

# Facultad de Ciencias

# Determinación de concentraciones por medida de contraste de Speckle

(Determination of concentrations by Speckle contrast measurement)

Trabajo de Fin de Grado para acceder al

# **GRADO EN FISICA**

Autor: Fuentes Ruiz, Antonio

Director: Pérez Cagigal, Manuel

Co-Director: Valle Herrero, Pedro J.

Marzo - 2015

In luce veritas est.

A mis padres por animarme y estar encima de mi durante todos estos años sin permitirme abandonar. A Manolo y Pedro por darme la oportunidad de trabajar con ellos, realizar el proyecto y enseñarme pacientemente. A Raulito por leerse cada corrección que he hecho de este trabajo y a Daniel García "Reinosa" por haber compartido este viaje conmigo desde el primer día y hasta hoy.

# Índice de contenido

RESUMEN	8
SUMMARY	9
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Objetivo y motivación	11
1.2 Consideraciones previas e inconvenientes	12
1.3 Estado del arte	13
1.4 Speckle	15
1.4.1 Breve historia	15
1.4.2 Patrón de interferencia	15
1.4.3 Variación temporal	16
2. MONTAJE EXPERIMENTAL	17
2.1 Colocación de la cámara	19
2.2 Toma de datos	20
2.3 Procesado de datos	21
2.4 Preparación de las muestras	22
2.5 Evolución de las muestras	22
2.6 Proceso de medida complementario	24
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	25
4. CONCLUSIONES	33
5. BIBLIOGRAFÍA	35
Agradecimientos	36
-	

## RESUMEN

El diagnóstico médico frecuentemente se apoya en la determinación de la composición de la sangre. Sin embargo, no siempre interesa conocer la concentración de todos los componentes simultáneamente. Por ejemplo, antes de administrar una nueva sesión de quimioterapia solo es necesario garantizar una concentración de neutrófilos superior a 1500/ml. En la actualidad, el análisis basado en extracción de sangre presenta una serie de inconvenientes como son las molestias al paciente, la exigencia de espacios y personal adecuados, el retraso temporal entre la prueba y los resultados y el elevado coste económico. Este proyecto forma parte de un trabajo más ambicioso que propone como alternativa a este procedimiento *ex vivo* el análisis de la luz retro difundida por los elementos que circulan por las venas como un método de evaluación *in vivo* de su concentración, lo cual supone un gran desafío científico-técnico. Hasta ahora no existe en el mercado una solución viable para las medidas *in vivo*, a pesar de sus grandes ventajas.

Se ha tratado pues en este proyecto de relacionar de manera cualitativa la concentración de diversos componentes en la sangre, a través de la utilización de una única gota de sangre, con diferentes características del patrón de Speckle resultante de iluminar la muestra con una serie de Láseres de distintas longitudes de onda.

Esta técnica tiene como principal inconveniente la baja concentración de alguno de los componentes que se pretende analizar.

Palabras clave: Speckle, contraste de Speckle, análisis sanguíneo, neutrófilo, hematíes.

## SUMMARY

Medical diagnosis is often based on the determination of blood composition. Some times it is not necessary to fully know the composition but it is enough to estimate the concentration of a singular element. In particular, to guaranty a neutrophil concentration higer than 1500/ml is crucial before providing a new round of chemotherapy.

Currently, the analysis based on blood extraction has a number of drawbacks like the patient disconfort, the need of proper space and staff, the temporal delay between the test and the results and the high price of the whole process.

This project is included in another more ambitious one. However, our goal has been limited to the analysis in vivo of light scattered by elements of the blood flowing through the veins as a method of assessing the concentration of neutrophils. This is a great scientific and technical challenge since, despite its great advantages, it does not exist so far a viable solution for measurements in vivo on the market.

In this project we tray to relate qualitatively the concentration of various components in the blood with different pattern features resulting from illuminating a sample, consisting in a blood drop, with some lasers. That pattern is called Speckle.

In this technique the main drawback is the low concentration of some component to analyze.

Key words: Speckle, Speckle contrast, blood analysis, neutrophil, erythrocytes.

## 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Objetivo y motivación

El objetivo de este trabajo es el estudio cualitativo de la dependencia de los parámetros de Speckle (intensidad, contraste y tamaño) en imágenes de muestras de sangre con la concentración de algunos de los elementos formes de la sangre (hematíes, neutrófilos). Previamente a la medida de muestras biológicas se ha estudiado la dependencia con la concentración en muestras preparadas con macromoléculas de látex de varios tamaños, para comprobar la existencia de una zona con dependencia lineal.

