c).

Además, el Laplaciano de la imagen de fase revela detalles finos, es decir, contenido de alta frecuencia, de la muestra.

Una de las características más llamativas de QPI es que puede generar datos de dispersión de luz con una sensibilidad extrema. Los campos de la imagen y de la dispersión son simplemente transformaciones de Fourier entre sí.

Esto ocurre porque los campos de la imagen y de la dispersión son simplemente transformaciones de Fourier entre sí, con el conocimiento de un campo complejo, es decir, amplitud y fase en un plano dado nos permite inferir la distribución del campo en cualquier otro plano, incluso en una zona lejana, aunque esta relación no se mantenga en la intensidad.

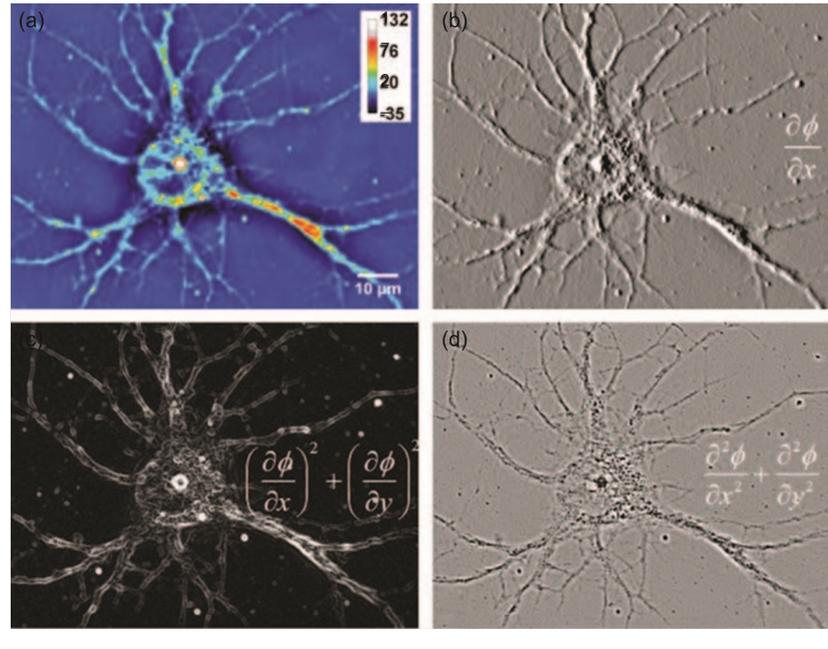


Figura 4.1: (a)QPI de una neurona. (b) Imagen obtenida haciendo la primera derivada a la imagen anterior. (c) Imagen obtenida haciendo el módulo cuadrado del gradiente asociado a la imagen a. (d) Imagen obtenida con el Laplaciano de a [20].

4.2.2. Imágenes en nanoescala y 3D

Dentro del tema QPI, especialmente con las imágenes a nanoescala y en 3D, pueden surgir cierta confusión.

En este apartado se explican dos principales cuestiones, en primer lugar, se sabe que la QPI proporciona cambios espaciales y temporales de la longitud de la trayectoria hasta la nanoescala. Esta resolución nanométrica describiría si no fuera por el principio de incertidumbre, la capacidad de QPI para resolver dos objetos separados por 1nm.

Esto se ha aprovechado en estudios sobre las flucturaciones de glóbulos rojos y la topografía de las nanoestructuras.

Se observa que la imagen 3D, o tomografía, significa la resolución de una propiedad física del objeto en las tres dimensiones. La representación requiere cuatro ejes, lo que significa que en un gráfico sólo se pueden representar ciertas secciones o proyecciones de los datos.

Por lo tanto, aunque QPI puede utilizarse para realizar una tomografía, esta operación requiere de la adquisición de imágenes frente a una dimensión adicional, por ejemplo, la longitud de onda, el ángulo de rotación de la muestra o la posición axial de la misma.

En segundo lugar, se pueden representar las imágenes QPI como gráficos de superficie, esto implica que contengan tres ejes x, y, z . A veces se confunden los términos y QPI es erróneamente referido a una imagen 3D.

4.3. Características de la imagen

La microscopia es el proceso de mapear una determinada propiedad física de un objeto y mostrarla de forma visual.

Existen diferentes propiedades físicas que podemos analizar pero las más interesantes son la absorción, la emisión y la dispersión intrínseca de la muestra. En este apartado se discuten propiedades básicas de las imágenes de microscopio, independientemente del método de adquisición de las imágenes.

4.3.1. La imagen como operación lineal

En varias ocasiones podemos analizar un sistema de imágenes como un sistema lineal.

La siguiente ecuación produce una imagen $I(r)$, que se relaciona con $S(r)$ mediante una operación de convolución, donde $h(r)$ se refiere a la función dispersión de puntos ó PSF.

$$I(r) = S(r) \otimes h(r)$$

Si se sustituye $S(r)$ por $\delta(r)$ obtenemos que la $h(r)$ define lo infinitésimo que es un objeto cuando se pasa por un proceso de obtención de imágenes.

La PSF es utilizada también como una medida del poder de resolución del sistema. Un ejemplo de ello es que la $I(r)$ puede ser una distribución de intensidad o de campo complejo dependiendo de si la imagen utiliza luz incoherente o coherente.

4.3.2. Resolución

La idea de resolución de un sistema de imágenes viene dada por la mínima distancia entre dos puntos. Por ejemplo, la anchura media máxima de h en una dirección es una posible medida de resolución a lo largo de esa dirección.

La imagen puede ser representada en el dominio de la frecuencia espacial haciendo uso de la Transformada de Fourier 3D.

Otra forma de relacionar el objeto y la imagen en el dominio de la frecuencia es realizar la transformada de Fourier y aplicar el teorema de la convolución, con esto obtenemos,

$$\tilde{I}(k) = \tilde{S}(k) * \tilde{h}(k) \quad (4.1)$$

dónde tenemos \tilde{S} y \tilde{I} como el resultado de las transformadas de Fourier de S y h. Por lo tanto lo que queda es \tilde{h} que se usa para llamar a la función transferencia (TF).

Cuando la PSF es estrecha quiere decir que la imagen será de Alta resolución, y por lo tanto lleva a que la relación de Fourier entre la PSF y la TF tenga un amplio soporte de frecuencia.

4.3.3. Relación Señal Ruido (SNR)

Toda señal está afectada por un ruido experimental. Dentro de estos ruidos hay diferentes causas que lo provocan.

La varianza de la señal σ^2 nos describe la variación en la media de N mediciones, con esto último se pueden medir sobre N píxeles dentro de una misma imagen. x es la señal sin ruido.

$$SNR = \frac{|x|}{\sigma} \quad (4.2)$$

Al expresar la señal sin ruido como un módulo hacemos que la SNR sea positiva.

