



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Microscopía Multifotónica del Ojo Humano en Vivo. Desarrollo y Optimización de un Dispositivo Compacto para Uso Clínico**

**Dña. Rosa María Martínez Ojeda**  
**2022**



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA



Departamento de Física

Laboratorio de Óptica

**MICROSCOPIA MULTIFOTÓNICA DEL OJO  
HUMANO EN VIVO. DESARROLLO Y  
OPTIMIZACIÓN DE UN DISPOSITIVO COMPACTO  
PARA USO CLÍNICO**

Trabajo presentado en la Facultad de Medicina

de la Universidad de Murcia por:

**Rosa María Martínez Ojeda**

para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Doctorado en Ciencias de la Visión. Facultad de Medicina.

Laboratorio de Óptica. Departamento de Física.

Universidad de Murcia.

**Septiembre 2022**







UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. Juan Manuel Bueno García, Catedrático de Universidad del Área de Óptica en el Departamento de Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Microscopía multifotónica del ojo humano en vivo. Desarrollo y optimización de un dispositivo compacto para uso clínico", realizada por D<sup>a</sup>. Rosa María Martínez Ojeda, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 01 de Septiembre de 2022

Firmante: JUAN MANUEL BUENO GARCIA; Fecha-hora: 01/09/2022 08:41:56; Emisor del certificado: C=ES,O=ACCYO,U=PKIACCY,CN=ACCYCA+120;



Mod: T-20

Código seguro de verificación: RUxFM1c-6Db2Ixdk-znXw7M8E-8QkJHo5u

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. Pablo Artal Soriano, Catedrático de Universidad del Área de Óptica en el Departamento de Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Microscopía multifotónica del ojo humano en vivo. Desarrollo y optimización de un dispositivo compacto para uso clínico", realizada por D<sup>a</sup>. Rosa María Martínez Ojeda, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 01 de Septiembre de 2022

Firmante: PABLO LUIS ARTAL SORIANO. Fecha-hora: 01/09/2022 09:47:03. Emisor del certificado: CN=AC FNMU Usuarios,OU=Ceres,O=FNMU-RCM,ES



Mod: T-20

Código seguro de verificación: RUxFMgc0-ipB88to9-7gojsy3K-IWGQIwCd

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>



*“A day, a week, a month, a year  
Every second brings me here [...]  
Waiting on the lightning  
Waiting on the light, what will the light bring?”<sup>1</sup>*

Arcade Fire

*A mis padres,  
por todo su apoyo.*

---

<sup>1</sup> Traducción:

“Un día, una semana, un mes, un año  
Cada segundo me trae aquí [...]  
Esperando el relámpago  
Esperando la luz, ¿Qué traerá la luz?”



# Resumen

Durante las últimas décadas la microscopía multifotónica se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para visualizar tejidos biológicos. En particular, la microscopía de generación de segundo armónico (SHG, del inglés *Second Harmonic Generation*) tiene una ventaja importante respecto a métodos de microscopía convencionales, debido a su capacidad para observar tejidos formados por colágeno tipo I, como la esclera y la córnea, sin necesidad de operaciones de teñido y fijado. Dichas estructuras oculares son las que vamos a estudiar en esta Tesis Doctoral. Para ello, presentamos un prototipo de microscopio multifotónico compacto que nos servirá para examinar el segmento externo del ojo humano en vivo.

Este nuevo sistema requiere una calibración de los parámetros de adquisición de imágenes óptimas en tiempos de exposición reducidos, buscando un compromiso entre la calidad de imagen y la seguridad de los tejidos bajo estudio. La evaluación de la calidad de imágenes, registradas con diferentes parámetros, ha permitido confirmar que se pueden obtener imágenes óptimas, con alta resolución, en tiempos de exposición menores de 1 s.

Una vez evaluadas las condiciones de registro óptimo, fue necesario saber si el sistema es apto para su uso en vivo, teniendo en cuenta parámetros de la fuente láser, el tiempo de exposición y el ángulo visual, siguiendo la norma ANSI Z136.1. Los cálculos de la exposición máxima permitida (*Maximum Permissible Exposure*, MPE) para el microscopio multifotónico indican que es seguro para las condiciones experimentales propuestas. Tras el análisis de seguridad, se procedió al registro de imágenes en condiciones en vivo en ojos de voluntarios sanos, registrando imágenes de la córnea, la esclera y el limbo esclerocorneal, con suficiente resolución como para detectar fibras y células individuales, comparables a condiciones *ex vivo*, con alta repetibilidad.

En algunos casos, movimientos involuntarios del ojo, pueden dar lugar a una degradación de la imagen. Además, como en todas las muestras biológicas, en el ojo también se producen fenómenos tipo *scattering*, reduciendo la calidad de las imágenes. Por esta razón se ha propuesto la mejora de imágenes multifotónicas mediante diferentes técnicas.

Se ha analizado la utilidad de un procedimiento de deconvolución ciega marginal. Este método permite restaurar imágenes cuando se cuenta con poca información del sistema experimental, sin necesidad de supervisar el proceso. Con su aplicación se mejora la calidad de las imágenes deconvolucionadas, así como su resolución, en comparación a las imágenes originales.

Otro método para mejorar las imágenes registradas ha sido el uso de luz polarizada radialmente, mediante una lámina “*S-waveplate*”. Las imágenes adquiridas con la luz radial se han comparado con imágenes registradas, cuasi simultáneamente, con luz polarizada circularmente. El aumento en la calidad de imágenes adquiridas con luz radial es destacable, especialmente con la profundidad, donde las imágenes se degradan más debido a las aberraciones y el *scattering*.

Finalmente, se han comparado imágenes registradas con un láser de pulsos de menos de 10 fs, con dimensiones reducidas y mayor flexibilidad para la implementación de un prototipo de microscopio multifotónico clínico, y con un láser de Ti:Zafiro de más de 120 fs, de grandes dimensiones y alto coste. Los resultados muestran que el primero se ve más afectado por la acción de la dispersión cromática, por lo que es necesario aumentar la potencia de salida del láser para obtener imágenes de cualidades similares a las adquiridas con el láser de Ti:Zafiro.

Los métodos de mejora aplicados, con mayor o menor éxito, permiten obtener imágenes multifotónicas óptimas que aportan información sobre las estructuras de la córnea y la esclera, sin poner en riesgo la integridad de los tejidos, ya que se mantienen varios órdenes de magnitud por debajo de los niveles de exposición máximos permitidos para el ojo humano.



# *Abstract*

In the past decades, multiphoton microscopy has become a very useful tool for the visualization of biological tissues. In particular, second harmonic generation (SHG) microscopy has an important advantage over conventional microscopy methods, due to its ability to observe tissues formed by type I collagen, such as the sclera and the cornea, without staining and/or fixation procedures. These ocular structures are of interest for this PhD Thesis. For this purpose, we present a prototype of a compact multiphoton microscope adapted for the examination of the external segment of the living human eye.

This new system requires a calibration of the acquisition parameters, aiming at a compromise between image quality and safety for the biological tissues under study, to record optimal images using reduced exposure times. The evaluation of the quality of images, recorded with different acquisition parameters, has confirmed that it is possible to achieve an optimal recording with exposure times below 1 s.

Once the optimal recording conditions have been evaluated, it is necessary to know if the experimental system is suitable for *in vivo* imaging, taking into account the laser source parameters, the exposure time and the visual angle, following the ANSI Z136.1 standards. Therefore, a detailed analysis of the Maximum Permissible Exposure (MPE) calculation for the experimental system developed is included herein. This analysis concludes that the multiphoton microscope developed in this work is safe for the proposed experimental conditions. After the safety analysis, we proceeded to record images in live conditions of healthy volunteer patients, keeping the experimental conditions well below the calculated MPE. As a result, images of the cornea, sclera and sclero-corneal limbus were recorded with sufficient resolution to detect individual fibers and cells, comparable to ex-vivo samples, with high repeatability.

In some cases, involuntary eye movements can cause image degradation, hence the need to reduce the exposure time, and, as in all biological samples, when images are obtained deeper in the eye, phenomena such as scattering occur, which also reduce the quality of the images. Due to this, different methods of image improvement are proposed.

We have reported a marginal blind deconvolution method. This allows restoring images when little information is available from the experimental system, and unsupervised. This procedure has demonstrated to increase the quality of the deconvoluted images, as well as in their resolution, compared to the original images.

An alternative enhancement method has been the use of radially polarized light, by means of an *S-waveplate*. The images acquired with radially polarized light have been compared with images recorded, quasi-simultaneously, with circularly polarized light. The increase in quality of images acquired with radial light is remarkable, especially noticeable with depth, where images are more degraded due to aberrations and scattering.

Finally, we have compared images recorded with a sub-10fs laser, with reduced dimensions and greater flexibility for the implementation of a prototype multiphoton microscope in the clinic, and a typical Ti:Sapphire laser of more than 120 fs, of large dimensions and high cost. The results show that the sub-10fs laser is highly affected due to the action of chromatic dispersion, being necessary to increase the laser output power to obtain images of similar qualities to those acquired with the Ti:Sapphire laser.

The enhancement methods applied in this Thesis allowed enhanced multiphoton images that provide information on the structures of the cornea and sclera, while not compromising the integrity of the tissues, since they remain several orders of magnitude below the maximum exposure levels allowed for the human eye.

# Índice

<b>Capítulo 1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1. Colágeno .....	3
1.2. Estructuras oculares ricas en colágeno tipo I.....	5
1.2.1. Córnea .....	5
1.2.2. Esclera .....	10
1.3. Instrumentos clínicos para visualizar la córnea y la esclera .....	12
1.4. Microscopía multifotónica.....	14
1.4.1. Fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF).....	15
1.4.2. Generación de segundo armónico (SHG) .....	16
1.5. Limitaciones y métodos de mejora de la señal multifotónica .....	18
1.5.1. Potencia de pico y duración del pulso láser .....	19
1.5.2. Polarización .....	20
1.5.3. Óptica adaptativa .....	21
1.5.4. Deconvolución.....	22
1.6. Microscopía multifotónica en el segmento anterior del ojo .....	24
1.7. Motivación, objetivos y estructura del trabajo .....	29
1.7.1. Motivación y objetivos .....	29
1.7.2. Estructura del trabajo .....	31
<b>Capítulo 2. Microscopio multifotónico compacto. Métodos de procesado y análisis de imágenes</b> .....	<b>33</b>
2.1. Sistema experimental: Microscopio multifotónico compacto .....	35
2.1.1. Fuente de iluminación .....	35
2.1.2. Recorrido del haz y sistema óptico.....	36
2.1.3. Unidades de detección.....	38
2.1.4. Posición del sujeto.....	39
2.1.5. Registro de imágenes .....	40
2.2. Procesado de imágenes .....	42
2.2.1. Calidad de imagen .....	43
2.2.2. Organización de la muestra .....	45
2.2.3. Textura de la muestra .....	47
2.2.4. Densidad de fibras en la muestra .....	50
2.2.5. Reducción del ruido .....	52
2.3. Deconvolución ciega marginal .....	54
2.4. Muestras utilizadas .....	57
2.4.1. Muestras y sujetos .....	57

**Capítulo 3. Análisis de los parámetros de registro óptimos .....59**

3.1.	Detección de señal lineal y no lineal .....	61
3.2.	Parámetros de registro y tiempo de exposición .....	61
3.3.	Distorsión en la imagen por acción del escáner .....	63
3.4.	Parámetros de registro y señal multifotónica .....	66
3.5.	Parámetros de registro y calidad de imagen .....	68
3.6.	Discusión .....	73

**Capítulo 4. Microscopía multifotónica del ojo humano en vivo .....77**

4.1.	Seguridad en el registro de imágenes del ojo humano en vivo .....	79
4.1.1.	Máxima exposición láser permitida en la retina .....	80
4.1.2.	Máxima exposición láser permitida en la córnea .....	84
4.1.3.	Condiciones de exposición experimental.....	85
4.2.	Imágenes multifotónicas de estructuras ocular en vivo.....	87
4.2.1.	Imágenes SHG de la córnea.....	88
4.2.2.	Imágenes SHG de la esclera .....	90
4.2.3.	Imágenes SHG del limbo esclerocorneal .....	92
4.2.4.	Repetibilidad .....	94
4.2.5.	Comparación de imágenes multifotónicas: <i>En vivo</i> vs. <i>Ex vivo</i> .....	94
4.2.6.	Imágenes multifotónicas de otras estructuras oculares de interés .....	96
4.3.	Discusión .....	99

**Capítulo 5. Deconvolución de imágenes multifotónicas .....107**

5.1.	Deconvolución de imágenes multifotónicas de muestras ex vivo .....	109
5.1.1.	Impacto de la deconvolución en la calidad de imagen .....	110
5.2.	Deconvolución de imágenes multifotónicas de muestras en vivo .....	112
5.2.1.	Impacto de la deconvolución en la calidad de imágenes en vivo .....	113
5.2.2.	Análisis de la estructura .....	114
5.3.	Discusión .....	117

**Capítulo 6. Mejoras de imágenes de segundo armónico usando luz polarizada radial .....121**

6.1.	Sistema experimental y lámina <i>S-waveplate</i> .....	123
6.2.	Muestras, registro de imágenes y métricas de calidad.....	125
6.3.	Aberración de onda y estado de polarización del haz incidente.....	126
6.4.	Resultados.....	127
6.4.1.	Efecto de la polarización de la luz en imágenes SHG.....	127
6.4.2.	Efecto combinado de luz polarizada radial y profundidad .....	130
6.4.3.	Estudio de la organización del tejido .....	133
6.5.	Discusión .....	134

<b>Capítulo 7. Efectos de los pulsos de sub-10 fs en microscopía multifotónica</b>	<b>137</b>
7.1. Láser sub-10 fs y sistema experimental.....	139
7.2. Duración del pulso y aberración de onda .....	141
7.3. Resultados: Imágenes TPEF y SHG .....	143
7.4. Discusión .....	147
<b>Capítulo 8. Conclusiones, contribuciones y perspectivas</b>	<b>151</b>
8.1. Conclusiones.....	153
8.2. Contribuciones científicas y publicaciones .....	154
8.3. Perspectivas futuras .....	158
<b>Bibliografía</b> .....	<b>161</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>181</b>



# *Capítulo 1*

## **Introducción**

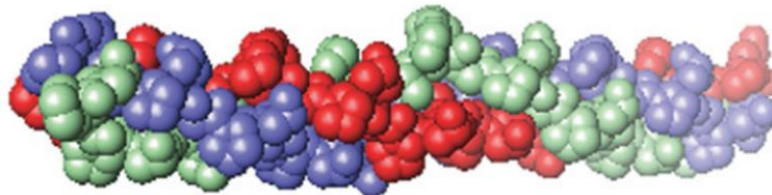
**E**ste capítulo presenta el estado del arte y los objetivos de esta Tesis Doctoral. Comienza con los conceptos fundamentales del colágeno y una revisión detallada del segmento anterior del ojo, sus componentes y características principales. Continúa con la descripción de los métodos actuales de diagnóstico de enfermedades de dicha parte del globo ocular. Se muestran también los conceptos fundamentales de la microscopía multifotónica, se analizan las ventajas e inconvenientes de su uso, así como los métodos de mejora de imagen, haciendo hincapié en las aplicaciones al estudio de la córnea y la esclera. Finalmente, se exponen las motivaciones que han dado lugar a este trabajo, finalizando con los objetivos propuestos.