La determinación de la concentración de los elementos formes (hematíes, leucocitos, plaquetas) que componen la sangre es una medida ampliamente utilizada en la práctica médica, tanto a nivel diagnóstico como terapéutico. En algunos casos, como el que ha dado origen a este proyecto, no interesa conocer la concentración de todos los elementos, sino tan sólo de alguno de ellos. Por ejemplo, en pacientes sometidos a un programa de quimio o radioterapia, es imprescindible asegurar que la concentración de neutrófilos en sangre es superior a un umbral situado entre 1500 a 2000 neutrófilos/ml antes de administrar una nueva sesión. Este parámetro (recuento de neutrófilos) condiciona en estos casos si se administra o retrasa el tratamiento. Actualmente, la única opción para conocer con exactitud este recuento, es el análisis in vitro de una muestra de 4-10 ml sangre obtenida mediante venopunción. Este procedimiento, además de ser cruento para el paciente, implica una serie de inconvenientes. A destacar: disponibilidad de espacios habilitados específicos, necesidad de personal capacitado para la extracción, tiempo necesario para la emisión de resultados, logística necesaria para traslado de muestras hasta laboratorio, y el elevado coste económico. De hecho, tan solo la eliminación de los restos de sangre supone una importante partida económica.

Se pretende por tanto mejorar los métodos de análisis de concentraciones de ciertos componentes, hematíes y neutrófilos, en la sangre, a fin de agilizar tiempos, abaratar costes (personal, dispositivos, infraestructura, tratamiento de deshechos) y reducir trastornos al paciente.

Los hematíes son glóbulos rojos encargados del transporte de oxígeno y eliminación del dióxido de carbono. Un recuento anormal, puede indicar algún tipo de patología.

Los neutrófilos son el tipo mas común de glóbulos blancos, representan

aproximadamente el 70% de estos y son una parte esencial del sistema inmune innato, dado que son los encargados de responder a cualquier infección ya sea bacteriana o de parásitos. Su vida útil es de tres días. Por ello es esencial en pacientes que han de recibir quimioterapia, conocer el nivel de neutrófilos que tienen en la sangre en el momento que han de recibir el tratamiento. Actualmente, estas medidas se realizan a través del citómetro de flujo, lo cual tiene un alto costo dado que realiza un análisis completo de las propiedades de la sangre, ademas el tiempo para obtener los resultados puede variar entre 48-72h que es el tiempo de vida útil de los neutrófilos.

Las imágenes 1 y 2 ilustran la composición de la sangre y la concentración de cada uno de sus componentes.



## 1.2 Consideraciones previas e inconvenientes

Dado que el propósito final es el análisis de las concentraciones *in vivo,* se ha planteado inicialmente realizar las medidas directamente sobre vasos sanguíneos, pero esto ha presentado grandes problemas.

Se ha decidido optar por realizar el análisis *ex vivo* a través de una única gota de sangre. Esto se ha debido a que hay una serie de problemas que dificultan enormemente su medida, como por ejemplo el que la piel produzca una fuerte absorción y dispersión de la luz (Tsumura et al, 2000) dado que la piel consta de dos capas principales; epidermis y dermis como se muestra en la imagen 3. La epidermis que varia entre 20-150µm

dependiendo de la edad, genero, peso y salud de cada persona y contiene además la melanina, que tiene una fuerte absorción en luz UV, mientras la dermis, contiene los vasos sanguíneos y capilares además de los nervios y su espesor puede variar entre 450-1000µm. Además la interacción con la piel se produce dos veces, cuando la luz incidente la atraviesa hasta reflejarse en la sangre y cuando ha de atravesarla de nuevo para poder ser medida.



Imagen 3. Corte de piel donde se muestran la epidermis y la dermis así como los componentes de esta ultima. Fuente: https://fisioterapeutas.wordpress.com/page/22/

## 1.3 Estado del arte

El estudio de los componentes de la sangre por difusión de luz se puede llevar a cabo bajo diferentes puntos de vista.

Los citómetros de flujo son instrumentos comerciales capaces de cuantificar los diferentes tipos de células que contiene una muestra de sangre extraída de un sujeto (Terstappen, 1988).

Los trabajos de Mattley (2001) y posteriormente de Greinier (2011) muestran que es posible discriminar entre los diferentes componentes de la sangre humana atendiendo a su capacidad para producir luz retro difundida. Todos estos son procedimientos *ex vivo* donde es necesario extraer sangre del paciente. También se han desarrollado diferentes técnicas de medida *in vivo* de aspectos relacionados con la sangre y sus componentes. Por ejemplo, los trabajos de Kimura (2010) muestran un dispositivo muy compacto capaz de determinar la existencia de flujo sanguíneo. Sin embargo, no distinguen entre

componentes y por lo tanto no estiman su concentración.

Un referente de medida *in vivo* es el oxímetro de flujo. Existen numerosas versiones de este dispositivo capaces de estimar la densidad de hematocrito en sangre mediante una medida de la absorción de luz que se produce cuando dos haces de diferentes longitudes de onda atraviesan una parte vascularizada del cuerpo humano. Por último, una técnica que ha alcanzado buenos resultados es el marcado de moléculas. En general esta técnica se basa en la introducción en la corriente sanguínea de un elemento que presenta fluorescencia (Novak, 2004) o más recientemente de nanopartículas que aumentan la capacidad de difundir luz del componente sanguíneo objeto de estudio (Wang, 2011).