En el caso particular de que no tengamos ruido coherente o correlacionado, podemos usar la siguiente expresión,

$$SNR_N = \sqrt{N} * SNR \quad (4.3)$$

contando con N mediciones y así promediar los resultados y aumentar la relación SNR.

4.3.4. Contraste y relación contraste/ruido

El contraste de una imagen nos indica la capacidad de diferenciar entre distintas regiones dentro de una imagen.

$$C_{AB} = |S_A - S_B| \quad (4.4)$$

Las distintas regiones que se comentaban antes están asociados a S_{AB} , el módulo hace que el contraste tenga siempre valores positivos.

A diferencia de la resolución, el contraste es una característica que proviene de la combinación instrumento/muestra.

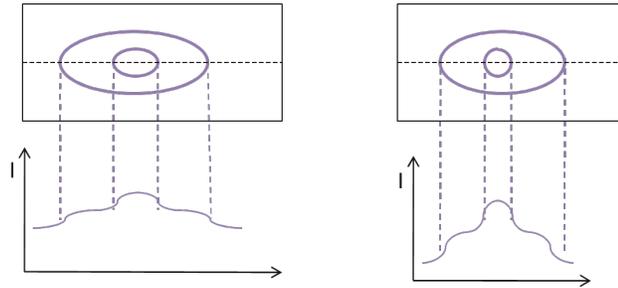


Figura 4.2: Ilustración de contraste bajo y alto de la imagen [20]

Existen situaciones en las que esta característica es insuficiente porque no se tiene en cuenta el efecto del ruido. En este caso particular, donde el propio ruido genera un alto contraste en el campo de visión de la imagen se generan valores C_{AB} . Por lo tanto en este tipo de imágenes usamos la relación Contraste/ruido (CNR).

$$CNR_{AB} = \frac{C_{AB}}{\sigma_N} \quad (4.5)$$

En la anterior ecuación observamos como el mejor escenario desde el punto de vista de la medición ocurre con un ruido bajo y un contraste alto.

4.3.5. Filtrado de imagen

Filtrado es un término genérico para referirse a una operación de multiplicación, que tiene lugar en el dominio de la frecuencia de la imagen [21].

El filtrado se utiliza para mejorar o disminuir ciertas características de la imagen. En función del rango de frecuencias que deja pasar se distinguen tres tipos de filtros: paso bajo, paso banda y paso alto.

4.3.5.1. Filtro paso bajo

Consideramos una situación en la que el ruido de imagen presenta fluctuaciones de alta frecuencia. Se utiliza en este caso ese filtro para bloquear las altas frecuencias. Creando una imagen filtrada resultante con una mejor SNR.

4.3.5.2. Filtro paso Banda

Este tipo de filtro es útil cuando se pretende realzar algún rango determinado de tamaños dentro de la imagen.

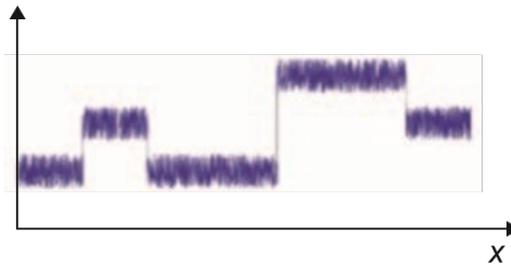


Figura 4.3: Señal con ruido [20]

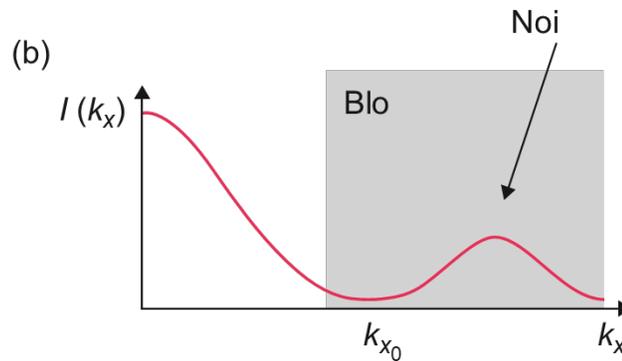


Figura 4.4: Señal tras un filtro de alta frecuencia [20]

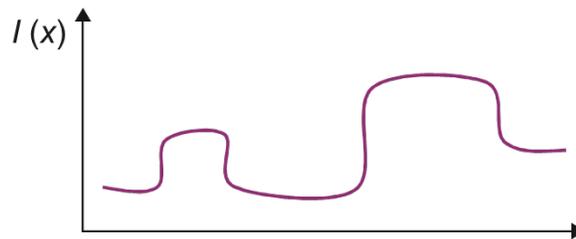


Figura 4.5: Señal tras un filtro paso bajo [20]

4.3.5.3. Filtro paso Alto

El objetivo del filtro es seleccionar cierto tipo de frecuencias y así quedarse con altas frecuencias donde se revelan detalles más finos de una imagen.

Una aplicación útil para seleccionar un objeto de interés dentro de una imagen.

4.4. Luz microscópica

4.4.1. Teoría de la imagen de Abbe

Se parte de una base en la que una lente convergente tiene una notable propiedad de producir en su plano focal la transformada de Fourier de la distribución de campo. Por lo tanto, se pueden describir imágenes en términos de un sistema de dos lentes que realizan dos transformaciones de Fourier sucesivas.

En la siguiente imagen se muestra la formación de la imagen de la óptica geométrica a través de este microscopio.

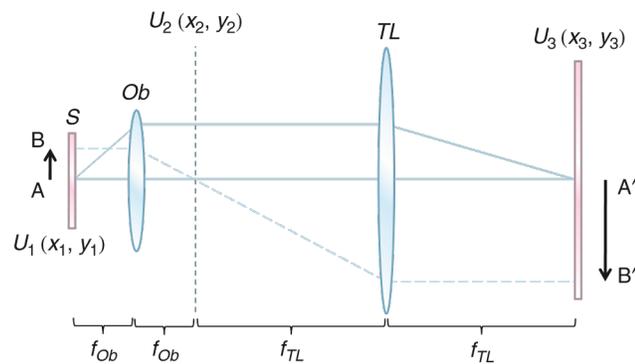


Figura 4.6: Formación de la imagen coherente en un microscopio [20].

El sistema se basa en un plano focal posterior que se solapa con el plano focal delantero.

El campo de la imagen U_3 es la transformada de Fourier de U_2 , que a su vez es la transformada de Fourier de U_1 . Para demostrar lo anterior basta con aplicar dos transformadas de Fourier hacia adelante y recuperar la función original. Esto explica el por qué de que la imagen $A'B'$ está invertida respecto al objeto AB .

La teoría de Abbe de 1873 cita que "La imagen del microscopio es el efecto de interferencia de un fenómeno de difracción."