## 1.1. Colágeno

El colágeno es una proteína esencial a nivel estructural y supone un tercio del total de este tipo de moléculas en los seres humanos (Shoulders & Raines, 2009). Se conocen 28 tipos de colágeno diferentes que están nombrados en números romanos, desde el tipo I al tipo XXVIII (Fratzl, 2008; Ricard-Blum, 2011; Shoulders & Raines, 2009). En particular, el colágeno tipo I aporta estabilidad, resistencia y dureza a una gran variedad de tejidos tales como tendones, ligamentos, dentina, córnea y esclera. Sus propiedades mecánicas dependen, en gran parte, de la estructura jerárquica del colágeno (Fratzl, 2008). Es el componente predominante de la matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*), que por ejemplo, en el caso de la piel seca conforma aproximadamente tres cuartas partes de su peso (Shoulders & Raines, 2009). En su forma más básica, la molécula de colágeno está formada por tres cadenas polipeptídicas levógiras enroscadas en una triple hélice dextrógira (Figura 1.1) (Fratzl, 2008; Lee et al., 2001).



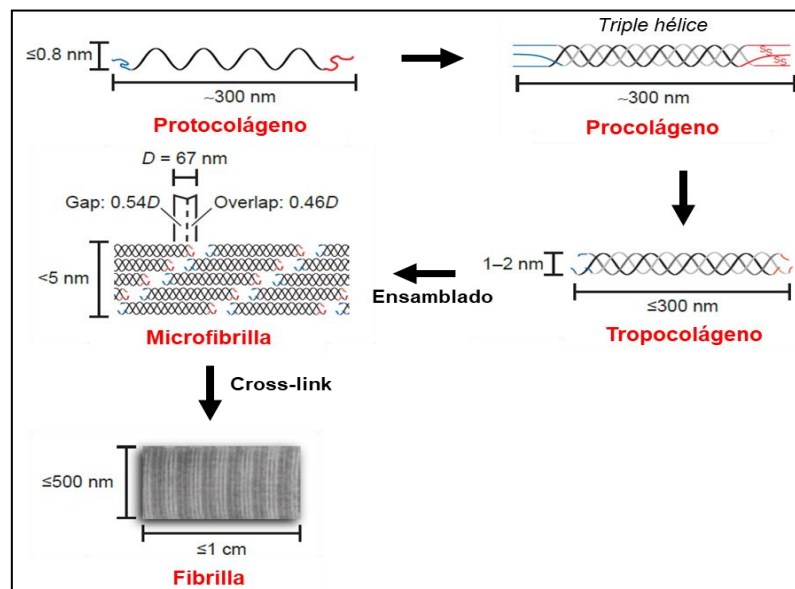
**Figura 1.1.** Representación de la triple hélice de colágeno. Figura adaptada de (Fratzl, 2008).

Los diferentes tipos de colágeno pueden clasificarse en varias categorías que se basan tanto en su función como en su estructura (Gartner, 2021; Kadler et al., 2007; Ricard-Blum & Ruggiero, 2005; Shoulders & Raines, 2009):

- Fibrilar o formador de fibrillas: a este grupo pertenecen los colágenos tipo I, II, III, V y XI, siendo el colágeno tipo I el más abundante en el cuerpo humano.
- Formador de redes: donde encontramos los colágenos tipo IV, VI, VIII y X. Se denominan así porque forman redes tridimensionales con funciones de filtración molecular (Kadler et al., 2007).
- Asociados a fibrillas o FACIT (del inglés, *fibril-associated collagens with interrupted triple helices*): engloba los colágenos tipo IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII y XXVI. Este tipo establece puentes entre los formadores de fibrillas.
- Colágenos transmembrana o MACIT (del inglés, *membrane-associated collagens with interrupted triple helice*): incluye los colágenos tipo XIII, XVII, XXIII y XXV. Son importantes para las propiedades adhesivas de las células (Kadler et al., 2007).
- Multiplexinas (del inglés, *multiple triple-helix domains and interruptions*): en este grupo se encuentran los de tipo XV y XVIII, aunque tanto su localización como función son

esencialmente diferentes. Mientras que el tipo XV parece tener la función de estabilizar las células del músculo esquelético y los microvasos, el tipo XVIII está presente en el ojo para formación de los vasos sanguíneos, así como para anclar las fibras del colágeno del humor vítreo a la membrana limitante interna de la retina (Ricard-Blum & Ruggiero, 2005).

La formación del colágeno fibrilar (tipo I) es de especial interés, no sólo por ser éste el más abundante en el cuerpo humano, sino por ser también el principal componente tanto de la córnea como de la esclera. Este proceso de formación de las fibrillas de colágeno se denomina fibrilogénesis (el término “fibrilla” que se suele utilizar en la literatura es una traducción directa del término inglés *fibril*). En la Figura 1.2 se representa de forma esquemática la formación de colágeno fibrilar.



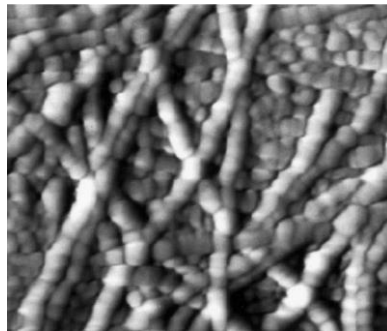
**Figura 1.2.** Representación de la formación de la fibrilla de colágeno. Figura adaptada de (Shoulders & Raines, 2009).

Las cadenas de polipéptidos que componen la molécula de colágeno (también denominadas cadenas  $\alpha$ ) se basan en uniones de tres aminoácidos mediante puentes de hidrógeno en un patrón que se va repitiendo en la forma Gly-X-Y, es decir, glicina (Gly) combinado con aminoácidos (X o/e Y). Este patrón permite a las cadenas formar la triple hélice (o espiral) dextrógira denominada procolágeno (Fratzl, 2008) y se genera en los ribosomas. En el colágeno tipo I, el protocólágeno está formado por dos cadenas  $\alpha$  iguales y una tercera diferente, mientras que en los tipos II y III está formado por tres cadenas  $\alpha$  idénticas. En el aparato de Golgi, las moléculas de procolágeno están empaquetadas en vesículas secretoras y son expulsadas a la matriz extracelular en unidades denominadas tropocolágeno, con una longitud de  $\sim 300$  nm y un diámetro de  $\sim 1.5$  nm. El tropocolágeno se agrupa de forma escalonada en pasos de 67 nm en

las microfibrillas, que se estabilizan mediante enlaces covalentes cruzados o *covalent cross-links* que forman las fibrillas y alcanzan diámetros de ~500 nm (Fratzl, 2008).

El tipo de colágeno que forma fibrillas se puede encontrar en tejidos transparentes como es el caso de la córnea, o en otros con gran resistencia como en los huesos. En estos últimos tiene lugar una optimización estructural que hace que la organización de las fibras de colágeno sea ligeramente diferente dependiendo de su localización y su función primaria (Fratzl, 2008).

Entre las funciones principales del colágeno de tipo fibrilar, se encuentra la de dar integridad estructural a tejidos y órganos, como es el caso del estroma corneal, y también a tejidos conectivos como el hueso y el cartílago. En tendones aporta rigidez ante la tracción y en el hueso propiedades biomecánicas como la capacidad de carga, la resistencia a la tracción y la tensión (Gelse et al., 2003). En la Figura 1.3 pueden observarse fibrillas de colágeno individuales en la córnea registradas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM del inglés *Atomic Force Microscopy*) (Meller et al., 1997).



**Figura 1.3.** Imagen AFM de fibrillas individuales de colágeno en la córnea (Meller et al., 1997).

Las fibras de colágeno pueden estar compuestas por uno o varios tipos de colágeno. De esta forma se puede encontrar el colágeno tipo V como estructura central de heterofibrillas con los tipos I y III alrededor (Gelse et al., 2003; Iracheta Lizarbe, 2001). Estas fibras contribuyen a la matriz orgánica del hueso y el estroma corneal, así como a la matriz intersticial de músculos, riñones, pulmones y placenta (Gelse et al., 2003).

## **1.2. Estructuras oculares ricas en colágeno tipo I**

### **1.2.1. Córnea**

La córnea es un tejido conectivo avascular altamente innervado que constituye la superficie externa transparente del ojo y la primera barrera de protección para las estructuras que se encuentran en el interior del globo ocular (Delmonte & Kim, 2011). Además de su función de protección, forma parte activa del proceso visual al refractar y transmitir la luz en su camino hacia la retina. Desde el punto de vista óptico la córnea es un menisco convexo-cóncavo (Figura

1.4), su diámetro horizontal es de 11–12 mm y de 9–11 mm en la vertical. Su espesor central es de aproximadamente 0.5 mm y va aumentando hacia la periferia, llegando a ser de unos 0.7 mm (Nishida & Saika, 2011). El radio de curvatura de la superficie anterior de la córnea mide entre 7.5 y 8 mm. Por su parte, la superficie posterior de la córnea es más curvada, con un radio de 6.8 mm. La córnea aporta 2/3 del poder refractivo del ojo, con una potencia de 40–44 D (Nishida & Saika, 2011).



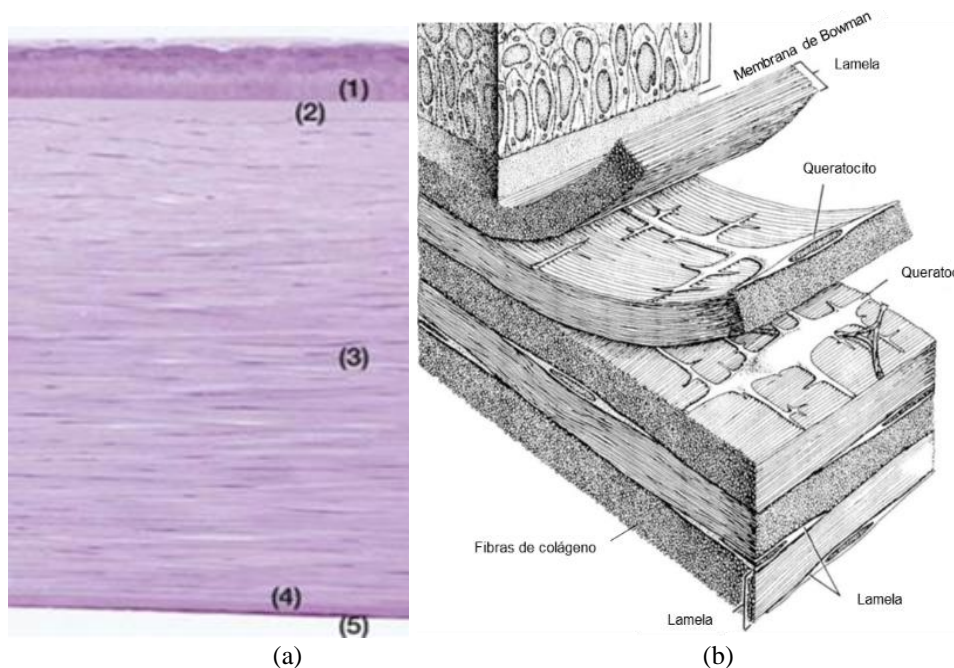
**Figura 1.4.** Imagen del segmento anterior del globo ocular utilizando una lámpara de hendidura (Nishida et al., 2021).

La cara anterior de la córnea está recubierta por una película lagrimal que se encarga de cubrir cualquier imperfección y uniformizar la superficie (Ehlers & Hjortdal, 2005). Por otro lado, la cara posterior está en contacto con el humor acuoso y es clave en la nutrición e hidratación de la estructura corneal (Nishida & Saika, 2011).

La córnea está formada tanto por diversos tipos de células (epiteliales, endoteliales, queratocitos) como por componentes acelulares, como es el caso del colágeno (Sridhar, 2018). Éste constituye aproximadamente el 70% del peso en seco de la córnea (Marshall et al., 1993; Nishida & Saika, 2011). Fisiológicamente, se distinguen tres capas y dos interfases. En la Figura 1.5a se puede observar en un corte histológico teñido con hematoxilina y eosina (H&E) donde las capas están bien diferenciadas.

- (1) *Epitelio*. Con un espesor de ~50  $\mu\text{m}$ , está distribuido en diferentes estratos con tres tipos de células. La parte más externa es un estrato con 2–3 capas de células planas escamosas. Las células aladas, se encuentran en la zona intermedia del epitelio. En la zona más interna se sitúan las células basales, empaquetadas en forma de columna y encargadas de secretar colágeno tipo IV y laminina para formar la membrana basal del epitelio (Ehlers & Hjortdal, 2005).
- (2) *Capa de Bowman*. Tiene un espesor de 12–15  $\mu\text{m}$  y no es una membrana en el sentido literal, sino una condensación de colágeno tipo I, III, V, VI y proteoglicanos. Su función principal es ayudar a mantener la forma de la córnea (Delmonte & Kim, 2011; Sridhar, 2018).

- (3) *Estroma*. Constituye aproximadamente el 90% del espesor corneal y es la capa de interés para esta Tesis Doctoral. Está compuesto principalmente por colágeno tipo I, aunque también se puede encontrar colágeno de tipo III, V y VI. Además de colágeno, en esta capa se encuentran los queratocitos. A diferencia de otros tejidos con colágeno, el estroma corneal es un tejido transparente resultado de la organización de las fibras de colágeno (a nivel tanto externo como interno) y la ECM. Las fibrillas de colágeno se agrupan en fibras o lamelas. Cada una de estas lamelas forma con un ángulo oblicuo con la lamela adyacente. Los queratocitos están situados entre ellas como se puede apreciar en la Figura 1.5b. El tamaño de las fibras del estroma es aproximadamente de 2–8  $\mu\text{m}$  y aumenta hacia el estroma posterior (Meek & Knupp, 2015). En la zona del limbo esclerocorneal, las fibras de colágeno se disponen formando una especie de anillo alrededor de la córnea (Newton & Meek, 1998). La organización de las fibras de colágeno en el estroma es de especial interés ya que influye de forma importante en la transparencia de la córnea.
- (4) *Membrana de Descemet*. Actúa como capa de soporte de las células endoteliales. Está formada por colágeno tipo IV y laminina (Sridhar, 2018), aunque también se ha reportado la existencia de colágeno tipo VIII (Kadler et al., 2007).
- (5) *Endotelio*. Es la capa más interna de la córnea y tiene un espesor en torno a 4.5  $\mu\text{m}$ . Es una monocapa de células donde no se produce mitosis. Es por ello que la densidad de células endoteliales no aumenta, aunque sí puede producirse una reducción.