Existe una técnica denominada Láser Speckle Interferometry (LSI) que se basa en la medida del moteado interferencial producido por luz difundida. La técnica consiste en recoger sobre una cámara la luz difundida por los componentes de la sangre y medir el contraste y/o las frecuencias espaciales del moteado que aparece en la cámara. En general, aparece un moteado estático debido a la luz difundida por la piel más otro dinámico debido a la luz difundida por los elementos formes que arrastra el flujo de sangre. Con este tipo de medidas Bi (2013) han determinado *in vivo* la existencia de flujo sanguíneo, aunque no han llegado a determinar la composición del mismo. Sus medidas se realizaron con luz retro difundida sobre varios puntos del brazo de una persona. Una interesante revisión sobre el estado de la técnica se puede encontrar en Senarathna (2013).

Como puede verse, aunque se están utilizando diferentes técnicas para medir flujo de sangre y forma de componentes, aún no se ha logrado la cuantificación de las concentraciones relativas.

Por otro lado está el trabajo de Chicea (2006 y 2013). Donde se analizan concentraciones de partículas en diferentes fluidos, a través del análisis de su Speckle. Y que ha servido de base para la realización del presente estudio de las concentraciones de hematíes y neutrófilos en muestras de sangre *ex vivo*.

14

## 1.4.1 Breve historia

La primera teoría sobre el Speckle se desarrolló en los años 60.

En los 70, se comenzó a investigar sobre la variación temporal del Speckle causada por el movimiento. Concretamente la conexión entre las fluctuaciones del patrón de Speckle y el movimiento de los centros de dispersión en los organismos vivos. La manera en que se manifestaban las fluctuaciones en el Speckle es la reducción del contraste del patrón.

En los 80, este efecto fue usado en fotografiá para estudiar el flujo sanguíneo en la retina (Fercher, 1981). Aunque la técnica funcionaba, la necesidad de procesar las fotografiás antes de poder acceder a la información resulto ser un problema y el interés en la técnica se desvaneció.

Ya en los 90, los nuevos métodos digitales, permitieron el desarrollo de una versión en tiempo real del método mucho más útil.

## 1.4.2 Patrón de interferencia

Cuando un haz de luz coherente ilumina una muestra irregular, se produce un efecto de interferencia aleatoria con forma granular que se denomina Speckle, como se muestra en la imagen 4.



Imagen 4. Ejemplo de patrón de Speckle. Esta imagen fue tomada en el laboratorio utilizando una muestra de macromoléculas de látex de 3nm iluminada con un láser de 532nm y con la cámara situada en la normal del haz del láser, 10/01/14

Speckle es un patrón de interferencia producido por la luz reflejada o dispersada (Scattering) desde diferentes partes de la superficie de la muestra iluminada. Si la superficie es rugosa (variaciones de altura mayores a la longitud de onda del láser usado), la luz de diferentes partes de la superficie atraviesa caminos ópticos con diferentes longitudes antes de alcanzar el plano imagen. La imagen resultante en un punto, es determinada por la superposición de todas las ondas que llegan a ese punto. Si la amplitud resultante es cero porque todas las ondas se cancelan, en dicho punto se vera una mota oscura mientras que si todas las ondas que llegan a ese punto lo hacen en fase, se observara una intensidad máxima.

El Speckle es un fenómeno aleatorio y ha de describirse estadísticamente. Goodman (1975) desarrolla una teoría detallada, de la que se ha extraído la expresión para el contraste del patrón de Speckle en la práctica como la desviación estándar frente la intensidad media, ecuación 1.

$$K = \frac{\sigma}{\langle I \rangle}$$
 1

#### 1.4.3 Variación temporal

Si la muestra es heterogénea y sus componentes presentan un movimiento, dicho Speckle, varía conforme al movimiento de los componentes de la muestra y variarán sus propiedades en relación al tamaño de los componentes, su concentración y su movimiento.

Para movimientos pequeños, el patrón se mueve como un todo y el patrón mantiene una correlación. Mientras que para movimientos grandes, el patrón se "decorrelaciona" y cambia totalmente. Esto también sucede cuando la luz se dispersa por un gran número de móviles individuales, tales como partículas en un fluido.

Es razonable asumir que el espectro de frecuencias tendrá una dependencia con la velocidad de movimiento de los dispersores. Por lo tanto, debería ser posible obtener información acerca del movimiento de los dispersores a través de un estudio de la estadística temporal de las fluctuaciones de Speckle.

## 2. MONTAJE EXPERIMENTAL

Se ha utilizado el dispositivo que se muestra en la imagen 5 formado por tres láser de longitud de onda 405nm, 532nm y 633nm respectivamente.



Imagen 5. Dispositivo experimental. En color rojo, el camino que siguen los láseres y la refracción que sufren al atravesar la muestra.

Los haces se han dirigido hacia la muestra por medio de divisores de haz y espejos, después de hacerlos pasar por un polarizador para asegura que todos tuviesen la misma polarización lineal. Finalmente los haces se han focalizado sobre la muestra utilizando un objetivo x10 tal como se observa en la figura 6.



Imagen 6. Focalización de los diferentes láseres utilizados sobre la muestra.

La muestra de fluido se ha introducido en un capilar de 100 micras de diámetro interno como se observa en la figura 1 y se ha depositado sobre un portamuestras diseñado para

el experimento. El portamuestras descansaba sobre un carril mecánico, que se ha utilizado para desplazar lateralmente la muestra y tomar medidas de manera aleatoria en diferentes zonas del fluido, que se controlaba a través del PC. Imagen 7



Imagen 7. Montaje del portamuestras en el carril mecánico. La imagen de la izquierda muestra el portamuestras ampliado.