La frase anterior se interpreta como un determinado campo de imagen que se forma a través de la interferencia entre ondas planas que se propagan en diferentes direcciones, creando un campo resultante que puede ser descompuesto en sinusoides de diferentes frecuencias y desplazamientos de fase.

Por supuesto, la misma imagen se aplica en el plano de la muestra, donde cada frecuencia espacial genera pares de ondas planas (órdenes de difracción) que se propagan simétricamente con respecto al eje óptico.

A medida que esta frecuencia aumenta, el ángulo de difracción respectivo alcanza el punto en el que supera el máximo permitido por el objetivo. Este marco permitió a Abbe

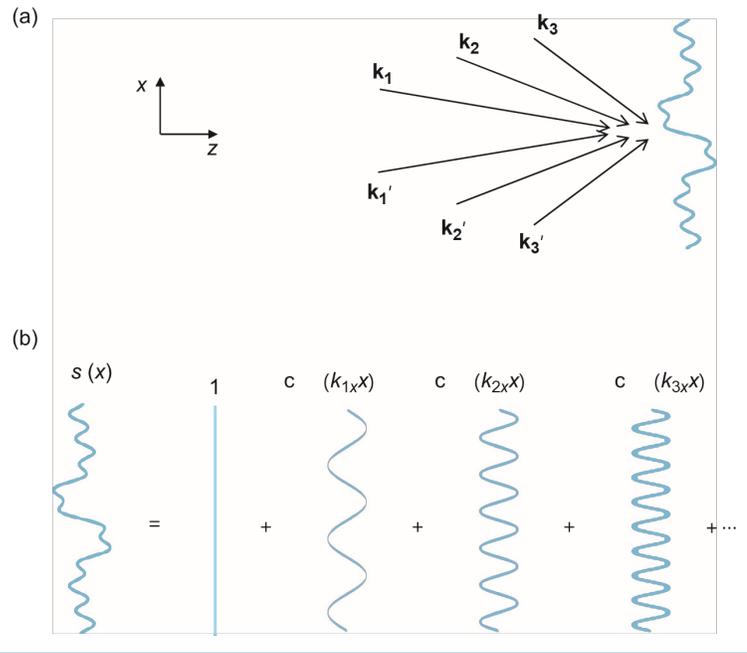


Figura 4.7: (a) Fenómeno de la interferencia, (b) Descomposición de la frecuencia del campo resultante [20]

derivar su famosa fórmula para el límite de resolución.

Cuantitativamente la resolución del microscopio, explica como la apertura que presenta el microscopio viene limitada por el máximo ángulo asociado con la dispersión de la luz.

4.4.2. Microscopio de contraste de fase de Zernike

En la década de 1930 fue desarrollada una técnica de microscopía de fase (PCM) que representó un gran avance en el campo de la microscopía óptica. El creador fue el físico holandés Frits Zernike, que recibió el Premio Nobel de Física en 1953.

Esta técnica sorprende por su sencillez y capacidad al mismo tiempo.

Lo que actualmente conocemos como biología celular tiene su origen en este método, que hace posible la investigación no invasiva y sin etiquetas de células vivas.

El principio de la PCM se basa en la primera teoría de la formación de imágenes, que es la anteriormente comentada, Teoría de Abbe.

Como se comentaba en el capítulo anterior, el campo de la imagen es el resultado de

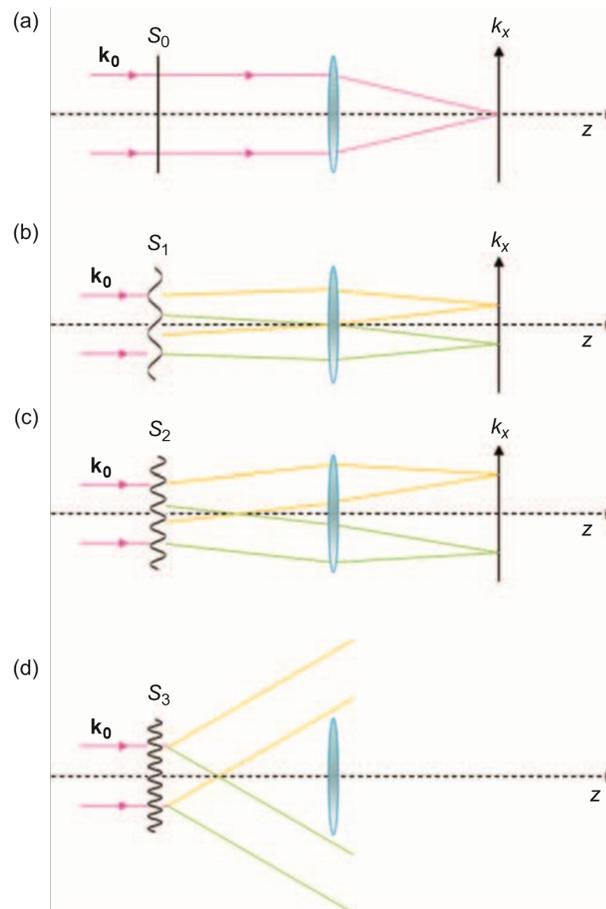


Figura 4.8: Efecto del filtro paso bajo por el objetivo del microscopio [20].

la superposición de campos originados en la muestra.

La microscopía de contraste de fase es significativamente más eficaz para mejorar el contraste que el método de campo oscuro.

En vez de eliminar completamente la luz no dispersa por completo, en esta técnica se mantiene en alguno de los campos pero desplazado fuera de la fase.

Existe una buena analogía que relaciona el contraste de fase con las artes marciales.

En la figura que se presenta a continuación, se revelan los conocidos Efectos halo, bordes brillantes que se asocian al contraste de fase. La figura es una imagen de una neurona no teñida.

Esencialmente, la existencia del halo indica el fracaso de nuestra suposición para una transformación de Fourier 2D perfecta en el plano focal posterior del del objetivo [22].

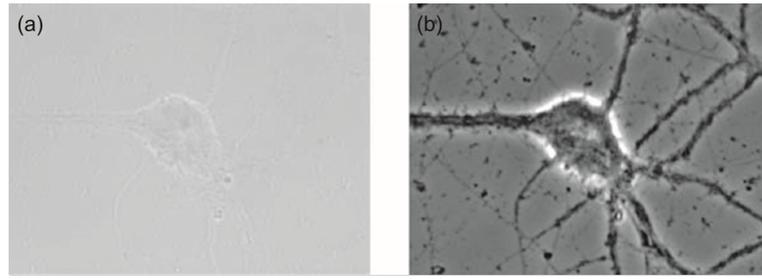


Figura 4.9: (a) Campo claro y (b) imagen tras contraste de fase [20]

Se trata de una manifestación de la tercera dimensión del del objeto. Por lo tanto, la derivación cuantitativa de la distribución de la intensidad del halo requiere tener en cuenta un modelo de dispersión 3D del objeto, lo que está fuera del alcance de nuestra discusión aquí.