**Figura 1.5.** (a) Imagen de un corte histológico de la córnea obtenido mediante microscopía lineal (figura adaptada de (Nishida et al., 2021)). (b) Organización del colágeno en el estroma corneal (figura adaptada de (Ehlers & Hjortdal, 2005)).

### ***Patologías corneales que afectan al estroma***

Algunas de las afecciones más importantes de la córnea son el queratocono o la degeneración marginal pelúcida, que en muchos de los casos llevan asociadas ectasias corneales. Una ectasia corneal es una pérdida de las propiedades biomecánicas de la córnea que suponen un adelgazamiento importante del grosor estromal (Salomão et al., 2021). Otras patologías en la córnea pueden producir opacificación como es el caso del edema. El diagnóstico precoz es de gran importancia en estas patologías, por lo que cualquier herramienta que pueda ayudar a distinguir entre ojos sanos y patológicos en estadios incipientes es gran ayuda.

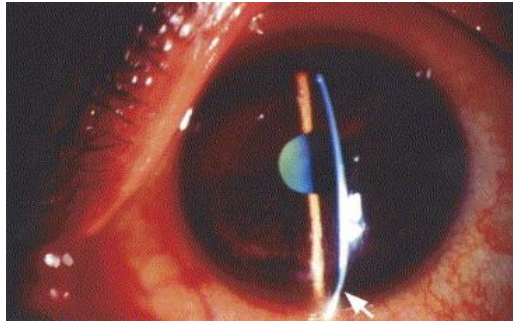
El queratocono es una alteración de la córnea en la que se produce una ectasia localizada, es decir, un progresivo adelgazamiento del espesor corneal, con una protuberancia de la zona afectada. Uno de los principales signos para diagnosticar un queratocono es la pérdida de la agudeza visual que no es posible corregir con gafas (Romero-Jiménez et al., 2010). En estadios avanzados suele aparecer el anillo de Fleischer (acumulación de depósitos en la base del cono), las estrías de Volgt (líneas que aparecen debido a la compresión de la membrana de Descemet), también pueden apreciarse más nervios corneales y la aparición de opacificaciones (Romero-Jiménez et al., 2010).

Para el tratamiento del queratocono se utilizan lentes de contacto rígidas que a la vez que retrasan su avance, corrigen la refracción y ayudan a mejorar la calidad visual (Romero-Jiménez et al., 2010). Cuando no es posible la adaptación de lentes de contacto se ha de optar por tratamientos quirúrgicos como es el caso de los anillos intraestromales, cuyo objetivo es aplanar la córnea (Shabayek & Alió, 2006). También se utiliza la técnica *cross-linking*, cuya función es generar más enlaces covalentes entre las moléculas de colágeno para aumentar la rigidez corneal (Kobashi & Rong, 2017). Para casos extremos o muy avanzados se ha de realizar un trasplante corneal o queratoplastia, que consiste en retirar la córnea y reemplazarla por tejido corneal sano de un donante (Romero-Jiménez et al., 2010).

Al igual que el queratocono, la degeneración marginal pelúcida cursa con ectasia corneal y abultamiento. Se denomina marginal porque ocurre en zonas periféricas, generalmente en la parte inferior de la córnea, a 1–2 mm del limbo esclerocorneal dejando el espesor corneal central intacto (Martínez-Abad & Piñero, 2019). En la Figura 1.6 se muestra la imagen de un ojo afectado de esta patología. Debido a la localización más excéntrica de la zona afectada, la corrección mediante lentes de contacto es difícil de realizar, aunque se han empleado diferentes diseños que incluyen lentes de mayor tamaño, bitóricas, semiesclerales o esclerales (Moshirfar et al., 2014; Rathi et al., 2016). Los tratamientos quirúrgicos, al igual que en el caso del



queratocono son los anillos intraestromales, el *cross-linking* y la queratoplastia total o parcial (Moshirfar et al., 2014).



**Figura 1.6.** Imagen de biOMICROSCOPÍA de un ojo afectado de degeneración marginal pelúcida. La flecha blanca indica la zona afectada (Sridhar, 2004).

La córnea mantiene su espesor constante debido al equilibrio entre la presión intraocular (PIO) y la fuerza contraria ejercida por la propia córnea (en inglés, *swallow pressure*). Este balance permite un proceso correcto de osmosis e hidratación normal. Un mal balance puede provocar edema corneal (Dawson et al., 2011). Es decir, la aparición de un edema corneal es fundamentalmente debido a que la córnea está más hidratada de lo normal, lo que conduce a un aumento del grosor del estroma con opacificación y disminución de la agudeza visual. A nivel microscópico se ha observado un aumento de la distancia entre las fibras de colágeno (Dawson et al., 2011).

### ***Patologías corneales que afectan al epitelio y endotelio***

La característica más importante del epitelio corneal es su capacidad de renovación, gracias a las células madre que residen en la capa basal, en la zona conocida como empalizadas de Vogt, situada en la interfase entre la córnea y la esclera (i.e. limbo esclerocorneal). Desde esta zona, proliferan y migran hacia la superficie de la córnea central que está continuamente descamándose (Kruse, 1994). Ante una disminución de las células madre limbares (i.e. insuficiencia limbar, en inglés *Limbal Stem Cells Deficiency*) la integridad de la córnea puede verse seriamente comprometida ya que se vería afectado el proceso de regeneración y renovación del epitelio, dando lugar a la inflamación crónica de la córnea, cicatrices estromales, neovascularización y opacificación (Lombardo et al., 2017).

La distrofia de Fuchs lleva asociada una pérdida de células endoteliales, que produce un edema causando, eventualmente, la opacificación de la córnea, por el exceso de agua en el estroma (Fischbarg, 2006).

### **Enfermedades con efectos secundarios sobre la córnea**

Algunas patologías pueden afectar a las propiedades mecánicas de la córnea. Por ejemplo, se ha reportado que las personas diabéticas pueden presentar córneas más gruesas a causa, posiblemente, de un aumento de enlaces covalentes cruzados entre las fibras de colágeno debido a mayores concentraciones de glucosa que, lejos de ocasionar daños, refuerza las propiedades mecánicas de la córnea (Ma et al., 2018). Por otro lado, esta misma patología está asociada a la deficiencia en la inervación corneal denominada queratopatía diabética que da lugar a la reducción de la sensibilidad y la cicatrización defectuosa del epitelio corneal (Bikbova et al., 2018).

Otra patología que puede afectar a la inervación corneal es el glaucoma. Se ha reportado que en el estroma de pacientes con glaucoma se ha visto reducida la densidad de nervios sub-basales y se observan con mayor tortuosidad (Yüksel et al., 2016).

El síndrome de Ehlers-Danlos engloba un grupo de desórdenes del tejido conectivo, en su mayoría debidos a mutaciones en alguno de los genes que codifica el colágeno fibrilar o las enzimas que participan en la síntesis de estos colágenos (De Paepe & Malfait, 2012). Dentro de estos desórdenes encontramos el síndrome de la córnea frágil (en inglés, *Brittle Cornea Syndrome*), que cursa con fragilidad tanto corneal como ocular en general, con posible reducción del espesor corneal y, además, aparición de queratocono (De Paepe & Malfait, 2012).

La osteogénesis imperfecta es otra enfermedad asociada con desórdenes en el colágeno y reducción del espesor corneal. Esto se debe a mutaciones en el colágeno I, que pueden producir disminución del procolágeno tipo I o cambios estructurales de la proteína que afecta a la calidad del colágeno (Magalhaes et al., 2018).

#### **1.2.2. Esclera**

El nombre de esclera o esclerótica proviene del griego *skleros*, que significa duro. Es un tejido blanco, avascular, rígido y fibroso que recubre casi en su totalidad el globo ocular (a excepción de la zona anterior donde se encuentra la córnea y la salida del nervio óptico en el polo posterior) (Watson & Young, 2004). Se encarga de mantener la forma del ojo, protegiendo los tejidos y estructuras internas, evitando que se vean afectadas por las fluctuaciones de la PIO y los movimientos oculares. A diferencia de la córnea, la esclera es un tejido opaco.

El espesor en la esclera humana varía de forma significativa pasando de ser de 1.00–1.35 mm en el polo posterior, a tener entre 0.4 y 0.6 mm en su punto más estrecho sobre el ecuador del globo ocular. En la zona de la inserción de los músculos extraoculares vuelve a



incrementarse el espesor, llegando a ser de hasta 0.8 mm en la zona del limbo esclerocorneal (Dawson et al., 2011).

La esclera está compuesta por fibras de colágeno, elastina, proteoglicanos y glicoproteínas. El colágeno que podemos encontrar en la esclera es de tipo I, III, y, en menor medida, V y VI. El colágeno constituye en torno al 77% del peso en seco de la esclera. El espesor total de la esclera se divide en tres capas: epiesclera, estroma y lámina fusca.

- (1) *Epiesclera*. Es la capa más externa, delgada y muy vascularizada. Tiene un espesor de 15–20  $\mu\text{m}$  (Dawson et al., 2011).
- (2) *Estroma*. Ocupa el 90% del espesor escleral y es una capa de color blanco avascular. El 80% de las fibras de colágeno que encontramos en el estroma escleral es colágeno tipo I (Dawson et al., 2011). En este caso, la organización de las lamelas esclerales es más irregular que en la córnea, así como su diámetro (25–230 nm), con compactación y entrecruzamiento variable, así como con fibras más largas e irregulares (Boote et al., 2020; Dawson et al., 2011). La organización y estructura varía entre la zona anterior y posterior. Por ejemplo, en la zona perilimbar, se organizan de forma circular alrededor de la córnea. Además, algunos haces de colágeno continúan hasta la zona periférica de la córnea. En la zona posterior, cerca de la cabeza del nervio óptico, son más uniformes en diámetro y están más ordenadas (Boote et al., 2020).
- (3) *Lámina fusca*. Es la capa interna avascular de la esclera y su denominación radica en su coloración oscura. Tiene unos 5  $\mu\text{m}$  de espesor y está compuesta por elastina y melanocitos (Dawson et al., 2011).

### ***Patologías y anomalías oculares con efectos sobre la esclera***

El estudio de las propiedades de la esclera es de especial interés en el estudio de algunas patologías, como el glaucoma. Una menor resistencia mecánica a los aumentos de la PIO puede provocar cambios estructurales en la esclera que se transmiten a la lámina cribosa y la cabeza del nervio óptico. Éstos se han asociado con la pérdida de células ganglionares (Norman et al., 2010). También se ha relacionado la miopía con la alteraciones en la estructura y propiedades de la esclera (McBrien & Gentle, 2003; Norman et al., 2010). Se ha explorado el uso de técnicas como el *cross-linking* en la esclera para frenar el aumento de la miopía, reforzando de esta forma sus propiedades mecánicas para frenar un posible incremento de la longitud axial del ojo (Wollensak & Spoerl, 2004). En enfermedades como la osteogénesis imperfecta y el síndrome de la córnea frágil se ha observado que la esclera tiene una tonalidad azulada con una reducción significativa de su espesor y un aumento de su fragilidad tisular (De Paepe & Malfait, 2012).

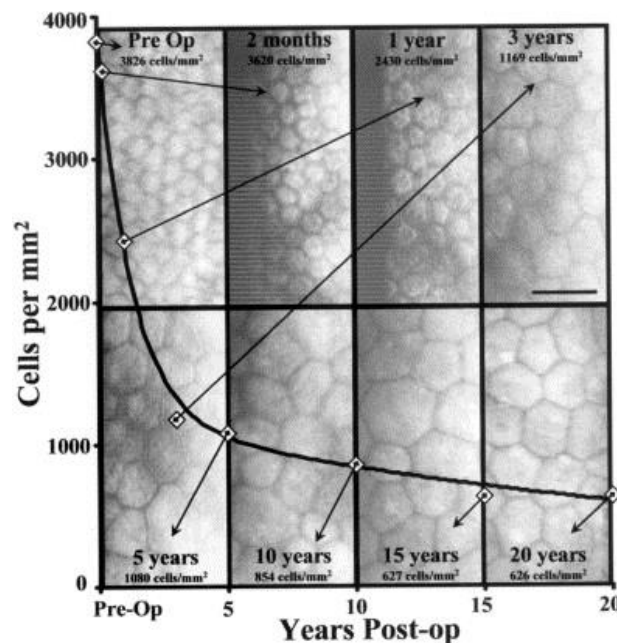
### 1.3. Instrumentos clínicos para visualizar la córnea y la esclera

#### *Lámpara de hendidura*

La lámpara de hendidura, también denominada biomicroscopio, es un instrumento que permite observar el segmento anterior del ojo mediante la combinación de distintos tipos de iluminación y aumentos (Martin, 2018). Es útil para estudiar la presencia de cataratas, úlceras corneales o diferentes tipos de disfunciones en los anexos oculares. Sin embargo, con ella no es posible distinguir las diferentes capas de la córnea ni estudiar en gran detalle la estructura corneal (véase la Figura 1.4).

#### *Microscopía especular*

La microscopía especular sirve para observar el mosaico de células endoteliales y se basa en la diferencia del índice de refracción que existe entre el endotelio corneal y el humor acuoso (Martin, 2018). Este instrumento de diagnóstico permite estudiar los cambios producidos en dicha capa debido a patologías o enfermedades sistémicas, traumatismos o cirugías (cataratas, cirugía refractiva,...) (Bourne & McLaren, 2004). Estos factores disminuyen el número de células en la capa y, al no regenerarse, éstas se redistribuyen aumentando sus dimensiones, dejando de ser una capa organizada y estructurada. Como ejemplo, en la Figura 1.7 se pueden observar imágenes del seguimiento de un endotelio corneal después de una queratoplastia. Esta disminución en la densidad de células puede dar lugar a un edema corneal debido a una falta de drenaje del agua contenida en el estroma.