Figura 1. Esquema de un portamuestras con forma de capilar de 100µm de diámetro interior

La longitud de onda de los láseres se ha seleccionado de acuerdo al espectro de absorción y scattering de la sangre como muestran las figuras 2 y 3 respectivamente.



En la figura 2 se observa que alrededor de 405nm (408nm exactamente) los hematíes tienen un pico de absorción, que ademas coincide con un valle de scattering como se observa en la figura 3. Para la longitud de onda de 532nm se observa un pico de absorción y un valle de scattering menos pronunciados. En 633nm se observa un valle de absorción y también de scattering.

Se ha dispuesto de una cámara USB modelo UI-154x-C conectada a un PC para la toma de datos. A través del software de captura de datos uEye Demo 2.40.0005 se han tomado imágenes que se han analizado posteriormente con un pluging diseñado para tal efecto, en el entorno del programa de tratamiento de imagen ImageJ. La elección de la cámara responde tanto a la disponibilidad de hardware del laboratorio como al espíritu economicista del proyecto y que avala el trabajo de Richards (2013).

## 2.1 Colocación de la cámara.

Se ha determinado el proceso óptimo de captura de imágenes tomando datos con ángulos comprendidos entre el back y el fordward (Back, 60°, 90°, 120°, 180°) de manera perpendicular a la muestra y sobre el eje que ilumina el láser. Las imágenes se han tomado con y sin polarizadores cruzados, los cuales aseguraban la eliminación de parte del ruido. Se ha determinado finalmente que la posición optima de la cámara por intensidad y calidad de señal es en forward sin polarizador cruzado. Dado que el capilar que contiene la muestra genera un patrón claro de interferencia, se ha apartado la cámara unos grados del eje (aproximadamente 3,5°) como muestra la figura 4 para evitar enfrentar la cámara con la señal directamente, lo que genera excesivo ruido.



Figura 4. Esquema de la colocación de la cámara, en posición forward y apartada del eje del haz del láser 3.5°

La distancia final de la cámara a la muestra se ha fijado en 10cm para conseguir que el tamaño de las motas del Speckle ocupase varios pixeles. De no ser así, la cámara no tendría resolución suficiente y después sería imposible analizar las imágenes.

#### 2.2 Toma de datos

Las imágenes han sido adquiridas en niveles de gris dado que, aunque en RGB a simple vista no exista saturación, el canal del color del láser al descomponer la imagen satura con facilidad.

Se ha mantenido la potencia constante en cada láser, lo cual ha sido comprobado por medio de un fotómetro al que se le ha enviado la señal a través de un beamsplitter situado a la entrada del objetivo. Los tiempos de exposición de las imágenes han sido entre 1ms y 10ms (1ms, 2ms, 5ms, 8ms, 10ms). Se ha utilizado dos tamaños de partículas para las muestras (3nm y 10nm) con diferentes concentraciones de macromoléculas de látex (10%, 15%, 20%, ,30%, 40% a partir de la muestra patrón al 10% en peso). Finalmente se ha determinado que los tiempos de exposición óptimos para las partículas utilizadas están entre 8 ms y 10 ms.

Las imágenes 8 y 9 muestran la evolución de los datos obtenidos con una muestra de macromoléculas de 3nm iluminada con un láser de 532nm. La imagen 8 muestra una secuencia de imágenes correspondientes a varios tiempos de exposición y una concentración al 10%. Se ha elegido esta concentración porque es la que más intensidad produce.



Imagen 8. Resultado de las imágenes obtenidas al variar los tiempos de exposición. De izquierda a derecha, 1, 2, 5, 8 y 10ms respectivamente. La muestra utilizada esta compuesta de macromoléculas de látex de 3nm en una concentración del 10% iluminada con un láser de 532nm. Imágenes obtenidas en el laboratorio. 28/01/14

La imagen 9 muestra una secuencia de imágenes correspondientes a varias concentraciones y un tiempo de exposición de 8ms.



Imagen 9. Resultado de las imágenes obtenidas al variar la concentración. De izquierda a derecha, 10, 15, 20 y 40% respectivamente. La muestra utilizada esta compuesta de macromoléculas de látex de 3nm. Se utilizo un tiempo de exposición de 8ms y se ilumino la muestra con un láser de 532nm. Imágenes obtenidas en el laboratorio. 28/01/14

Se deduce de las imágenes 8 y 9 que al utilizar partículas de mayor tamaño la intensidad producida por las muestras disminuye. Por tanto para utilizar partículas con tamaños mas grandes, se debe aumentar el tiempo de exposición. Con el aumento de la concentración aunque decrece dicha intensidad, no altera el tiempo de exposición necesario dado que el rango de densidad donde la linealidad se conserva esta bien determinado.

Como era de esperar, a partir de la imagen 8, se observa que la intensidad crece con el tiempo de exposición. Así mismo, en la imagen 9 se observa a simple vista que la intensidad decrece con la concentración.