4.5. Conclusiones

Partiendo de la base de que el microscopio óptico de contraste de fase fue un invento realmente revolucionario y que marcó un antes y un después en las investigaciones del orden científico, se trató de un proceso largo en el cuál los principales parámetros a perfeccionar eran la resolución, la relación señal a ruido de estos sistemas y el contraste de las imágenes obtenidas.

La QPI ha surgido como un método valioso para investigar células y tejidos, y gracias a los grandes avances en la última década se han desarrollado varios métodos para superar la barrera de la difracción en la microscopía de fluorescencia de campo lejano.

Gracias a los diferentes tipos de filtro y basándonos en las teorías ópticas mencionadas anteriormente este capítulo concluye con la Teoría de la imagen de Abbe, la cuál dió lugar a la presentación del microscopio de contraste de fase de Zernike, este gran invento nos aporta la esperanza de poder obtener imágenes mucho más claras aprovechando las cualidades de los diferentes tejidos que analizamos.

Capítulo 5

Diferentes enfoques de la técnica QPI: Análisis y métodos

5.1. Introducción

El debate de este capítulo es aclarar que no existe un método QPI con el que se obtenga un rendimiento óptimo.

Partimos de la base de cuatro diferentes enfoques. Estos son por un lado, los métodos fuera del eje que se caracterizan por su rapidez ya que son de un solo diparo. En segundo lugar, el desplazamiento de fase que preserva la resolución limitada por difracción sin medidas especiales. Los métodos más estables son aquellos que utilizan trayectoria común. Y por último donde se utiliza la luz blanca.

Cada uno de ellos tiene sus propiedades características por eso se planteó fusionarlos entre ellos y así sumar las respectivas ventajas individuales.

Por lo tanto, este capítulo trata de una gran sección donde se explican las principales combinaciones con dos geometrías.

En primer lugar el método fuera del eje que al combinarse con el desplazamiento de fase nos permite restringir las restricciones que se presentan con la coherencia espacial, su fin es detectar el plano de mejor enfoque para observar las imágenes.

También se explicará el método de desplazamiento de fase combinado con luz blanca ó lo conocido como DRIMPAS. Que está basado en una plataforma de microscopio Jamin-Lebedeff.

Por otro lado en la siguiente subsección se explica la combinación entre el método de desplazamiento de fase y trayectoria común también conocido como FPM, que da lugar a

un Microscopio de Phase de Fourier [21].

Seguido se explicará la combinación entre el método fuera del eje y la trayectoria común también conocida como la técnica DPM, y los avances que esta nos trae.

Y concluimos el capítulo con el método de luz blanca junto con el método de trayectoria común que se observa con el montaje del instrumento conocido como SLIM, seguido de la técnica mejorada iSLIM, en estas dos secciones al igual que con las otras técnicas repasaremos su montaje experimental y las diferentes aplicaciones que nos traen.

5.2. Posibles combinaciones con dos geometrías

5.2.1. Método fuera del eje combinado con desplazamiento de fase

Estas técnicas surgen de una versión de la holografía digital aplicada a la microscopía.[23]

Por ejemplo, de la holografía digital con cambio de fase obtenemos otra implementación. Existe un método holográfico digital que emplea el registro de una longitud de onda para lograr la modulación.

A raíz de este método Indebetouw y Klysubun presentan un método que restringe las restricciones que presenta la coherencia espacial.

En 2006 Dubois presenta una aplicación para este método con el fin de detectar el plano de mejor enfoque al observar imágenes de especímenes delgados.

Existe un problema general para estudiar objetos microscópicos como las células vivas, ya que en estos casos se necesita una gran resolución. Ferrato demostró que para este problema se puede usar la información de fase aplicada para compensar la curvatura del frente de onda del objeto a estudiar con el microscopio.

No fue hasta 2009 donde se demostró la combinación de la holografía digital y la microscopía de reflexión interna total para obtener imágenes de un campo cercano.

La combinación de técnicas fuera de eje y el desplazamiento de fase fueron propuestas por el grupo de Wax. Este método surge del debate de mejorar la resolución más allá del límite de Rayleigh utilizando la información del campo complejo proporcionada por la holografía digital.

5.2.2. Método de desplazamiento de fase combinado con luz blanca

En este apartado se contemplan otros avances a raíz del método de Microscopía de interferencia con desplazamiento de fase (DRIMPAS).

Es un método similar al ya comentado QPI basado en una plataforma de microscopio Jamin-Lebedeff. La gran característica de este método es su estabilidad, esto se consigue a través de la separación del campo de iluminación con ayuda de un divisor de haz polarizador, con el que se obtiene polarizaciones ortogonales.

Hay que aplicar un cambio de fase que se consigue controlando el ángulo de rotación del analizador con respecto a la media placa de ondas.

En la siguiente imagen se puede observar lo que se comentaba anteriormente.

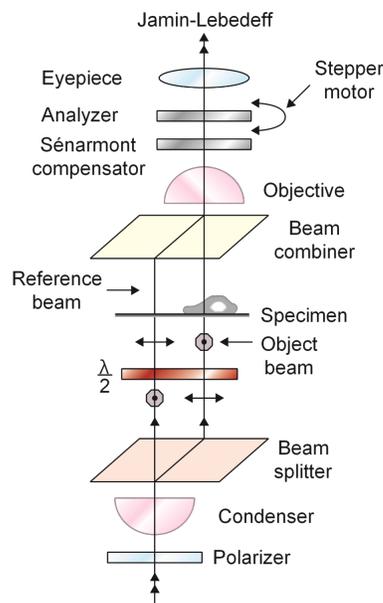


Figura 5.1: Implementación del sistema DRIMPAS con un microscopio Jamin-Lebedeff [20]

La limitación que obtenemos con este método se da en el caso de que la muestra sea birrefringencia o lo que es lo mismo, cuando la muestra produzca doble refracción.

5.2.3. Método desplazamiento de fase y trayectoria común

Este método FPM (Fourier Phase Microscopy) es la combinación de trayectoria común y fuera del eje. Se parte de la base que la imagen de un microscopio es extremadamente estable, lo que quiere decir que los campos de interferencia viajan muy cerca unos de otros.

Al interferir ambos campos se crea un ruido común a todos ellos y se anula en gran medida con el interferograma resultante.

El método que comentamos consiste en entender la imagen del microscopio como la interferencia entre la luz dispersa del espécimen y la luz media, no dispersa.

Se hace uso de la descomposición de Fourier para separar un campo de imagen óptica de baja coherencia en dos componentes, y de ahí obtener una imagen de fase cuantitativa de alta resolución.