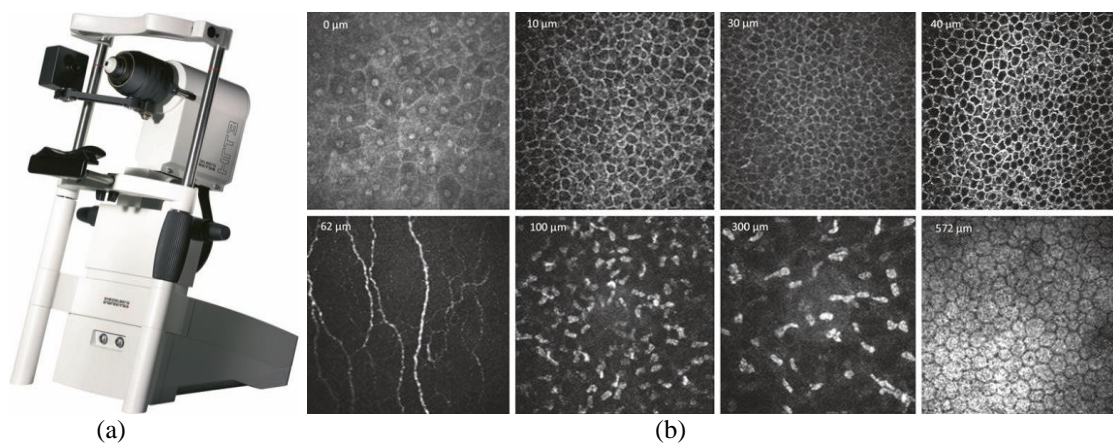


**Figura 1.7.** Disminución de la densidad de células del endotelio corneal tras una queratoplastia, desde el preoperatorio hasta 20 años después de la operación. Figura adaptada de (Bourne & McLaren, 2004).

### Microscopía confocal

La microscopía confocal de la córnea, proporciona imágenes con resolución a nivel celular y permite realizar un seccionado óptico capa a capa (Figura 1.8).

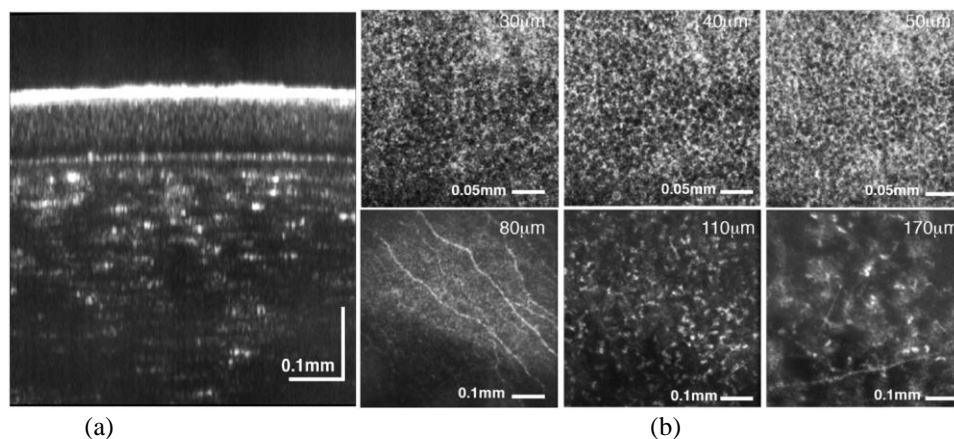
A diferencia de la lámpara de hendidura, la microscopía confocal es capaz de mostrar las células y nervios corneales (Figura 1.8b) en condiciones de registro en vivo, tanto en ojos sanos como en aquellos con diferentes patologías (Chiou et al., 2006; Guthoff et al., 2009; Jalbert et al., 2003; Oliveira-soto & Efron, 2001). Aunque esta técnica se considera de gran importancia en el entorno clínico para el seguimiento de algunas afecciones corneales, con ella no es posible visualizar las fibras de colágeno del estroma corneal (Figura 1.8b).



**Figura 1.8.** (a) Microscopio confocal clínico comercial. (b) Imágenes de la estructura corneal a diferentes profundidades donde se pueden apreciar tanto las distintas células como los nervios corneales, pero no las fibras de colágeno del estroma. Figura adaptada de (Stachs et al., 2019).

### Tomografía de Coherencia Óptica

La Tomografía de Coherencia Óptica (OCT, del inglés, *Optical Coherent Tomography*), es uno de los instrumentos clínicos más utilizados para el estudio del ojo en vivo (Aumann et al., 2019; Schmitt, 1999). Se pueden obtener imágenes OCT no sólo de las diferentes capas de la retina, sino también del segmento anterior, la córnea en particular (Figura 1.9).



**Figura 1.9.** (a) Imagen OCT de la córnea. (b) Imágenes *en-face* de las células del epitelio, nervios corneales y algunas estructuras del estroma. Figura adaptada de (Auksorius et al., 2020).

Las imágenes OCT de la córnea aportan información sobre su espesor, lo que es importante en patologías como el queratocono, donde el adelgazamiento de la córnea se puede evaluar de forma objetiva. Otro de los factores clave en la popularidad de la OCT es que permite estudiar el ángulo iridocorneal, elemento de gran importancia en patologías como el glaucoma. Aunque es posible alcanzar resoluciones que permiten estudiar las células del epitelio y los nervios corneales (Figura 1.9b), no es así con el colágeno estromal y su organización.

#### 1.4. Microscopía multifotónica

Los instrumentos clínicos actuales descritos en el apartado anterior basan su registro de imagen en técnicas de microscopía lineal en las que un único fotón visible es emitido por cada fotón (también visible) absorbido. Por el contrario, en la microscopía no lineal o multifotónica el tejido (fluoróforo, molécula o estructura) absorbe dos fotones o más de una longitud de onda ( $\lambda$ ) en el rango del infrarrojo (IR) cercano, para emitir un único fotón con menor  $\lambda$  que el incidente, y con menor o igual energía que la suma de la de los fotones incidentes.

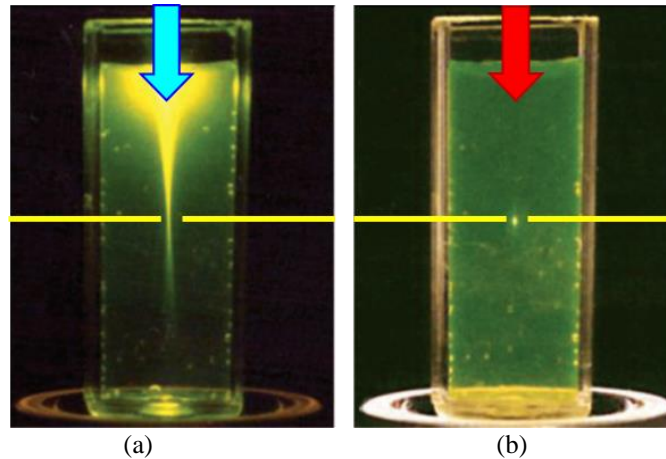
Para que se produzca esta absorción cuasi simultánea de dos o más fotones es necesario el uso de láseres pulsados (de femtosegundo) que proporcionan un flujo elevado de fotones. Los tipos de señal multifotónica usados en microscopía en el campo de la Biomedicina son la de fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF, del inglés *Two-Photon Excitation Fluorescence*) y la generación tanto de segundo (SHG, del inglés *Second Harmonic Generation*) como de tercer armónico (THG, del inglés *Third Harmonic Generation*). Estas señales no lineales permiten visualizar el colágeno y las células de diferentes estructuras oculares, en particular la córnea, la esclera y la retina.

La microscopía no lineal y su aplicación en Biomedicina presentan importantes ventajas respecto a la microscopía lineal (Helmchen & Denk, 2005):

- (1) El uso de fuentes de luz IR permite alcanzar mayores profundidades dentro del tejido y reducir los fenómenos de *scattering*.
- (2) La señal no lineal producida es de naturaleza endógena por lo que no es necesario el uso de marcadores o procesos de tñido para la correcta visualización de los tejidos.
- (3) Estos procesos tienen confocalidad inherente (i.e. autoconfocalidad) y no hay necesidad de usar diafragmas (*pinholes*) como en el caso de la microscopía confocal de fluorescencia. Esto se debe a que la señal no lineal emitida solamente se localiza en el volumen focal (Figura 1.10) que es la zona con la mayor densidad de fotones (y por tanto con la mayor probabilidad de que ocurra la absorción de pares/tripletes de fotones). No existe por tanto

contribución de la señal procedente de otras capas del tejido que reduciría el contraste de las imágenes adquiridas.

- (4) Como consecuencia de las características anteriores, la fototoxicidad y el fotodaño de los tejidos se ven notablemente reducidos.

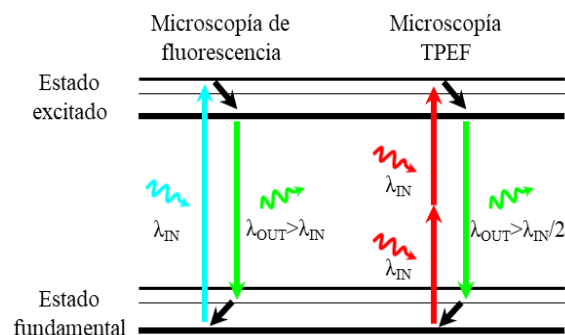


**Figura 1.10.** Bases de la microscopía lineal (a) y no lineal (b) por localización de la excitación a uno o dos fotones respectivamente. Adaptado de (Zipfel et al., 2003).

#### 1.4.1. Fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF)

Consiste en la absorción cuasi simultánea de dos fotones IR por parte de las moléculas del tejido bajo estudio, para posteriormente emitir un fotón en el rango visible con una  $\lambda_{out}$  mayor que la mitad de la  $\lambda_{in}$  incidente (es decir,  $\lambda_{out} > \lambda_{in}/2$ ). Este fenómeno conlleva una cierta pérdida de energía (proceso no radiativo en los niveles excitados de la molécula).

Este proceso TPEF difiere claramente de lo que ocurre en microscopía de fluorescencia lineal, donde el tejido absorbe un fotón visible con una  $\lambda_{in}$  determinada y emite otro fotón con una  $\lambda_{out}$  que verifica  $\lambda_{out} > \lambda_{in}$ . En la Figura 1.11 se puede observar un diagrama de Jablonski con los procesos de fluorescencia lineal y por excitación de dos fotones.



**Figura 1.11.** Diagrama de Jablonski que representa los procesos de fluorescencia lineal (izquierda) y TPEF (derecha).

El fenómeno de absorción multifotónica fue predicho en 1931 por Maria Göppert-Mayer (Göppert-Mayer, 1931), pero no fue hasta la invención del láser de rubí, tres décadas después,

cuando se pudo demostrar experimentalmente (Kaiser & Garrett, 1961). En 1990, Denk y colaboradores reportaron el primer microscopio multifotónico (Denk et al., 1990), donde usaban un láser pulsado de 100 fs de duración de pulso ( $\tau_p$ ), una frecuencia de repetición ( $f_p$ ) de unos 80 MHz y una  $\lambda$  de 630 nm. Desde entonces, gran cantidad de investigadores se han dedicado al estudio de la técnica y sus aplicaciones en una amplia variedad de campos.

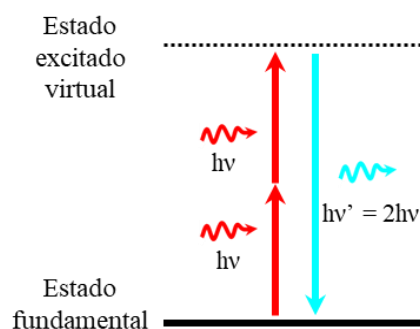
La señal TPEF, aunque producida de forma endógena por las moléculas existentes en el tejido, también puede ser exógena cuando se usan marcadores o fluoróforos externos. Los marcadores endógenos que emiten señal TPEF son la elastina, la queratina y la melanina, así como coenzimas presentes en las células vivas tales como la (NAD(P)H (nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato) y la FAD (flavín adenín dinucleótido). Tiene gran importancia en aplicaciones biomédicas, especialmente para diagnóstico de cáncer sin tinción (Wu et al., 2013).

Uno de los usos que han cogido fuerza en los últimos años es la modalidad conocida como *lifetime imaging* (Kolenc & Quinn, 2019; Batista et al., 2018a). A partir de la señal emitida por coenzimas NAD(P)H y FAD se puede estudiar el ciclo metabólico de las células, siendo de gran utilidad para estudios diagnósticos y valoración de tumores y carcinomas (Balu et al., 2015; Skala et al., 2005).

#### 1.4.2. Generación de segundo armónico (SHG)

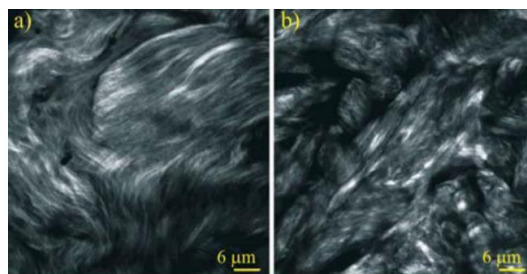
En el caso de la señal SHG, no existe pérdida de energía en el proceso. La estructura absorbe dos fotones de  $\lambda_{in}$  y emite un fotón con la mitad de la longitud de onda incidente ( $\lambda_{out} = \lambda_{in}/2$ ) es decir, con exactamente la misma energía ( $E_{out} = h\nu'$ ) que la suma de la de los dos fotones absorbidos ( $E_{in} = 2 \cdot h\nu = E_{out}$ ) (Figura 1.12). Este fenómeno fue reportado experimentalmente en 1961 por Franken y colaboradores (Franken et al., 1961). Usaron un láser de rubí con una  $\lambda_{in}$  de 694 nm que, al focalizarse sobre un cristal de cuarzo, éste emitía en una  $\lambda_{out}$  de 347 nm. Sin embargo, no fue hasta un año después cuando el fenómeno se explicó formalmente (Bloembergen & Pershan, 1962).

La señal SHG depende de la organización estructural de la muestra bajo estudio, así como de la simetría de las moléculas que la componen (o alternativamente, de la susceptibilidad de segundo orden  $\chi^{(2)}$ ) (Guo et al., 1997; Lin & Hao, 2020; Stoller et al., 2002). Se produce en materiales que carecen de centro de inversión, es decir no centro-simétricos. Es el caso de estructuras quirales como las que aparecen en aquellas formadas por colágenos I y II, y miosina (Chen et al., 2012a; Roth & Freund, 1979; Stoller et al., 2002). Al igual que la señal TPEF, ésta es también endógena y no se precisa de marcadores externos para su detección.