## 2.3 Procesado de datos

Se han analizado la intensidad del Speckle, el contraste y el tamaño medio de las manchas a través de la correlación.

Para medir el contraste, se ha analizado la imagen en el entorno de ImageJ. Se ha obtenido la intensidad media (mean) y la varianza directamente a través del cálculo del histograma. Esto ha permitido calcular el contraste según la ecuación 1.

El tamaño de la mota interferencial se ha obtenido correlando una imagen consigo misma. Para ello, he realizado un pluging en el entorno de ImageJ de nombre "1a\_correlacion" que realiza los siguientes pasos:

- 1- Calculo de la FFT raw de la imagen de speckle
- 2- Módulo cuadrado de la imagen resultante
- 3- Transformada inversa y normalización.

Con esto obtenemos la función de auto correlación, pero falta determinar su anchura. Con el plugin "Radial\_Profile\_Angle\_Ext" se ha estudiado la intensidad radial de la imagen resultante. Se ha medido la anchura a media altura del pico principal de la gráfica resultante que corresponde al tamaño medio de la mota interferencial medida en pixeles.

## 2.4 Preparación de las muestras

En la preparación de las muestras, se ha seguido rigurosamente el estándar de higiene del laboratorio.

Los tubos de ensayo que han de contener las muestras se han limpiado con agua y jabón y se han aclarado, en primer lugar, con agua doblemente destilada, después con acetona y de nuevo con agua doblemente destilada. Se han introducido 20min en la máquina de ultrasonidos. Después se han introducido en agua bidestilada con jabón capturador 24h y se han aclarado con agua doblemente destilada. Finalmente se han depositado en la máquina de secado.



Imagen 10. En la fotografía de la izquierda se puede observar la maquina de ultrasonidos. La fotografía de la derecha muestra la maquina de secado.

## 2.5 Evolución de las muestras

Se han preparado muestras de macromoléculas de látex de dos tamaños diferentes (3nm y 10nm). Las macromoléculas de 3nm estaban diluidas al 10% en peso y se han usado como muestra patrón para elaborar las concentraciones deseadas en volumen. Las macromoléculas de 10nm se encontraban en estado solido. Tras molerlas con un mortero se ha preparado una disolución al 10% en peso que ha servido como patrón.

Estas muestras se han utilizado tanto para determinar la configuración optima del dispositivo de medida y la cámara, como para la comprobación de la relación de la concentración con los parámetros del Speckle (Intensidad, contraste y tamaño de la mota de interferencia).

Las macromoléculas se agregaban al poco tiempo de vida lo que hacía imposible la medición con ellas transcurridas unas horas. Para poder utilizarlas necesitaban previamente un baño de ultrasonidos y mantenerlas en un vibrador, para preparar en el momento de medida cada capilar a través del cual realizar las medidas.



Imagen 11. Fotografía del vibrador utilizado para evitar la agregación de partículas en las diferentes muestras.

Las muestras de hematíes se han analizado en un plazo máximo de 4 días, dado que con el paso del tiempo las mediciones mostraban comportamientos extraños debido a la agregación de partículas. El banco de sangre aconsejaba no darlas una vida útil mayor de 7 días. Las muestras se han mantenido refrigeradas durante ese tiempo, tras el cual, se ha realizado nuevas muestras y nuevas medidas.

Los neutrófilos han sido analizados en 24h. Su tiempo de vida son 72h, pero mantener las muestras evitando que se agregasen, suponía un maltrato a los neutrófilos en un vibrador o en un baño de ultrasonidos que erradicaba cualquier posibilidad de una correcta medición. Además, a diferencia de los hematíes, los neutrófilos han de conservarse sin refrigeración.

Finalmente, para las muestras con sangre filtrada (véase, sin neutrófilos) y sangre completa se ha repetido el proceso en plazos de menos de 24h para evitar los problemas anteriormente citados.

Se ha repetido el proceso de toma de datos y análisis con cada una de las muestras, donde las únicas variaciones introducidas han sido la potencia de los láseres de acuerdo a la dispersión de cada una de las mismas.

Las diferentes concentraciones de las muestras de macromoléculas de látex se han realizado con agua bidestilada en tubos de ensayo. Los hematíes, neutrófilos y muestras de sangre completa se han realizado con PBS facilitado por el banco de sangre junto con las diferentes muestras. Los portamuestras han sido rellenados por capilaridad

## 2.6 Proceso de medida complementario

Con la ayuda de un detector colocado en backscattering al cual se ha enviado la señal por medio de un beamsplitter, se ha realizado la medida cualitativa de concentraciones. La señal del detector se registro en función del tiempo en un osciloscopio. En el camino óptico entre el beamsplitter y el detector, se ha introducido un pinhole en el plano conjugado del plano focal del objetivo de microscopio, como muestra la imagen 12, lo que lo hace equivalente a una medición puntual en vez de espacial como se ha venido haciendo.





Imagen 12. La fotografía de la izquierda muestra el montaje experimental, añadido al inicial, para la realización de un experimento extra. El trazo verde muestra el camino que sigue el láser hasta llegar a la muestra y de esta al fotómetro.