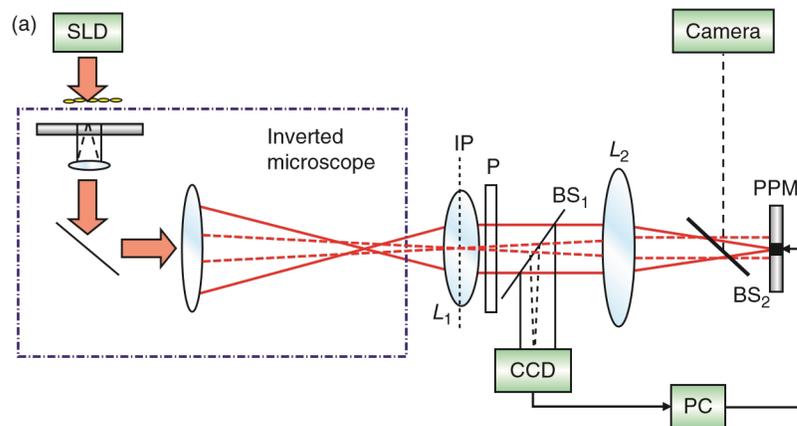


Figura 5.2: Montaje experimental del FPM [23]

El campo de baja coherencia es creado por un diodo superluminiscente, lo que en el dibujo se corresponde al SLD, y se utiliza como fuente de iluminación de un microscopio invertido. A continuación del microscopio se produce una imagen que pasa por lo que en el dibujo se denomina IP que es un plano de imagen. La lente L1 se encuentra en el mismo plano IP y tiene una distancia que colima con el campo de frecuencia espacial cero. La transformada de Fourier la encontramos a la salida de la segunda lente L2. A su salida se encuentra el PPM que consiste en una matriz de cristal líquido bidimensional, a su vez contiene un polarizador para ajustar el campo a una dirección paralela al eje del cristal líquido.

5.2.4. Método fuera del eje y trayectoria común

La técnica Diffraction-phase Microscopy (DPM) es una combinación de la parte referida a disparo único de HPM, con la geometría de trayectoria común asociada a la FPM.

Lo que se consigue con esta técnica es un gran avance para la estabilidad de fase de las interferencias y las altas velocidades de los métodos fuera del eje. Esto es útil a la hora de aplicarlo al estudio de glóbulos rojos.

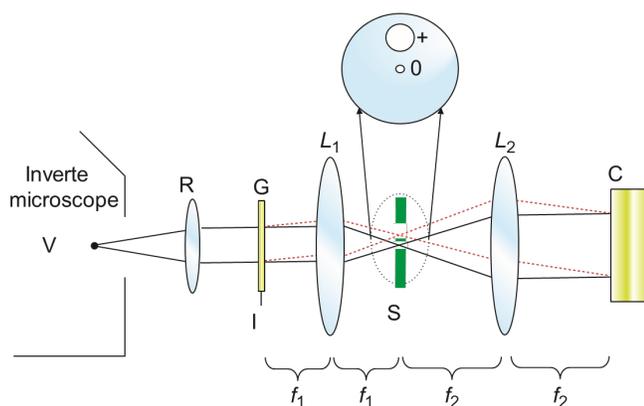


Figura 5.3: Montaje experimental del método DPM [20]

En la siguiente figura se observa el montaje experimental. El DPM trabaja con una iluminación de un microscopio invertido que produce una imagen ampliada de la muestra en el puerto de salida. Después pasa por una lente de relevo, RL concentra la luz originada en el microscopio invertido y reproduce la imagen en el plano. El siguiente paso es una rejilla de fase de difracción G que genera múltiples órdenes de difracción. El objetivo es seleccionar dos de esas órdenes para ello se usa un sistema de lentes L1 y L2, con todo esto se genera un interferograma final en el aparato CCD. Por último el SF es un filtro especial por donde pasa todo el contenido de las frecuencias del haz de primer orden y cancela el resto.

El resultado de la combinación produce un aumento de 100, pero la resolución se conserva debido a que el punto de difracción en el plano de la rejilla es de $40\mu m$ y el paso de la rejilla es de $20\mu m$.

Como se comentaba anteriormente, este método posee una gran capacidad para estudiar células vivas, para demostrarlo se obtuvieron imágenes de gotas de sangre entera intercaladas entre cubreobjetos.

5.2.5. SLIM. Método de trayectoria común y luz blanca

Existe un método QPI que combina la uniformidad espacial de luz blanca y la estabilidad de la interferometría de trayectoria común.

Esta técnica cuenta con ciertas ventajas como unas imágenes sin motas, además de obtener imágenes tomográficas en 3D de estructuras transparentes.

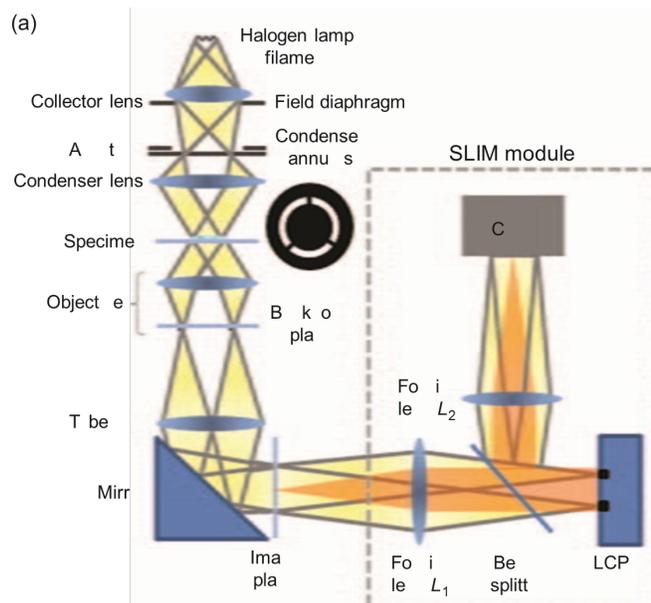


Figura 5.4: Montaje experimental del SLIM [20]

En la figura anterior se puede observar el esquema del montaje del instrumento. SLIM o Spatial Light Interference Microscopy, se crea a través de un campo de imagen que emite un microscopio de contraste de fase. En el PC se introduce un desplazamiento de $\pi/2$ en la salida del objetivo, se visualiza a través de la lente L1 sobre la superficie de un modulador de fase de cristal líquido (LCPM).

Con estos avances en la técnica podemos hablar de que en un futuro próximo se podría detectar un movimiento debido a un pequeño número de moléculas introduciéndose en una célula viva.

La SLIM [23] proporciona imágenes de fase que se superponen de forma inherente a los demás canales del microscopio.