**Figura 1.12.** Diagrama de Jablonski representando el proceso SHG.

El uso de luz en el rango del IR cercano permite registrar buenas imágenes SHG en diferentes localizaciones dentro del tejido. Por ejemplo, en el tejido muscular del ratón, se han registrado imágenes hasta una profundidad de 550  $\mu\text{m}$  (Campagnola et al., 2002). El registro de imágenes de planos profundos es tanto más limitado cuanto menos transparente es la muestra. Así, en el caso de la córnea (Yeh et al., 2002) sería más factible llegar a planos situados a cientos de micras que en el caso de tejidos opacos como la piel (Paoli et al., 2008). Es de interés apuntar que la aplicación de la microscopía SHG más extendida en la actualidad es la que sirve para el diagnóstico de patologías del colágeno y la diferenciación entre tejidos sanos y cancerígenos (Adur et al., 2012; Burke et al., 2012; Tilbury & Campagnola, 2015; Bueno et al., 2020; Hristu et al., 2018). La Figura 1.13 muestra imágenes SHG del colágeno en la piel sana y patológica (queloides).



**Figura 1.13.** Imágenes SHG del colágeno en la piel sana (a) y patológica (b). Adaptada de (Cicchi et al., 2009).

El desarrollo de herramientas que permitan evaluar de forma objetiva las imágenes SHG ha sido, de igual forma, un factor clave en este campo. Una fundamental al trabajar con estructuras de colágeno fibrilar es la cuantificación del orden estructural del tejido. Se han desarrollado varios métodos, como los basados en la transformada de Fourier (Lee et al., 2019), la transformada de Hough (Bueno et al., 2020) y el tensor de estructura (Ávila & Bueno, 2015). Otros métodos estudian la textura del tejido mediante la matriz de dependencia de los niveles de gris para discernir entre tejidos sanos y patológicos (Cicchi et al., 2009; Hristu et al., 2018).

Se ha demostrado que la relación entre las señales de SHG y TPEF permite estudiar el envejecimiento de ciertos tejidos como la piel (Koehler et al., 2006; Lin et al., 2005). Esta relación también se ha usado en el diagnóstico de patologías más desconocidas como el lipedema, enfermedad crónica del sistema linfático que produce una fibrosis tisular (inflamación del tejido) y por tanto una desorganización del colágeno (Kistenev et al., 2019).

### **1.5. Limitaciones y métodos de mejora de la señal multifotónica**

En el apartado anterior se han descrito las ventajas de la microscopía multifotónica. Sin embargo, la técnica presenta también ciertas limitaciones. Uno de los principales inconvenientes estriba en el alto coste de las fuentes de iluminación de femtosegundo, aunque afortunadamente van abaratándose poco a poco (Bueno et al., 2019a). Además, otros factores tienen su origen en las propiedades temporales y espaciales tanto del láser pulsado como de la muestra bajo estudio. Mientras que las primeras se asocian con la duración (o longitud) del pulso y la estabilidad de las muestras (*ex vivo*/estáticas vs. *in vivo*/dinámicas), las últimas están relacionadas con las aberraciones. También la polarización del haz incidente puede ser determinante. De forma resumida, la eficiencia en la generación de señales MP viene básicamente determinada por:

1. La duración del pulso, que va aumentando desde que se emite por la fuente hasta llegar al plano de la muestra (donde se producirá la señal no lineal, bien TPEF, bien SHG). Este fenómeno se denomina dispersión cromática y hace que, en su propagación, las distintas frecuencias de la luz viajen a velocidades diferentes (Oheim et al., 2006). La generación de señales multifotónicas en las muestras se reduce cuando la duración de los pulsos aumenta (Skorsetz et al., 2018).
2. La presencia de aberraciones ópticas en el haz láser, en la óptica del sistema y en la propia muestra (Gualda et al., 2010; Skorsetz et al., 2016) distorsionan el foco alejándolo del límite de difracción, lo que limita notablemente la señal generada.
3. En el caso de la microscopía SHG, existe una dependencia entre el estado de polarización del haz incidente y la organización de las fibras dentro de las muestras (Stanciu et al., 2017; Ávila et al., 2016). Este hecho hace que la eficiencia de la señal SHG generada dependa de dicha polarización.

En general, la reducción de la señal multifotónica que se produce se podría compensar simplemente aumentando la potencia media de la fuente láser o el tiempo de registro de la imagen. El problema radica en la posibilidad de dañar las muestras dejándolas inservibles para



su estudio. Por lo tanto, ésta no es una opción y para solventar estas limitaciones se han empleado otras aproximaciones. Éstas incluyen el uso de pulsos ultracortos (Pang et al., 2009) o comprimidos (Skorsetz et al., 2018) para compensar la dispersión cromática; el uso de diferentes estados de polarización incidentes (Gusachenko et al., 2010; Stanciu et al., 2017) para mejorar la visualización de las estructuras; la óptica adaptativa (Booth, 2014) y los métodos de deconvolución (Sivaguru et al., 2017a) para compensar el efecto de las aberraciones.

### 1.5.1. Potencia de pico y duración del pulso láser

La señal generada por absorción de pares de fotones depende de la potencia de pico del láser según la ecuación 1.1 (Hasegawa, 1998):

$$I_{TP} = k \cdot P_{pico}^2 \cdot f_r \cdot \tau_p, \quad (1.1)$$

donde  $I_{TP}$  es la intensidad de la señal no lineal generada,  $k$  es una constante (que depende básicamente de la apertura numérica (AN) y la  $\lambda$ ),  $P_{pico}$  es la potencia pico de la fuente,  $f_r$  es la frecuencia de repetición y  $\tau_p$  es la duración del pulso del láser. Conocida la relación entre la potencia media ( $P_{avg}$ ) de la fuente láser y  $P_{pico}$ :

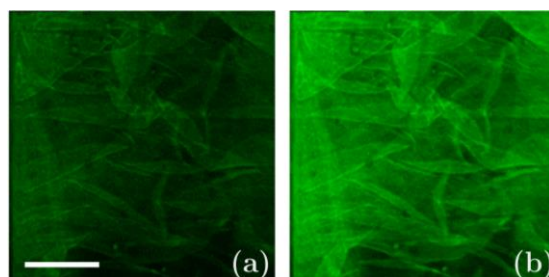
$$P_{pico} = \frac{P_{avg}}{f_r \cdot \tau_p}, \quad (1.2)$$

al sustituir, (1.2) en (1.1) se tendrá, por tanto:

$$I_{TP} \approx \frac{P_{avg}^2}{f_r \cdot \tau_p}. \quad (1.3)$$

De esta forma, un aumento de la señal generada requeriría del aumento de la  $P_{avg}$  manteniendo constante  $f_r$  y  $\tau_p$ . El inconveniente de esta opción es la posibilidad de producir daño en la muestra. Otra alternativa sería aumentar  $P_{pico}$  reduciendo  $\tau_p$  (o  $f_r$ ) mientras se mantiene constante  $P_{avg}$  (Tang et al., 2006).

Por otra parte, un pulso ultracorto se ve afectado por la dispersión cromática al propagarse en aire y a través de la óptica del sistema. Cuanto más corto es el pulso, mayor es el ancho de banda espectral y por tanto mayor sería la dispersión cromática que sufre (Xi et al., 2008). Así, las diferentes longitudes de onda viajan a diferente velocidad lo que provoca un incremento de la duración del pulso. Puesto que la calidad de las imágenes multifotónicas se reduce al utilizar pulsos de mayor duración, es preciso pre-comprimarlos para compensar la dispersión cromática y optimizar la imagen obtenida (Skorsetz et al., 2018; Tang et al., 2006). Un ejemplo del efecto de la compresión del pulso se muestra en la Figura 1.14.



**Figura 1.14.** Efecto de la compresión del pulso en imágenes TPEF. Escala: 50  $\mu\text{m}$ . Adaptado de (Skorsetz et al., 2018).

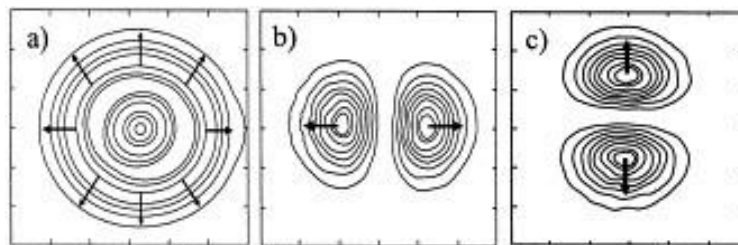
Como métodos de pre-compresión del pulso se han usado espejos (Wu et al., 2011), sistema de prismas (Skorsetz et al., 2018) y rejillas de difracción (Pawłowska et al., 2014), entre otros. Se ha visto cómo la pre-compresión del pulso ayuda tanto en láseres con pulsos de cientos de femtosegundos como en los de menos de 10 fs. Los láseres sub-10fs han sido empleados en la literatura y parecen mejorar las imágenes (Pang et al., 2009; Pawłowska et al., 2014; Wu et al., 2011; Xi et al., 2008). Tang et al. analizaron el efecto de la duración del pulso utilizando un láser de 400 fs con compresiones a 120 fs y 20 fs. La señal para 20 fs fue mucho más alta y la penetración cerca del 160% mayor (Tang et al., 2006). De igual forma, Xi y colaboradores realizaron una comparación similar entre 100 y 20 fs y encontraron un aumento la efectividad de hasta seis veces (Xi et al., 2008). En todo caso, los láseres de más de 100 fs se emplean en microscopía no lineal sin necesidad de usar ningún método de pre-compresión. Por el contrario, no se han realizado estudios de cómo sería el comportamiento de un láser con pulsos ultracortos por debajo de los 10 fs en este tipo de microscopía. Este análisis se recoge en el Capítulo 7 de este trabajo.

### 1.5.2. Polarización

La sensibilidad de la señal SHG al estado de polarización de la luz puede usarse para obtener más información de la organización de tejidos ricos en colágeno (Ávila et al., 2015; Gusachenko et al., 2010; Stoller et al., 2003) y para mejora de la visualización de ciertas estructuras (Stanciu et al., 2017). El uso de microscopía SHG sensible a la polarización es también de gran utilidad en el estudio de patologías y procesos fisiológicos (Gusachenko et al., 2012; Stoller et al., 2003).

Para el análisis de la respuesta SHG con la polarización se han empleado estados de polarización espacialmente homogéneos: lineales (Roth & Freund, 1979), elípticos y circulares (Ávila et al., 2015; Lee et al., 2013). Sin embargo, el uso de estados de polarización espacialmente variables se ha hecho popular en los últimos años. Los haces polarizados radialmente son altamente simétricos, la distribución de la intensidad tiene forma de “rosquilla” (Oron et al., 2000; Quabis et al., 2000) como se puede observar en la Figura 1.15. De esta

manera se consigue un punto focal más estrecho debido a la aparición de una fuerte componente longitudinal del campo eléctrico a lo largo del eje óptico. Algunos estudios han informado de la geometría de la polarización radial y han alcanzado un *spot* muy estrecho con este haz polarizado simétrico (Dorn et al., 2003; Kim et al., 2009). En la microscopía de escaneo láser confocal se ha reportado un aumento de la resolución lateral con luz incidente polarizada radialmente (Kim et al., 2009; Kozawa et al., 2011; Kozawa & Sato, 2015; Meng et al., 2018). Se ha demostrado la mejora de la resolución lateral debido a una técnica de sustracción de imágenes mediante el uso de un haz láser polarizado radial y azimutalmente (Segawa et al., 2014a, 2014b; Yoshida et al., 2019). Estudios teóricos también han demostrado un aumento de la resolución espacial en las señales SHG y THG (Biss & Brown, 2003; Yang & Zhan, 2008; Yew & Sheppard, 2006).



**Figura 1.15.** Distribución de la intensidad en un haz polarizado radialmente (Quabis et al., 2000).

Bautista y colaboradores compararon la eficiencia de luz polarizada lineal, azimutal y radialmente para realizar el registro de imágenes 3D de nanoestructuras mediante microscopía SHG. Consiguieron resultados muy prometedores con la luz polarizada radialmente (Bautista et al., 2017). Por otro lado, en microscopía confocal, se ha utilizado la sustracción de haces polarizados radial y azimutalmente para conseguir una mayor resolución (Segawa et al., 2014b, 2014a; Yoshida et al., 2019).

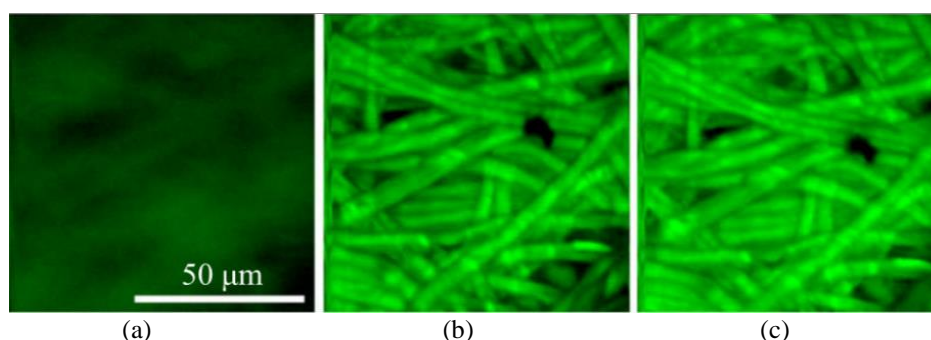
### 1.5.3. Óptica adaptativa

Se conoce como óptica adaptativa a todas aquellas técnicas que se encargan de medir y compensar el frente de onda en instrumentos y sistemas ópticos. El primer paso en adaptativa es la medida del frente de onda, siendo necesario un sensor. Una vez medido, se corrige utilizando espejos deformables o moduladores espaciales. Su desarrollo inicial estuvo orientado a corregir las imágenes tomadas por los telescopios que habían sido degradadas por las turbulencias atmosféricas (Hickson, 2014). Posteriormente se ha aplicado con éxito en microscopía (Booth, 2014) y en visión (Fernández et al., 2001).

En microscopía multifotónica, se han empleado extensamente las técnicas de óptica adaptativa para compensar las aberraciones principalmente introducidas por la propia muestra,

ya que, a pesar de la capacidad de seccionado óptico, las imágenes multifotónicas de tejidos gruesos están fuertemente degradadas y tanto más cuanto más profundo es el plano de interés (Bueno et al., 2010).

Una de las principales desventajas del uso de estas técnicas en microscopía es que medir y corregir las aberraciones *in situ* requiere de tiempos prolongados, lo que hace difícil llevarlo a cabo a tiempo real. Para solventar este problema se ha desarrollado una técnica que omite la parte de medida que se conoce como óptica adaptativa sin-sensor (del término inglés *sensorless*) que emplea algoritmos interactivos para encontrar la imagen óptima (Skorsetz et al., 2016). Con este procedimiento se ha mostrado que en capas más profundas del tejido la contribución dominante es la de la aberración esférica (Bueno et al., 2013; Lo et al., 2005; Sherman et al., 2002). En la Figura 1.16 muestra un ejemplo de imagen corregida únicamente de aberración esférica y compararla con otra donde se ha corregido coma, trefoil y astigmatismo, además de la esférica.