La imagen de la derecha corresponde al esquema de dicho montaje.

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En este apartado se ha tratado, además de mostrar los resultados obtenidos, de poner de manifiesto el proceso de evolución del experimento, partiendo de una muestra de macromoléculas de látex hasta realizar las medidas de concentraciones en muestras de sangre completa.

Comenzamos mostrando los resultados obtenidos con varios tamaños y concentraciones de macromoléculas de látex, seguidamente de hematíes, neutrófilos, sangre filtrada para eliminar los neutrófilos y finalmente sangre completa.

La imagen 13, ya mostrada en el apartado 2.2 de este trabajo y repetida aquí, muestra ejemplos de los datos recogidos para las muestras de 3nm, con concentraciones entre el 10-40% y para un tiempo de exposición de 8ms. Se pone de manifiesto como la intensidad de la imagen disminuye con la concentración de partículas.



Imagen 13. Resultado de las imágenes obtenidas al variar la concentración. De izquierda a derecha, 10, 15, 20 y 40% respectivamente. La muestra utilizada esta compuesta de macromoléculas de látex de 3nm. Se utilizo un tiempo de exposición de 8ms y se ilumino la muestra con un láser de 532nm. Imágenes obtenidas en el laboratorio. 28/01/14

La imagen 14, donde se muestra la misma medida realizada con macromoléculas de 10nm, presenta el mismo comportamiento. Además, comparando las dos imágenes, se observa que el tamaño de las macromoléculas hacen disminuir la intensidad.



Imagen 14. Resultado de las imágenes obtenidas al variar la concentración. De izquierda a derecha, 10, 15, 20, 30 y 40% respectivamente. La muestra utilizada esta compuesta de macromoléculas de látex de 10nm. El tiempo de exposición fue de 8 ms y se iluminó con un láser de 532nm. Imágenes obtenidas en el laboratorio. 28/01/14

A partir de las imágenes 13 y 14 según el método descrito en el apartado 2.3, se han obtenido las figuras 5, 6 y 7 relativas a la intensidad, concentración y tamaño de la mota de Speckle para las muestras de macromoléculas de 3nm y 10nm. Las gráficas exponen los resultados a diferentes tiempo de exposición, 5, 8 y 10ms y siempre con el láser de 532nm. En dichas figuras se observa una dependencia de los parámetros estudiados respecto a la concentración. Se observa ademas que el tiempo de exposición mas adecuado se encuentra entre 8ms y 10ms.



Figura 5. La gráfica de la izquierda representa las curvas del contraste para las macromoléculas de 3nm. El color verde para un tiempo de exposición de 5ms, el azul 8ms y el rojo 10ms. La gráfica central representa las mismas medidas para las macromoléculas de 10nm. Y la gráfica de la derecha enfrenta los resultados de los dos tamaños de macromoléculas.

En la gráfica de la izquierda de la figura 5 se observa que con las partículas de menor tamaño, al aumentar la concentración el contraste se vuelve indistinguible con tiempos de exposición pequeños. Para las partículas más grandes el comportamiento es aproximadamente lineal en todo el rango de concentraciones estudiado. Se observa una dependencia inversa del contraste frente a la concentración. Si se comparan los resultados obtenidos con las macromoléculas de 3nm y las de 10nm, se observa que con las de mayor tamaño se obtiene un contraste menor.



Figura 6. La gráfica de la izquierda representa las curvas de la intensidad para las macromoléculas de 3nm. El color verde para un tiempo de exposición de 5ms, el azul 8ms y el rojo 10ms. La gráfica central representa las mismas medidas para las macromoléculas de 10nm. Y la gráfica de la derecha enfrenta los resultados de los dos tamaños de macromoléculas.

En la figura 6 se muestra una dependencia general de la intensidad inversa con la concentración como ocurría con el contraste. En la zona más diluida se observa una tendencia contraria que da lugar a un pico en el 15% de concentración. Esto está en concordancia con el trabajo de Chicea (2006 y 2013) donde se indica que la zona lineal es reducida y excluye por tanto puntos con concentraciones excesivamente diluidas.



Figura 7. La gráfica de la izquierda representa las curvas del tamaño de la mota del patrón de Speckle para las macromoléculas de 3nm. El color verde para un tiempo de exposición de 5ms, el azul 8ms y el rojo 10ms. La gráfica central representa las mismas medidas para las macromoléculas de 10nm. Y la gráfica de la derecha enfrenta los resultados de los dos tamaños de macromoléculas.

La figura 7 da cuenta de la relación del tamaño de la mota de Speckle con la concentración. Se observa que al igual que los anteriores parámetros, dicha relación es decreciente con un comportamiento cercano al lineal y bastante semejante para los dos tamaños de macromoléculas.

En la figura 8 se han resumido los resultados obtenidos dentro de la zona lineal para los tres parámetros estudiados con tiempos de exposición de 8ms y 10ms.



Figura 8, La gráfica de la izquierda representa las curvas de contraste, la centra de intensidad y la de la derecha de tamaño de la mota del patrón de Speckle. En las tres gráficas el color rojo representa un tiempo de exposición de 10ms y el azul de 8ms mientras que la linea continua representa las macromoléculas de 3nm y la discontinua de 10nm.