5.2.6. iSLIM

iSLIM ó Instantaneous Spatial Light Interference Microscopy, mejora respecto al método SLIM la capacidad de precisión con un sólo disparo. Se basa en una combinación del DPM con un microscopio de contraste de fase comercial y una cámara RGB que actúa como filtro y detector de longitudes de onda.

La técnica iSLIM proviene de una combinación del método fuera del eje y trayectoria común, y a su vez es una mejora de la técnica obtenida de mezclar la trayectoria común con la luz blanca.

En cuanto al montaje experimental, se coloca en el plano de la imagen (IP) un microscopio invertido junto con una rejilla de difracción de amplitud. Los órdenes en el plano de Fourier generado por la lente L_1 .

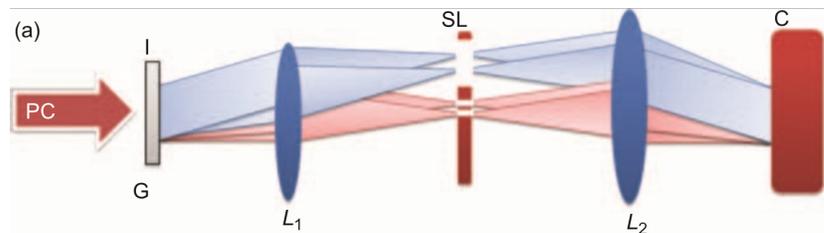


Figura 5.5: Montaje experimental del iSLIM [23]

A su vez el filtro SLM está diseñado para que coincida la imagen real del condensador de tal manera que sólo pase la componente DC de orden 0. Por último en el plano CCD obtenemos un interferograma que tiene un alto contraste debido a la coincidencia de coherencia.

Lo que se obtiene es una implementación de la imagen de fase en tres colores diferentes, registrando el interferograma con una cámara RGB. Cada color contiene una longitud de onda diferente, y así con un solo cuadro se puede reconstruir simultáneamente imágenes de fase cuantitativa.

Esta técnica puede tener aplicaciones directas con la biomedicina, analizando una imagen se puede obtener un resultado que muestre si la hemoglobina está homogéneamente distribuida dentro de la célula. Además la medición RGB proporcionará información sobre la concentración media de hemoglobina en la célula, el nivel medio de saturación de oxígeno celular o incluso informar sobre estos parámetros a escala subcelular.

Estos parámetros que se comentaban pueden informar sobre enfermedades como anemias y la malaria. Este método basado en el QPI puede proporcionar un medio de análisis

de sangre a nivel mundial, y servir de solución para zonas menos desarrolladas donde no se puede disponer de equipos costosos.

5.3. Conclusiones

Como conclusión de este apartado y tras haber definido las diferentes alternativas QPI que existen combinando diversos métodos, podemos llegar a la idea final de que estas técnicas, más concretamente aquellas que involucran la trayectoria común combinada con otras, nos aporta grandes avances relacionados con aplicaciones directas de la biomedicina.

Con este capítulo se aclara también que no existe un método óptimo para el análisis. Cada método explicado tiene unas ventajas y desventajas, explicadas anteriormente, y gracias al conocimiento de estas sabemos que técnica escoger en cada caso dependiendo de lo que se quiera analizar, y obtener así unos resultados óptimos.

Capítulo 6

Análisis comparado de los métodos QPI *label-free*

6.1. Introducción

La importancia de los métodos *label-free*. La detección de interacciones moleculares sin marcadores presenta una alternativa atractiva a las técnicas tradicionales basadas en marcadores, como la fluorescencia.

Las técnicas de análisis de interacción sin marcador ó *label-free* generan datos biológicamente relevantes que permiten la comprensión de las interacciones moleculares sin el uso de marcadores o sondas artificiales. Esta es una ventaja clave, ya que los marcadores pueden perturbar la estructura de orden, e incluso introducir errores en los datos.

De ahí surgen las etiquetas fluorescentes que combinadas con los microscopios ópticos son utilizadas para investigar los detalles del interior de los tejidos.

Sin embargo, al aplicar esta fototoxicidad y fotoblanqueo las estructuras celulares se ven alteradas y es difícil obtener imágenes de células vivas durante un largo periodo de tiempo. Otro de los inconvenientes es que al utilizar tintes fluorescentes los espectros pueden solaparse y dificulta distinguir entre las diferentes estructuras. Si la tinta no es aplicada correctamente y no se hace homogéneamente la interpretación de las imágenes cambia.

Tras ver todos estos inconvenientes surge la obtención de imágenes de muestras *label-free* esta requiere preparación de la muestra y proporciona información dinámica y morfológica detallada de las células vivas.

Este método es realmente útil para obtener imágenes de células vivas de larga duración.

En este capítulo nos centramos en organizar y aclarar la idea de la importancia de los

métodos sin etiqueta. La primera sección de este capítulo se basa en explicar la técnica ya explicada, QPI desde el enfoque de los métodos *free label* y las ventajas que esto conlleva [20]. Para continuar, la siguiente sección compara otros métodos válidos para estudiar una imagen también sin etiquetas, estos han sido desarrollados durante el último siglo y en la última sección se procede a compararlos y observar sus características.

6.2. QPI como método sin etiqueta

La técnica QPI cómo está explicado en capítulos anteriores, es una técnica que se encuentra dentro de un campo emergente basado en la microscopía, holografía y técnicas de dispersión.

Hablamos de estas técnicas en este capítulo porque mejoran en gran medida el contraste intrínseco sin etiquetas y nos permiten conocer las estructuras transparentes.

La QPI tiene por objeto representar cuantitativamente la distribución de fase pura, eliminando la dependencia de la intensidad.

A través de sus características de sensibilidad, permite realizar importantes estudios sobre la morfología celular, respuesta a los fármacos, etc. Se tiene que tener en cuenta que la información de fase de la muestra escogida depende de diferentes factores como el índice de refracción o la masa seca de la misma.

Existen dos modalidades QPI estas son, interferométricas y no interferométricas.

Los precursores de mediciones interferométricas se realizaron mediante técnicas de escaneo de un solo punto. Más tarde se desarrollaron diferentes métodos QPI de campo completo basados en la modulación de fase espacial y temporal.

En cuanto a las mediciones de fase no interferométricas se incluyen la detección del frente de onda. A parte existen otras técnicas de recuperación de fase que utilizan métodos iterativos o deterministas.

Todos estos métodos no interferométricos utilizan la interferencia de la luz como proceso fundamental para registrar la información de fase.

6.3. Otros métodos de imagen *label-free*

Existen varios métodos de imágenes *label-free* aparte de los QPI, desarrollados durante el último siglo.

En esta sección se procede a desarrollar y comparar los métodos ópticos de obtención de imágenes *label-free*.