**Figura 1.16.** Muestra de una malla de seda a una profundidad de 80  $\mu\text{m}$ : sin corregir (a), corregida solo de aberración esférica (b) y corregida de aberración esférica, trefoil, coma y astigmatismo (c). Adaptada de (Skorsetz et al., 2016).

#### 1.5.4. Deconvolución

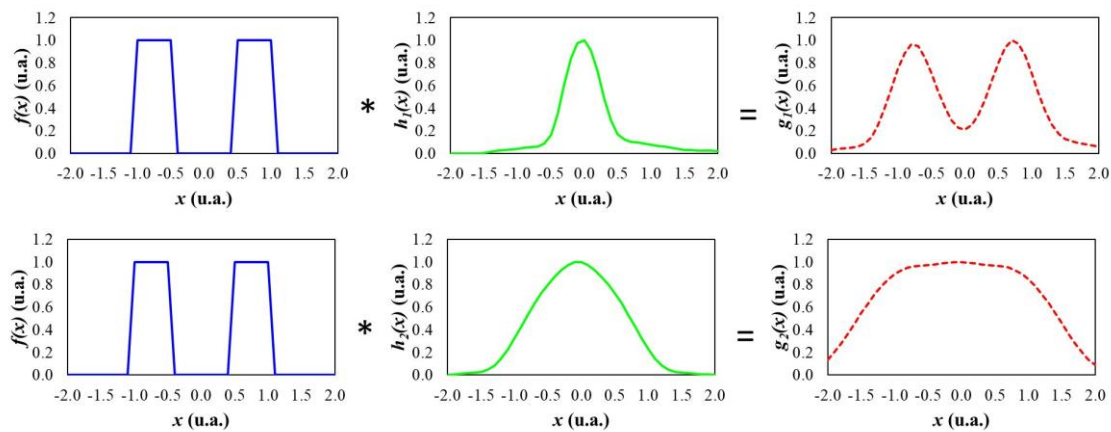
La deconvolución es un proceso de restauración de un objeto a partir de la imagen y la PSF (del inglés *Point Spread Function*) del sistema a través del cual se ha registrado (Gonzalez & Woods, 2018). Esta técnica se ha empleado en campos muy diversos que van desde la Sismología (Mendel, 1983) hasta la Astronomía (Starck et al., 2002) o la microscopía (Sibarita, 2005).

La PSF de un sistema óptico es la imagen proporcionada por dicho sistema de un punto objeto. Si el sistema es ópticamente perfecto, la PSF será el patrón de difracción correspondiente. Sin embargo, si no lo es, dicha PSF se verá afectada además por las aberraciones del propio sistema que forma imagen. Estos factores hacen que la PSF se deteriore y que la imagen final de un objeto extenso se “emborrone” y pierda calidad.

Desde el punto de vista matemático, la imagen de un objeto dada por un sistema óptico es la convolución del objeto con la PSF de dicho sistema.

$$\text{imagen} = \text{objeto} \otimes \text{PSF} \quad (1.4)$$

La Figura 1.17 muestra unos ejemplos gráficos de la convolución en una dimensión. En el primer caso suponemos que el objeto es la función  $f(x)$ . Al registrar una imagen con un sistema óptico, caracterizado por la función  $h_1(x)$ , la imagen resultante,  $g_1(x)$ , es la convolución entre  $f(x)$  y  $h_1(x)$ . La imagen se parece a la función original, en la que siguen distinguiéndose dos máximos, pero con los bordes suavizados. En el segundo caso, la imagen del mismo objeto  $f(x)$  se forma a través del sistema óptico caracterizado por la función  $h_2(x)$ . En esta imagen,  $g_2(x)$  ya no se observan los máximos de la función original. Esto indica que la resolución de este segundo sistema óptico es menor que la del primero.



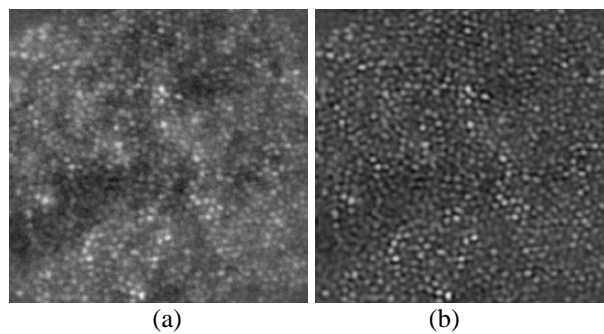
**Figura 1.17.** Representación gráfica de dos convoluciones (véase la información en el texto):  $f(x) * h_1(x) = g_1(x)$  y  $f(x) * h_2(x) = g_2(x)$ .

Si la PSF y las imágenes son conocidas se puede calcular el objeto en cuestión mediante el proceso inverso conocido como deconvolución. Por tanto, si se tiene caracterizada la PSF de un sistema óptico, se podría restaurar la imagen de forma “relativamente sencilla”. Lamentablemente, esto no es siempre posible, ya que en muchas condiciones experimentales se desconoce la PSF.

El procedimiento de deconvolución donde las incógnitas son tanto el objeto como la PSF, se conoce como “deconvolución ciega”. Este método de post-procesado está extendido en Astronomía (Kundur & Hatzinakos, 1996) y en Microscopía (McNally et al., 1999). Uno de los principales inconvenientes de la estimación conjunta del objeto y la PSF en la deconvolución ciega es que habitualmente existen pocos datos para las incógnitas presentadas. Esto requiere preestablecer algunas suposiciones experimentales iniciales, que puede llevar a errores o a que

muchas estimaciones del objeto sean compatibles con los datos, lo que hace que sea necesaria la supervisión del proceso en etapas intermedias.

Para reducir estas limitaciones algunos autores han desarrollado algoritmos de “deconvolución ciega marginal” (o miope) (Blanco & Mugnier, 2011). En este caso, en un primer paso se estima, solamente la PSF. Para ello se supone que dicha PSF es la combinación lineal de PSFs en las que sólo varía el foco y donde los coeficientes de la combinación son también incógnitas. La PSF resultante será la más probable para todos los posibles objetos. El objeto, finalmente, se restaura mediante un filtrado de Wiener de la imagen con la PSF estimada. En la Figura 1.18 se muestra un ejemplo de este proceso de deconvolución para una imagen de la retina. El aumento en contraste y calidad de imagen entre la imagen original (Figura 1.18a) y la imagen deconvolucionada (Figura 1.18b) es evidente. Este proceso no necesita supervisión, por lo que el operador no debe invertir más tiempo que el empleado en introducir y fijar los parámetros iniciales del sistema.



**Figura 1.18.** Imágenes original (a) y tras aplicar un algoritmo de deconvolución ciega marginal (b) del mosaico de fotorreceptores humano (Blanco & Mugnier, 2011).

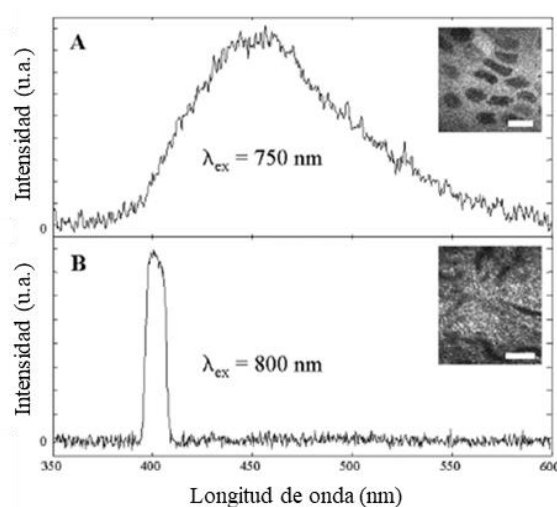
## 1.6. Microscopía multifotónica en el segmento anterior del ojo

Una aplicación de la microscopía multifotónica es el estudio de las estructuras oculares, en particular la córnea (y en menor medida la esclera), por tener, como ya se ha dicho, un alto contenido en colágeno. Aunque los primeros registros de señal SHG en córnea y esclera se publican en 1971 (Fine & Hansen, 1971), no es hasta principios del siglo XXI cuando se reportan los primeros trabajos que muestran de manera eficiente imágenes SHG en la córnea y la esclera (Han et al., 2005; Teng et al., 2006; Theodossiou et al., 2001; Yeh et al., 2002).

La Figura 1.19 muestra, en una córnea de conejo, los espectros de emisión de las señales TPEF ( $\lambda_{in} = 750$  nm) y SHG ( $\lambda_{in} = 800$  nm) (Yeh et al., 2002). El pico de emisión SHG (emitido por el colágeno) está en 400 nm, lo cual corrobora que la emisión es justamente la mitad de la  $\lambda_{in}$  de iluminación. Por su parte el espectro de la señal TPEF (emitido por los queratocitos situados dentro del estroma corneal) es mucho más amplio dado que con una única  $\lambda_{in}$  se pueden

excitar múltiples fluoróforos de muy diversa índole. Las moléculas susceptibles de emisión de señal TPEF y SHG se recogen en la Tabla 1.1 (Lin & Hao, 2020).

Es interesante destacar cómo, a pesar de la diferente organización del estroma corneal de distintos modelos animales, las córneas son siempre transparentes (Bueno et al., 2011). Mientras en peces y aves las lamelas (i.e. conjuntos de fibras paralelas) se organizan perpendicularmente rotando con la profundidad, en mamíferos (humanos incluidos) la rotación se pierde y en algunos casos también la perpendicularidad, cruzándose a diferentes ángulos (Winkler et al., 2015).



**Figura 1.19.** Emisión espectral de la señal TPEF (A) y SHG (B) en la córnea. Adaptado de (Yeh et al., 2002).

Las técnicas de microscopía multifotónica permiten registrar imágenes volumétricas (3D) de la córnea con resolución sub-celular de las cuales es posible extraer información para caracterizar sus diferentes capas. En el epitelio se pueden observar las células superficiales, aladas y basales a partir de la señal TPEF que emiten sus citoplasmas (los núcleos no emiten señal). En el estroma, de igual forma, mediante microscopías TPEF y SHG es posible visualizar los queratocitos y el colágeno corneal respectivamente. En el estroma posterior las células del endotelio emiten señal TPEF (Aptel et al., 2010; Hsueh et al., 2016; Jester et al., 2010).

**Tabla 1.1.** Moléculas y estructuras susceptibles de emitir señal TPEF y SHG en la córnea. Adaptada de (Lin & Hao, 2020).

<i>Fluoróforo</i>	<i>Señal</i>	$\lambda_{excitación} (nm)$	$\lambda_{emisión} (nm)$
NAD(P)H	TPEF	600–800	430–490
FAD	TPEF	700–1000	490–650
Colágeno	SHG	800–1000	$\lambda_{in}/2$

Diferentes autores han analizado la organización del colágeno corneal humano con microscopía SHG (Bueno et al., 2011; Morishige et al., 2006, 2011; Park et al., 2015a; Winkler

et al., 2013). De forma general en la parte central del estroma corneal se han descrito zonas diferenciadas. Una zona anterior y más superficial (que linda con la membrana de Bowman) donde las fibras de colágeno son cortas, están en su mayoría organizadas de forma paralela a la superficie corneal y entretrejidas más o menos aleatoriamente. En esta zona también se han localizado algunas lamelas orientadas en dirección anteroposterior que se postula aportan rigidez a la superficie corneal. A mayor profundidad (estroma anterior y medio), las fibras son de mayor longitud, más gruesas y claramente altamente entrecruzadas. En el estroma posterior, las fibras siguen discurriendo paralelas a la superficie corneal y se alinean de forma predominante ortogonal. Hacia la periferia se observa cómo las fibras se organizan de forma tangencial para posiblemente aportar rigidez a la estructura.

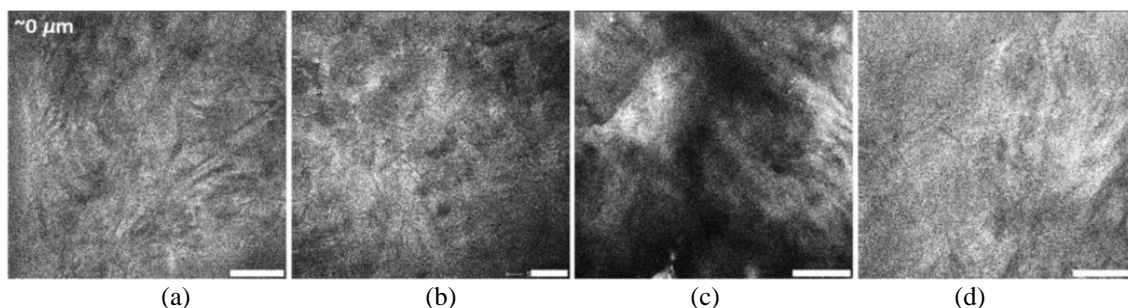
En la zona del limbo esclerocorneal la microscopía SHG ha revelado la distribución del colágeno en la unión entre córnea y esclera. En esta zona, adquieren más relevancia la capacidad de observar las células madre de la parte interna del epitelio (señal TPEF) y el seguimiento de su especificación y migración hacia la zona más superficial del mismo (Lombardo et al., 2017) ya que tienen un papel importante en la renovación y cicatrización de las heridas corneales (Daniels et al., 2001; Dua & Azuara-Blanco, 2000; Kruse, 1994).

Las aplicaciones de la microscopía no lineal en el segmento anterior del ojo no se han centrado únicamente en el análisis de estructuras sanas, sino que también se han explorado los cambios que se producen con ciertas patologías o daños externos que van desde el queratocono (Lo et al., 2012; Morishige et al., 2007, 2014), o la queratopatía bullosa (Ávila et al., 2019; Sanz-Marco et al., 2011), hasta procesos de cicatrización tras cirugía (Morishige et al., 2014; Lo et al., 2010; Wang et al., 2008). También se han analizado los efectos del edema en la organización estromal (Morishige et al., 2009), así como los efectos de la queratitis infecciosa (Lee et al., 2016; Tan et al., 2007), *Pseudomonas aeruginosas* (Robertson et al., 2017), queratitis fúngica (Lee et al., 2016) y por *Acanthamoeba* (Batista et al., 2018b). Recientemente el uso de herramientas objetivas de análisis ha mostrado ser de gran utilidad para discernir entre corneas sanas y patológicas (Ávila et al., 2019a).