Una vez comprobada la región lineal de los mencionados parámetros del patrón con las diferentes concentraciones, se ha procedido a realizar las medidas sobre muestras de hematíes. Las imágenes 15, 16 y 17, reproducen ejemplos de los resultados obtenidos con una muestra de hematíes, para los tres láseres de 633, 532 y 405 nm respectivamente.



Imagen 15. Resultados obtenidos al variar la concentración. De izquierda a derecha, 2, 4, 6, 7y 10% respectivamente. Se trata de una muestra de hematíes. El tiempo de exposición utilizado fue de 8ms. La muestra fue iluminada con un láser de 633nm. Imágenes obtenidas en el laboratorio. 10/04/14



Imagen 16. Resultados obtenidos al variar la concentración. De izquierda a derecha, 2, 4, 6, 7y 10% respectivamente. Se trata de una muestra de hematíes. El tiempo de exposición utilizado fue de 8ms. La muestra fue iluminada con un láser de 532nm. Imágenes obtenidas en el laboratorio. 10/04/14



Imagen 17. Resultados obtenidos al variar la concentración. De izquierda a derecha, 2, 4, 6, 7y 10% respectivamente. Se trata de una muestra de hematíes. El tiempo de exposición utilizado fue de 8ms. La muestra fue iluminada con un láser de 405nm. Imágenes obtenidas en el laboratorio. 10/04/14

Dado el color rojo característico de los hematíes, el láser de 405nm, imagen 17, no ha presentado resultados analizables puesto que la señal ha sido demasiado tenue y el error es del orden o mayor que los datos. En la gráfica 2 de la sección 2, se observa que para esta longitud de onda el espectro del scattering de los hematíes presenta un valle significativo.

Tras analizar las imágenes 15 y 16 según el apartado 2.3, se han calculado los parámetros de los patrones de speckle frente a la concentración de hematíes obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 9.



Figura 9. Parámetros de intensidad (columna de la izquierda), contraste (columna central) y tamaño de la mota del patrón de interferencia (columna de la derecha) en una muestra de hematíes. Los colores rojo y verde representan los láseres de 633 y 532 nm respectivamente.

A diferencia de los resultados obtenidos con las macromoléculas donde los tres parámetros tienen una relación inversamente proporcional a la concentración, para las muestra de hematíes el contraste crece conforme lo hace la concentración.

El siguiente paso ha sido analizar muestras de neutrófilos puras. Este proceso es

sumamente complicado debido al volumen de las muestras de neutrófilos proporcionadas por el banco de sangre y la dificultad para garantizar la pureza de las muestras. Las medidas se han realizado sobre dos muestras diferentes. Dichas muestras presentaban peculiaridades dado que la primera era mas pura y de muy poco volumen, mientras que la segunda presentaba alguna impureza constatable con un simple control visual, pero su volumen era mayor. Dado el carácter de las muestras el resultado es aun, si cabe, mas cualitativo. La figura 10 muestra los resultados obtenidos para ambas muestras de neutrófilos.



Figura 10. Parámetros de intensidad (columna de la izquierda), contraste (columna central) y tamaño de la mota del patrón de interferencia (columna de la derecha) en distintas muestras de neutrófilos. La fila superior corresponde a la muestra menos pura y la inferior a la muestra mas pura. Los colores rojo, verde y azul representan los láseres de 633, 532 y 405nm respectivamente.

Se observa en la figura 10 una tendencia similar para los diferentes parámetros que se ha observado con los hematíes, si bien en la muestra menos pura, aparecen irregularidades.

Finalmente se ha realizado el estudio de sangre a la cual se le ha realizado un filtrado de neutrófilos por medio de una criba y de sangre completa (no filtrada). La figura 11 muestra los resultados obtenidos a partir de dichas muestras.



Figura 11. Parámetros de intensidad (columna de la izquierda), contraste (columna central) y tamaño de la mota del patrón de interferencia (columna de la derecha). La fila superior corresponde a una muestra de sangre cribada para eliminar los neutrófilos. La fila inferior muestra sangre completa. Los colores rojo, verde y azul representan los láseres de 633, 532 y 405nm respectivamente.

A partir de la figura 11, lo único destacable a priori es la aparición de señal para el láser de 405nm con altas concentraciones en la muestra de sangre completa (gráficas inferiores). Se observa la aparición de un punto en las concentraciones al 10%. A pesar del característico color rojo de la sangre debido a los hematíes, en concentraciones altas, los neutrófilos gracias a su carácter incoloro, emiten señal también en esas longitudes de onda, lo que se comprueba al no aparecer dicha señal en la muestra de sangre cuyos neutrófilos han sido cribados.

Finalmente en un experimento adicional, se ha realizado la medida de la intensidad en backscattering en función del tiempo, para un punto de la muestra, según se describe en el apartado 2.6. Es de esperar que los hematíes produzcan una señal homogénea compuesta por picos de altura similar y los neutrófilos generen picos mas pronunciados debido a su mayor capacidad de producir scattering para la longitud de onda utilizada, 532nm. La imagen 18, se muestran los resultados obtenidos para varias concentraciones estudiadas.