Los parámetros que usamos para esta comprobación son la resolución lateral y axial, la profundidad de penetración, mecanismos de contraste y modos de obtención de imágenes.

Para la obtención de imágenes de tejidos en masa se usa la microscopía multifotónica este es un método no lineal que incluye otros métodos *label-free*, como la SHGM ó ***Second-harmonic generation microscopy***, el THGM ó ***third-harmonic generation microscopy*** y CRSM ó ***coherent Raman scattering microscopy***. La diferencia que existe entre las dos primeras es la capacidad de generar armónicos. Mientras que en CRSM depende de los modos vibraionales Raman de las moléculas de la muestra.

Por otro lado la SRS ó ***Stimulated Raman scattering*** y la CARS ***Coherent anti-Stokes Raman scattering*** son las dos mayores técnicas dentro de la CRSM. Entre la CRSM y la SRS nos quedamos con la primera, ya que mide un espectro Raman espontáneo con láseres de onda continua.

La microscopía multifotónica tiene un gran número de aplicaciones en estudios sobre el cáncer, el metabolismo celular y la investigación farmacéutica.

FLIM ó ***Fluorescence-lifetime imaging microscopy*** mide el tiempo de vida asociado con el fluoróforo de una muestra. Este tiempo del que hablamos depende del microambiente. Esta técnica puede medir la autofluorescencia en tejidos vivos hasta 1 mm de espesor, mientras que la espectroscopia IR por transformada de Fourier o FTIR es otro métodos *label-free* que permite la obtención de imágenes espectroscópicas a través de imágenes interferométricas.

En cuanto la tomografía fotoacústica ó PAT combina ondas sonoras y electromagnéticas para crear imágenes multiescala y multicontraste de muestras biológicas.

La característica fotoacústia permite obtener las imágenes desde los orgánulos subcelulares hasta las escalas de los órganos.

La imagen óptica difusa DOI se basa en la espectroscopia del infrarrojo cercano para muestras difusas.

Por otro lado tenemos la tomografía de proyección óptica OPT que es el equivalente óptico de la tomografía computarizada de rayos X, adecuada para la obtención de imágenes tridimensionales.

La microscopía óptica fototérmica utiliza rayos láser de calentamiento y sondeo con la

función de detectar un cambio de índice de refracción en las muestras.

Al margen de todas las técnicas comentadas existen otras que tienen como objetivo mejorar el seccionamiento óptico estas son tales como la microscopía confocal, la microscopía de lámina de luz, etc.

El SNOM ó *near-field scanning optical microscope* sobrepasa el límite de resolución de campo lejano para así poder explotar las propiedades de las ondas evanescentes.

STEAM es una técnica de obtención de imágenes ultrarrápida y continua en tiempo real.

A continuación se presentan unas tablas divididas en función de su mecanismo de contraste, donde podremos observar los diferentes métodos *label-free* con sus respectivas características.

Mecanismo de contraste: Absorción		
Método <i>label-free</i>	Widefield/Scanning	Transmisión/Reflexión
Bright-field	W/S	T/R
Dark-field	W	T/R
DOI	W	R

Tabla 6.1: Tabla métodos *label-free* por absorción

Mecanismo de contraste: Refracción		
Método <i>label-free</i>	Widefield/Scanning	Transmisión/Reflexión
Contraste-fase	W	T
DIC	W/S	T/R
SLIM	W	T

Tabla 6.2: Tabla métodos *label-free* por refracción

Mecanismo de contraste: Scattering		
Método <i>label-free</i>	Widefield/Scanning	Transmisión/Reflexión
OCT	W/S	T/R
STEAM	S	T/R

Tabla 6.3: Tabla métodos *label-free* por Scattering

Mecanismo de contraste: Modos vibracionales		
Método <i>label-free</i>	Widefield/Scanning	Transmision/Reflexión
CRSM	S	T/R
SRS	S	T/R
CARS	S	T/R
CRM	S	R

Tabla 6.4: Tabla métodos *label-free* por Modos vibracionales

Mecanismo de contraste: Autofluorescencia		
Método <i>label-free</i>	Widefield/Scanning	Transmision/Reflexión
Light-sheet	W	T/R
4pi	W/S	T/R
Two-Photon	W/S	R

Tabla 6.5: Tabla métodos *label-free* por Autofluorescencia

Estas tablas sirven como un breve resumen de otros métodos ópticos de obtención de imágenes sin etiquetas y sus diferentes comparaciones separados por mecanismos de contraste. Con ellas podemos diferenciar rápidamente las características que diferencian los métodos entre sí.

6.4. Conclusiones

Por lo tanto, como hemos visto en este capítulo, las técnicas tratadas, tienen como objetivo mejorar el seccionamiento óptico, siendo muy novedosas aún se encuentran en una fase de desarrollo. La apuesta por este tipo de métodos es algo que corrobora los actuales estudios para la visualización de células vivas de larga duración en movimiento.

Tras comparar los parámetros como la resolución lateral y axial, se han creado unas tablas con el fin de observar las propiedades más características de los métodos por absorción, refracción, dispersión, modos vibracionales y autofluorescencia.

Sería un error dar por óptima una técnica sobre las demás ya que cada una va enfocada a un mecanismo de contraste diferente y aunque este sea igual, existen otros parámetros recogidos también en las tablas que nos muestran diferentes características. Teniendo estos datos podemos elegir para cada análisis la técnica que más nos interese y obtener así unos resultados óptimos.

Capítulo 7

Conclusiones

Para concluir este Trabajo de Fin de Grado que tenía como objetivo principal estudiar y proponer desde un punto científico-técnico las técnicas de imagen que en los últimos años se han desarrollado para la caracterización precisa de los medios biológicos de bajo contraste, se procede a enumerar las deducciones obtenidas de nuestro estudio.

En el primer capítulo tenemos una introducción al trabajo, seguidamente en el capítulo 2 nos adentramos en los distintos comportamientos de los tejidos biológicos cuando se ven afectados por la luz. Estas propiedades ópticas fundamentales son clave para saber cómo afecta y por lo tanto, cómo se comporta la propagación de la luz en un tejido. Los procesos más significativos son la refracción, dispersión y absorción.

A partir del estudio comentado anteriormente hemos conseguido aislar cada uno de los mecanismos de interacción en función de su óptima aplicabilidad. La fotoquímica es ideal para densidades de potencia muy bajas y tiempos de exposición largos, la interacción térmica, que se rige por una vía de reacción específica, y por último la fotoablación, que trata de descomponer un material al exponerlo a una irradiación láser muy intensa, como por ejemplo en la cirugía de córnea.

A continuación en el capítulo 3 después de abordar las diferentes características de los modelos ópticos para medios biológicos de bajo contraste, se concluye que el tamaño, la forma y la densidad de las partículas son los parámetros más importantes a la hora de diferenciar entre tejidos discretos y continuos.