Una de las principales líneas de investigación de la microscopía multifotónica en patologías oculares tiene por objeto el estudio del desarrollo del queratocono. Esta patología irreversible y con afectación a la visión puede estudiarse a nivel microscópico gracias a esta técnica de imagen. Se ha reportado que, a pesar de no afectar a la transparencia del tejido, la organización del colágeno no es tan regular como en las córneas sanas, dando lugar a una desorganización que es apreciable sin el uso de tinción (Ávila et al., 2019a; Batista et al., 2018b; Lo et al., 2012; Mercatelli et al., 2017a, 2017b; Morishige et al., 2007, 2014; Tan et al., 2006). Además,



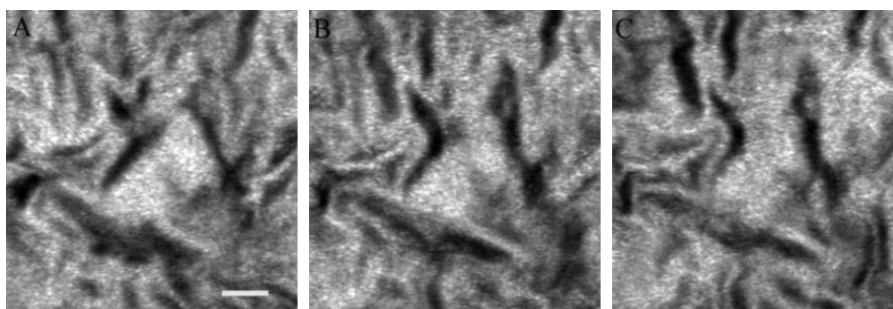
mediante TPEF se ha observado un aumento de la longitud de las células superficiales del epitelio corneal en el ápex debido a la aparición del cono (Batista et al., 2018b; Tan et al., 2006). En la Figura 1.20 se presentan ejemplos de estroma corneal sano y afectado por diferentes patologías: queratocono, queratitis por *Acanthamoeba* y cicatriz estromal.



**Figura 1.20.** Imágenes SHG de córnea humana sana (a), afectada de queratocono (b), queratitis por *Acanthamoeba* (c) y con una cicatriz corneal (d). Escala: 30  $\mu\text{m}$ . Figura tomada de (Batista et al., 2018b).

Por otro lado, el tratamiento mediante *cross-linking* corneal del queratocono también se ha estudiado ampliamente en la última década. Los modelos animales han permitido observar y comparar el proceso y la respuesta del tejido a este tratamiento (Bueno et al., 2013b, 2019b; Chai et al., 2013; Germann et al., 2020; Tan et al., 2013; Wang et al., 2018). Esta técnica de *cross-linking* aplicada a la esclera se emplea para frenar el aumento de la miopía de igual forma que en la progresión del queratocono, reforzando los enlaces entre las moléculas de colágeno y aumentando la rigidez, para en este caso evitar el crecimiento del ojo (Liu et al., 2016; Zyablitskaya et al., 2018).

A pesar de la gran cantidad de estudios que usan la microscopía no lineal para visualizar la córnea (y la esclera en menor medida), es escaso el número de trabajos que aplican este método con éxito en el ojo en vivo y mucho menos en el ojo humano. Una de las primeras tentativas fue presentada en 2005 por Wang y colaboradores (Wang et al., 2005). Mostraron imágenes TPEF de diferentes estructuras de la córnea de conejo: células epiteliales (superficiales, aladas y basales), queratocitos y endoteliales. Aunque consiguieron registrar imágenes SHG del estroma con una  $\lambda_{\text{in}}$  de 830 nm (Figura 1.21), no aportaron datos concretos ni del plano de registro ni de la potencia (simplemente indican un rango entre 15 y 30 mW). En 2010, Hao y coautores inyectaron un marcador para los queratocitos en conejos anestesiados (Hao et al., 2010). En la parte central de la córnea obtuvieron una fuerte señal TPEF. No estudiaron la potencia mínima necesaria para obtener señal multifotónica endógena. Tampoco consiguieron obtener imágenes TPEF de las células epiteliales, ni SHG del estroma (Hao et al., 2010).



**Figura 1.21.** Imágenes del estroma corneal de conejo en vivo. Adaptada de (Wang et al., 2005). Escala: 10  $\mu\text{m}$ .

En un modelo de rata en vivo, Latour et al. registraron imágenes SHG del colágeno corneal. La potencia empleada fue de 85 mW y los resultados muy parecidos a imágenes *ex vivo* (Latour et al., 2012). Para mejorar la calidad de las imágenes multifotónicas en córneas de pequeños animales (i.e. roedores) Wu et al. han desarrollado recientemente una plataforma que mejora la estabilidad de la imagen y además permite girar y mover la cabeza del animal, lo que asegura que la zona de registro sea perpendicular al haz láser incidente (Wu et al., 2019). En 2015 Lee y coautores registraron imágenes multifotónicas de la córnea de ratones en vivo, comparando su efectividad con la microscopía confocal, aunque las multifotónicas presentan un mayor contraste y reducido ruido de fondo, ambas técnicas aportan información complementaria que puede ser de gran utilidad para realizar un estudio más completo de la córnea (Lee et al., 2015). En otro caso reportado, se ha empleado la microscopía multifotónica para el estudio de corneas patológicas en vivo, Ehmke et al., mostraron la utilidad de esta técnica para la detección de los nervios corneales en el estudio de patologías como la diabetes (Ehmke et al., 2016).

Todos estos estudios usan animales anestesiados, con marcadores (Hao et al., 2010) o transgénicos (Ehmke et al., 2016) para potenciar la señal no lineal. A pesar del registro de la señal en reflexión, la técnica ha permitido observar con detalle el colágeno estromal (Latour et al., 2012; Wang et al., 2005), pero la configuración de estos microscopios no está adaptada para su uso clínico en humanos.

Las primeras imágenes multifotónicas de estructuras del ojo humano en vivo fueron registradas exitosamente en nuestro grupo de investigación (Ávila et al., 2019b). En este trabajo se ha ido un paso más allá, construyendo un nuevo prototipo clínico de segunda generación optimizado, más flexible y con el software actualizado y mejorado (tanto de registro como de análisis). Con este instrumento se han analizado los parámetros óptimos de registro, se han evaluado detalladamente los límites de seguridad, se ha minimizado la distorsión y se han registrado por primera vez imágenes multifotónicas de estructuras oculares adicionales con

potencial interés tanto desde el punto de vista de ciencia básica, como para posibles aplicaciones en el entorno clínico.

## **1.7. Motivación, objetivos y estructura del trabajo**

### **1.7.1. Motivación y objetivos**

En este capítulo se han mostrados los conceptos básicos necesarios para el desarrollo de la Tesis Doctoral. El germen de este proyecto surge de la falta de herramientas para visualizar y estudiar en profundidad las estructuras del segmento anterior del ojo en vivo, formadas principalmente por colágeno tipo I, como son el estroma corneal y escleral, cuyas funciones son de gran importancia para el correcto funcionamiento del sistema visual.

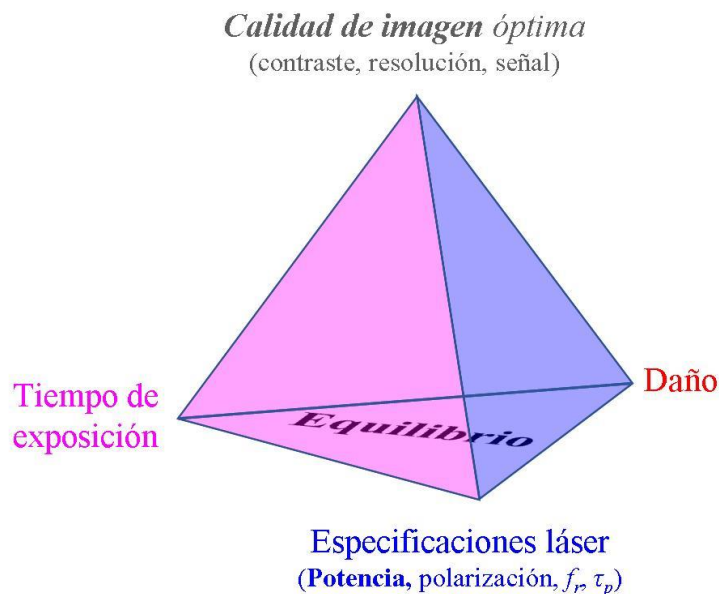
La microscopía multifotónica permite ver detalles de estos tejidos que no se pueden visualizar con los instrumentos clínicos disponibles (lámpara de hendidura, microscopía confocal y OCT). Pese a las múltiples ventajas de la imagen multifotónica, solamente un estudio ha sido capaz de registrar este tipo de imágenes en la córnea y la esclera humanas en condiciones en vivo (Ávila et al., 2019b) debido a diversos problemas experimentales. El que la muestra no sea estática (ojo en vivo) trae consigo otros factores limitantes adicionales. En primer lugar, es necesario que la potencia del láser y el tiempo de exposición de las imágenes estén dentro del límite máximo de exposición permitido (MPE, del inglés *Maximum Permissible Exposure*). En el caso de imágenes multifotónicas del ojo en vivo no se reduce solamente a establecer los límites cuando el haz láser se focaliza sobre la córnea. Además, se ha de tener en cuenta que una fracción considerable de la luz IR utilizada como iluminación no se absorbe para generar señal no lineal visible, y se propaga a través de los medios oculares llegando a la retina (Delori et al., 2007).

Por otra parte, como en cualquier otro instrumento clínico utilizado en el entorno oftalmológico, los movimientos oculares pueden degradar la imagen. Aunque los test visuales de fijación y los dispositivos de apoyo y fijación (mentonera, improntas dentales) reducen los movimientos de la cabeza y la dirección de mirada, son los micro-movimientos oculares involuntarios los que pueden tener efectos adicionales significativos. Para evitar que estos movimientos afecten a la imagen registrada es necesario reducir el tiempo de exposición sin que esto repercuta en la calidad de la imagen. Sin embargo, en sistemas experimentales como el aquí desarrollado, el establecimiento de este tiempo de registro depende de varios parámetros físicos tales como la velocidad máxima con la que la unidad de escaneo barre la zona de registro, tamaño de dicha zona escaneada, resolución de ésta, tiempo de integración de la señal y frecuencia de muestreo del detector. Además, si la velocidad de registro es muy alta se producen

distorsiones debido a la inercia de los escáneres (Jigang et al., 2018) que, sumadas a un tiempo de exposición bajo, reduciría la señal registrada de forma significativa. Por este motivo es necesario realizar una selección y análisis de los parámetros que permitan el registro óptimo de imágenes multifotónicas en vivo en nuestro sistema experimental, siempre dentro del MPE.

El contraste, la resolución y la señal multifotónica (i.e. intensidad de una determinada imagen) son parámetros determinantes a la hora de determinar la “buena calidad” de una imagen, aunque ésta se vea a su vez limitada por factores asociados al propio tejido, como es el caso de las aberraciones y el *scattering*.

En este sentido, para conseguir una imagen final de calidad “óptima”, debe establecerse un equilibrio entre las características de la muestra a analizar, los parámetros de registro y las propiedades del láser de femtosegundo que podemos representar de forma resumida en el tetraedro de la Figura 1.22.



**Figura 1.22.** Representación gráfica del equilibrio entre los parámetros de registro necesarios para obtener una imagen multifotónica “óptima”.

Es preciso, por tanto (1) un tiempo de exposición mínimo, que no sólo reduzca los movimientos oculares involuntarios, sino que permita que lleguen al detector el suficiente número de fotones para cada localización del escáner. Por su parte, (2) las especificaciones de la fuente láser son cruciales, puesto que la señal generada depende de factores tan variados como  $P_{avg}$ ,  $f_r$ ,  $\tau_p$  y el estado de polarización del haz de luz incidente (véase el apartado 1.5). Finalmente, (3) para evitar un posible daño en el tejido, es necesario trabajar con niveles de iluminación por debajo del MPE que protejan no sólo la córnea y la esclera, sino que aseguren, en el caso de la primera, que toda la luz que se propague dentro del ojo no produzca ningún tipo de daño ni en el cristalino y ni en la retina.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, los objetivos principales que se han planteado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Diseño, desarrollo y puesta a punto de un instrumento compacto para el registro de imágenes multifotónicas del ojo humano que pueda ser aplicado de forma segura en condiciones en vivo.
2. Cálculo de los niveles de luz permitidos que eviten daños de las estructuras oculares en vivo.
3. Demostración de la aplicabilidad de la imagen multifotónica en sujetos control.
4. Desarrollo de algoritmos que permitan el cálculo de la distribución espacial de fibras de colágeno y la medida objetiva de la calidad de imagen.
5. Análisis de la orientación y espaciado de las fibras de colágeno en distintas localizaciones, tanto de la córnea como de la esclera.
6. Visualización de estructuras cuya integridad es relevante para la detección de ciertas patologías oculares.
7. Comparación morfológica precisa de las estructuras oculares de imágenes multifotónicas registradas en condiciones en vivo y *ex vivo*.
8. Mejora de imágenes multifotónicas en vivo mediante técnicas de deconvolución ciega.
9. Estudio de los efectos que sobre la calidad de la imagen multifotónica tienen parámetros físicos ligados al haz de iluminación láser, como la polarización radial y la duración del pulso láser para una posible optimización de imágenes del ojo en vivo.

### **1.7.2. Estructura del trabajo**

Esta Tesis Doctoral está compuesta por ocho capítulos, que darán respuesta a las cuestiones planteadas y con los cuales se pretende alcanzar los objetivos propuestos. El contenido se muestra a continuación:

- En el *Capítulo 1*, se proporciona la información más relevante sobre las estructuras oculares que contienen colágeno y las diferentes formas de visualizar el ojo humano en vivo. Se ha resumido el concepto de microscopía multifotónica (TPEF y SHG), se han expuesto sus ventajas e inconvenientes y se ha hecho hincapié en su aplicación en tejidos oculares (sanos y patológicos). Finalmente, se han planteado las motivaciones y objetivos principales de este trabajo.
- En el *Capítulo 2* se describe con detalle el sistema experimental compacto desarrollado, así como las herramientas utilizadas (algoritmos, *software*) para el análisis de las imágenes multifotónicas registradas.