10%



Imagen 18. Capturas de un osciloscopio que recoge la señal de backscattering que generan diferentes concentraciones (2%, 4%, 7% y 10%) de una muestra iluminada con el láser de 532nm

Se puede observar que a mayor concentración, fijando un umbral que se corresponda al fondo de hematíes, aparecen un mayor número de picos significativos. Una vez más, este estudio adicional, se ha realizado de manera totalmente cualitativa como posible enfoque futuro para el proyecto en el que se engloba el presente estudio. El numero de picos sobre el umbral daría cuenta de la concentración de neutrófilos en la sangre.

## **4. CONCLUSIONES**

Analizando las imágenes de Speckle se ha determinado la zona de dependencia lineal de los parámetros de intensidad, contraste y tamaño medio de mancha, con la concentración de partículas en muestras de composición homogénea. Ello permite determinar la concentración a partir de las medidas de dichos parámetros del Speckle. El estudio se ha realizado para concentraciones entre 1% y 5%. Se ha de hacer un estudio más amplio a fin de determinar otras posibles zonas lineales o calibrables en rangos de concentraciones mayores a los estudiados hasta ahora.

El número de muestras empleadas hace que este estudio haya sido cualitativo, para calibrar el procedimiento se ha de repetir el proceso efectuando un mayor número de medidas y testeando un número más elevado de muestras. Si es lo suficientemente robusto, puede tener una aplicación a corto plazo.

Las medidas realizadas sobre las muestras de sangre completa y filtrada no arrojan resultados concluyentes para el propósito de medir la concentración de neutrófilos. En la figura 12 se observa la relación de intensidad de scattering producido por los diferentes componentes de la sangre. A 405nm la intensidad de scattering producido por los glóbulos blancos (PMN) es aproximadamente 8 veces la de los hematíes (RBCs). Puede parecer suficiente para detectar la señal, pero los neutrófilos se encuentran en una proporción 1/1500 frente a los hematíes. El volumen de la muestra iluminado es de aproximadamente 1mm<sup>3</sup>. Por cada mm<sup>3</sup> hay 1200-1500 neutrófilos lo que nos indica que la señal procedente de neutrófilos es del 5 por mil en comparación con la de los hematíes.



Figura 12. Scattering producido frente a la longitud de onda con la que se iluminan los distintos componentes de la sangre. Fuente: Greiner

A fin de igualar localmente la concentración relativa entre los neutrófilos y los hematíes, una propuesta para futuras medidas sería cambiar el portamuestras de manera que la muestra analizable este compuesta idealmente por una monocapa.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Bi, R., et al 2013 "Multi-channel deep tissue flowmetry based on temporal diffuse speckle contrast análisis", Optics Express, 19:22854-22861.

Chicea, D., 2006 "Biospeckle size and contrast measurement application in particle sizing and concentration assessment" Rom. Journ. Phys., Vol. 52, Nos. 5–7, P. 625–633

Chicea, D., 2013 "Estimating particle concentration in natural water by speckle contrast" Transylv. Rev. Syst. Ecol. Res. 15.1

Fercher, A. F. and Briers, J. D., 1981 "Flow visualization by means of singleexposure speckle photography," Opt. Commun. 37(5), 326–330.

Greiner, C., et al 2011 "Confocal Backscattering Spectroscopy for Leukemic and Normal Blood Cell Discrimination", Cytometry A, 79A: 866-873.

Goodmann, J.W., 1975 "Statistical properties of láser speckle patterns," in Láser Speckle and Related Phenomena, J. C. Dainty, Ed., Vol. 9 in series Topics in Applied Physics, pp. 9–75, Springer, Berlin, Heidelberg

Kimura, Y., et al 2010 "Integrated Láser Doppler Blood Flowmeter Designed to Enable Wafer-Level Packaging", IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING, 57:2026-2033.

Mattley, Y.D., et al 2001, "Multiwavelength spectroscopy for the detection, identification and quantification of cells", Proc. SPIE 4206, Photonic Detection and Intervention Technologies for Safe Food, 64.

Novak, J. et al 2004 "An in vivo flow cytometer for real-time detection and quantification of circulating cells", Opt Lett, 29:77–79.

Richards, L. M., et al 2013 Low-cost láser speckle contrast imaging of blood flow using a webcam.

Senarathna, J., et al 2013 "Láser Speckle Contrast Imaging: Theory, Instrumentation and Applications", IEEE REVIEWS IN BIOMEDICAL ENGINEERING, 6: 99-110.

Terstappen, L.W.M.M. et al 1988, "Four-Parameter White Blood Cell Differential Counting Based on Light Scattering Measurements", Cytometry; 9(1):39-43.

Wang, X., et al 2011 "Detection of Circulating Tumor Cells in Human Peripheral Blood using Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoparticles", Cancer Res., 71(5): 1526–1532.

## Agradecimientos

Agradecer al Banco de Sangre y Tejidos de Cantabria y en especial a su director José Luis Arroyo, su colaboración facilitando las muestras y asesorando sobre su manejo y mantenimiento, así como su completa disponibilidad e interés en este proyecto.