Tras explicar en el capítulo 4 lo que es un microscopio óptico de contraste de fase, así como sus características principales y nuevas técnicas basadas en la imagen de fase cuantitativa, concluimos que este tipo de microscopio óptico fue un invento revolucionario, ya que perfeccionó y logró mejorar parámetros muy importantes de las imágenes que se obtienen con el microscopio, estos son, la resolución, la relación señal ruido de los sistemas y el contraste de las imágenes obtenidas, todo esto nos proporciona una imagen más clara y por lo tanto que nos ayuda a visualizar mejor cualquier imagen que obtengamos con él.

La gran mayoría de estos avances de los que hablamos se los debemos a la Teoría de la imagen de Abbe desde la que años más tarde se desarrolló el microscopio de fase de Zernike.

Una vez explicado la imagen de fase cuantitativa y la base del microscopio óptico de contraste de fase, se pasa a analizar los diferentes enfoques de la técnica QPI, tras ser finalizar el capítulo 5, llegamos a la idea de que estas técnicas nos aportan grandes avances relacionado con aplicaciones directas de la biomedicina, pero cada una de ellas cuenta con una serie diferente de características que hacen que no exista un método óptimo para el análisis, sino que dependiendo del caso que queramos analizar escogemos una u otra en función de sus características.

Para finalizar estas conclusiones, tras hablar de los métodos QPI *label-free*, podemos decir que este tipo de métodos aportan grandes ventajas, y son realmente útiles a la hora de proporcionarnos información dinámica y detallada de las células vivas, lo cual sería inviable de no ser por esta nueva técnica. Al igual que nos pasaba en el capítulo 5, hablamos de los diferentes enfoques que hay, gracias a este nuevo método, pero concluimos diciendo que sería un error dar por óptima una técnica sobre las demás ya que a cada una la enfocamos en un mecanismo de contraste diferente.

Capítulo 8

Bibliografía

[1] David Pereda Cubián, José Luis Arce Diego, and Raf Rentmeesters, "Characterization of depolarizing optical media by means of the entropy factor: application to biological tissues", *Appl. Opt.* 44, 358-365 (2005). <https://doi.org/10.1364/AO.44.000358>

[2] I. Salas-García, F. Fanjul-Vélez, J. L. Arce-Diego, "Influence of the Human Skin Tumor Type in Photodynamic Therapy Analysed by a Predictive Model", *International Journal of Photoenergy*, vol. 2012, Article ID 759205, 9 pages, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/759205>

[3] Salas-García, Fanjul-Vélez, y Arce-Diego. «Spatial photosensitizer fluorescence emission predictive analysis for photodynamic therapy monitoring applied to a skin disease» *Optics Communications*, 2012: 1581-1588.

[4] Fanjul-Vélez F, Pampín-Suárez S, Arce-Diego JL. Application of Classification Algorithms to Diffuse Reflectance Spectroscopy Measurements for Ex Vivo Characterization of Biological Tissues. *Entropy (Basel)*. 2020 Jul 3;22(7):736. doi: 10.3390/e22070736. PMID: 33286511; PMCID: PMC7517275

[5] Noé Ortega-Quijano, Félix Fanjul-Vélez, and José Luis Arce-Diego, "Polarimetric study of birefringent turbid media with three-dimensional optic axis orientation," *Biomed. Opt. Express* 5, 287-292 (2014). <https://doi.org/10.1364/BOE.5.000287>

[6] Félix Fanjul-Vélez, Laura Arévalo-Díaz, and José L. Arce-Diego, "Intra-class variability in diffuse reflectance spectroscopy: application to porcine adipose tissue," *Biomed. Opt. Express* 9, 2297-2303 (2018) <https://doi.org/10.1364/BOE.9.002297>

[7] Joel Mobley, Tuan Vo-Dinh, "Photonics and Tissue Optics", CRC Press LLC, 2003.

[8] Bjorn, L.O., "Light propagation in biological materials and natural waters", *Sci. Mar.*, 60, 9, 1996.

[9] Rundlof, M. and Bristow, J.A., "A note concerning the interaction between light scattering and light absorption in the application of the Kubelka–Munk equations", *J. Pulp Paper Sci.*, 23, J220, 1997.

[10] Saidi, I.S., Jacques, S.L., and Tittel, F.K., "Mie and Rayleigh modeling of visible-light scattering in neonatal skin", *Appl. Opt.*, 34, 7410, 1995.

[11] Tuchin, V.V., "Tissue Optics — Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis, Tutorial Texts in Optical Engineering", Vol. TT38, SPIE, Bellingham, WA, 2000.

[12] Gardner, C.M., Jacques, S.L., and Welch, A.J., "Light transport in tissue: accurate expressions for one-dimensional fluence rate and escape function based upon Monte Carlo simulation", *Lasers Surg. Med.*, 18, 129, 1996.

[13] Keijzer, M., Jacques, S.L., Prahl, S.A., and Welch, A.J., "Light distributions in artery tissue — MonteCarlo simulations for finite-diameter laser beams", *Lasers Surg. Med.*, 9(2), 148, 1989.

[14] Parsa, P., Jacques, S.L., Nishioka, N.S., "Optical properties of rat liver between 350 and 2200 nm.", *Appl. Opt.* 28, 2325–2330, 1989

[15] Yaroslavsky, A.N., Yaroslavsky, I.V., Goldbach, T., and Schwarzmaier, H.-J., "The optical properties of blood in the near infrared spectra range", *Proc. SPIE*, 2678, 314, 1996.

[16] Markolf H. Niemz, "Laser-Tissue Interactions, Fundamental and Applications", Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004, 2007.

[17] Joseph M. Schmitt and Gitesh Kumar, "Optical scattering properties of soft tissue: a discrete particle model", *APPLIED OPTICS* y Vol. 37, No. 13 y 1 May 1998.

[18] M. S. Patterson, "Noninvasive measurements of tissue optical properties: current status and future prospects," *Comments Mol. Cell. Biophys.* A 8, 387–417, 1995.

[19] J. Beuthan, O. Minet, J. Helfmann, M. Herrig, and G. Müller, "The spatial variation of the refractive index in biological cells," *Phys. Med. Biol.* 41, 369–382 1996.

[20] Gabriel Popescu, "Quantitative Phase Imaging of Cells and Tissues", The McGraw-Hill Companies, 2011.

[21] R. N. Bracewell. "The Fourier Transform and Its Applications", McGraw-Hill,

Boston, MA, 2000.

[22] J. W. Goodman. Introduction to Fourier Optics. (McGraw-Hill, New York, 1996).

[23] Xi Chen, Mikhail E. Kandel, AND Gabriel Popescu, "Advances in Optics and Photonics", Optical Society of America, Vol. 13, No. 2, June 2021.