- En el *Capítulo 3* se realiza un análisis exhaustivo de la dependencia entre los diferentes parámetros de registro y cómo afectan al tiempo de registro, a la distorsión y a la calidad de imagen. Finalmente, se define la combinación óptima de parámetros para conseguir la mejor imagen posible dentro de los límites de seguridad para el registro en vivo.
- En el *Capítulo 4* se ha llevado a cabo un estudio teórico de los límites de exposición seguros para realizar un registro de imágenes en vivo, teniendo en cuenta características del registro y el sistema experimental. Así mismo, se muestran imágenes registradas de la córnea y la esclera del ojo humano en vivo, así como en otras localizaciones de interés (el limbo esclerocorneal en particular).
- En el *Capítulo 5* se muestran los resultados en la mejora de imagen obtenidos al aplicar un método de deconvolución ciega sobre las imágenes multifotónicas registradas.
- En el *Capítulo 6* se estudian el efecto que sobre las imágenes SHG de tejidos oculares produce el uso de luz polarizada radialmente, para su futura implementación en el sistema de registro en vivo.
- En el *Capítulo 7* se analizan la calidad de las imágenes TPEF y SHG obtenidas con un sistema láser compacto que proporciona pulsos de menos de 10 fs. Los resultados se comparan con los obtenidos con el láser usado en este trabajo y se valora la posibilidad de que pueda ser usado para tejidos en vivo.
- En el *Capítulo 8* se exponen las conclusiones principales de esta Tesis Doctoral.

# *Capítulo 2*

## **Microscopio multifotónico compacto. Métodos de procesamiento y análisis de imágenes**

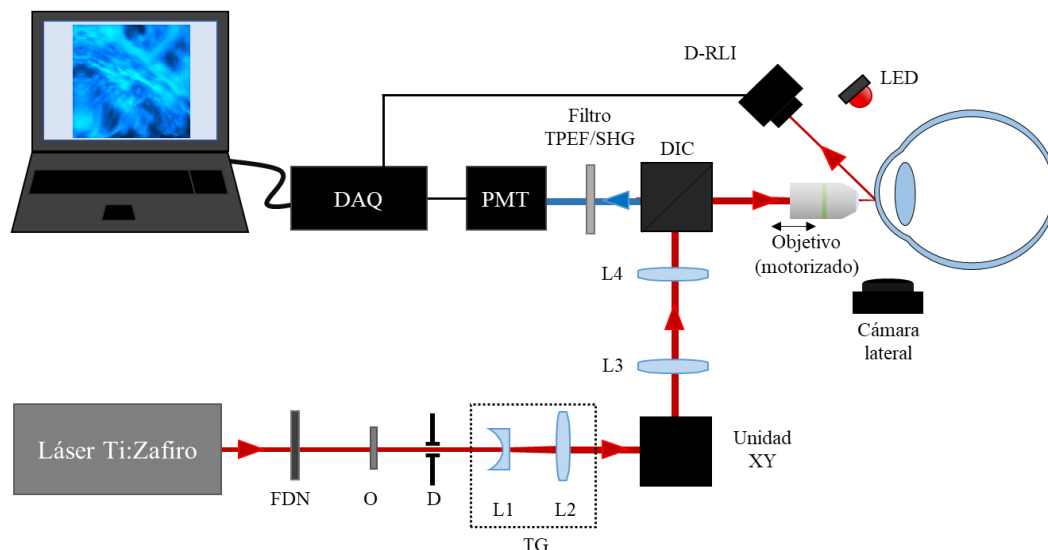
**E**n este capítulo se presenta el sistema experimental desarrollado, así como las herramientas de análisis de imagen utilizadas. En primer lugar, se realiza una descripción detallada de los componentes y estructura del microscopio multifotónico compacto. Después, se detallan las herramientas empleadas para el análisis de las imágenes, que van desde los parámetros relativos a la señal no lineal hasta las métricas de calidad de imagen, de estructura, orden y de textura de las muestras. Finalmente, se describe el método de deconvolución ciega utilizado para mejorar las imágenes registradas.





## 2.1. Sistema experimental: Microscopio multifotónico compacto

La Figura 2.1 presenta de manera esquemática el microscopio multifotónico de segunda generación desarrollado. Es un diseño compacto que, aunque en la operación de calibrado y puesta a punto se usará para muestras ex vivo, su objetivo final es el uso en el ojo humano en vivo. En este capítulo se describen los componentes fundamentales y se explica su funcionamiento. Los detalles sobre los elementos adicionales introducidos para los diferentes experimentos se describen los capítulos sucesivos.



**Figura 2.1.** Esquema general del microscopio multifotónico. FDN, filtro neutro de densidad variable; O, obturador; D, diafragma; L1-L4 lentes; TG, telescopio de Galileo; DIC, espejo dicróico; D-RLI, detector lineal con filtro IR; PMT, detector; DAQ, tarjeta de adquisición de datos.

### 2.1.1. Fuente de iluminación

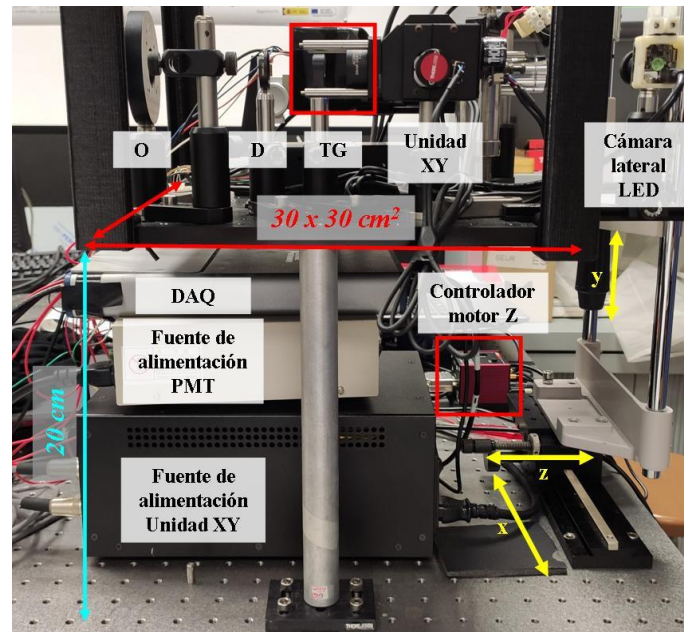
La fuente de iluminación utilizada en microscopía no lineal debe tener una potencia y una frecuencia de repetición que permitan aportar una cantidad de fotones suficientemente alta para que en el foco del objetivo haya una probabilidad no nula de que se produzca la absorción casi simultánea de pares de fotones. En este trabajo, se ha utilizado un láser pulsado de Ti:Zafiro (Mira 900f, Coherent) que emite pulsos de  $\sim 150$  fs con una frecuencia de repetición de 76 MHz y una potencia media de 800 mW (Figura 2.2a). La longitud de onda, aunque es sintonizable y puede seleccionarse entre 700 y 900 nm, ha quedado fijada en 800 nm. Para la generación de estos pulsos, el cristal de Ti:Zafiro se bombea con un haz láser continuo de estado sólido Nd:YAG (Figura 2.2b) de 532 nm procedente de otra fuente (Verdi V6, Coherent), que a su vez se ha bombeado con dos diodos IR de 808 nm (Figura 2.2c). La fuente de iluminación requiere de una unidad de refrigeración (Figura 2.2e) para evitar que se sobrecaliente y se produzca el deterioro o desalineamiento de los elementos ópticos de la cavidad.



**Figura 2.2.** Elementos de la fuente láser de iluminación principal empleada en este trabajo: (a) láser de Ti:Zafiro; (b) láser Nd:YAG; (c) láseres diodo de bombeo; (d) controlador de la cavidad que produce el haz pulsado; (e) unidad de refrigeración.

### 2.1.2. Recorrido del haz y sistema óptico

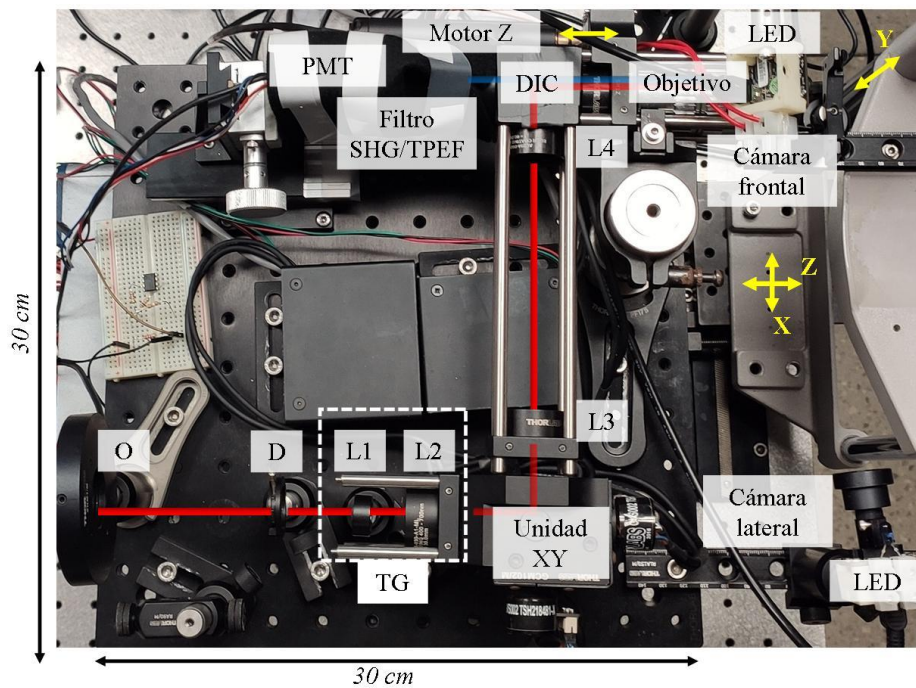
El microscopio tiene unas dimensiones totales  $35 \times 35 \times 45 \text{ cm}^3$  y consta de dos niveles (Figura 2.3). El nivel superior incluye todos los componentes ópticos y el inferior la electrónica.



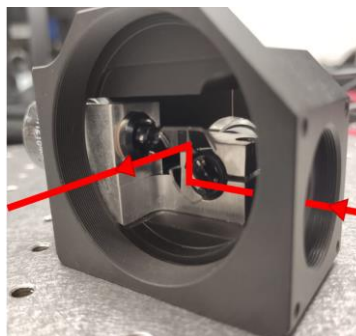
**Figura 2.3.** Vista lateral del microscopio multifotónico compacto donde se muestran los dos niveles descritos en el texto. O, obturador; D, diafragma; TG, telescopio de Galileo; DAQ, tarjeta de adquisición de datos. Las flechas amarillas indican el movimiento tridimensional de la mentonera para el alineamiento del ojo del sujeto con respecto al haz láser de entrada.

Las dimensiones indicadas no incluyen el sistema de iluminación, cuyo haz es guiado por varios espejos hasta la posición obturador mecánico (O; SHB1, Thorlabs), que controla el tiempo de exposición y evita el paso de la luz cuando no se están registrando imágenes. Dentro de la plataforma superior (Figura 2.4), el haz pasa por un filtro de densidad neutra variable (FDN), que regula la potencia del haz sobre la muestra (bien estática, bien el ojo humano en vivo) y un diafragma (D) que limita su diámetro. El haz se expande 2x al atravesar un telescopio de Galileo (TG) formado por dos lentes, L1 y L2 ( $f_{L1} = -15 \text{ mm}$ ;  $f_{L2} = 30 \text{ mm}$ ). La unidad de

escaneo XY la configuran dos espejos galvanométricos acoplados (GVSM002, Thorlabs) que se mueven en las direcciones X e Y (Figura 2.5). Un telescopio formado por dos dobletes acromáticos (L3 y L4,  $f_{L3}=f_{L4}=60$  mm) conjuga la unidad de escaneo con la pupila de entrada del objetivo del microscopio. El espejo dicroico (DIC, 69-218, Edmund Optics) refleja el haz IR hacia el objetivo 20x, con una apertura numérica (AN) de 0.42 (PLAN APO, Edmund Optics) que trabaja con una distancia de trabajo de 20 mm. El objetivo tiene acoplado un motor piezoeléctrico (ZST206; Controlador: KST101; Thorlabs) que permite realizar un ajuste del foco y controlar la profundidad de penetración dentro de la muestra.



**Figura 2.4.** Elementos que componen la plataforma superior del sistema experimental. O, obturador; D, diafragma; L1-L4 lentes; TG, telescopio de Galileo; DIC, espejo dicroico; PMT, detector.



**Figura 2.5.** Unidad de escaneo XY donde se puede observar la disposición perpendicular de los dos espejos.

En el camino de registro, la señal no lineal procedente de la muestra vuelve a atravesar el objetivo, el DIC y el filtro espectral SHG/TPEF para llegar a la unidad de detección (véase

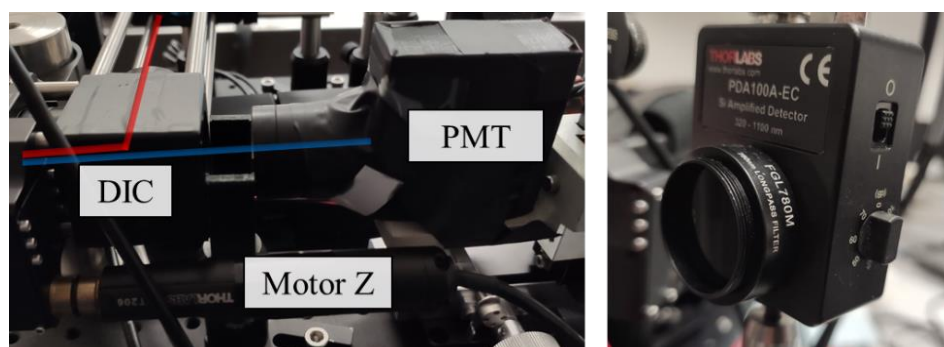
apartado 2.1.3). En transmisión el DIC permite el paso de luz en el rango 400-680 nm. Por su parte, los filtros espectrales se utilizan para aislar las señales SHG (filtro paso banda; FB400-40, Thorlabs) y TPEF (filtro paso alta; FEL0450, Thorlabs).

### 2.1.3. Unidades de detección

Un fotomultiplicador (PMT; H9305-02, Hamamatsu Photonics, Figura 2.6a) actúa de sistema detector. Su sensibilidad (o ganancia) se controla con una fuente de alimentación situada en el nivel inferior del instrumento (Figura 2.3). Por otro lado, el sistema cuenta también con un fotodetector auxiliar D-RLI (PDA100A-EC, Thorlabs; Figuras 2.1 y 2.6b) que permite registrar la señal lineal reflejada por la muestra, tras atravesar ésta un filtro espectral paso alta para IR cercano (FGL780M, Thorlabs). De esta forma, con ambos detectores es posible recoger tanto la señal lineal como la no lineal de una misma muestra de forma simultánea. Las imágenes registradas con este detector se denominarán RLI (del inglés *Reflectance Linear Image*).

La tarjeta de adquisición de datos (DAQ; NI 6363, National Instruments) se encarga de recoger la señal de los fotodetectores y de controlar la velocidad de la unidad de escaneo XY, la posición del motor de enfoque y el obturador, además de las cámaras de control de posición.

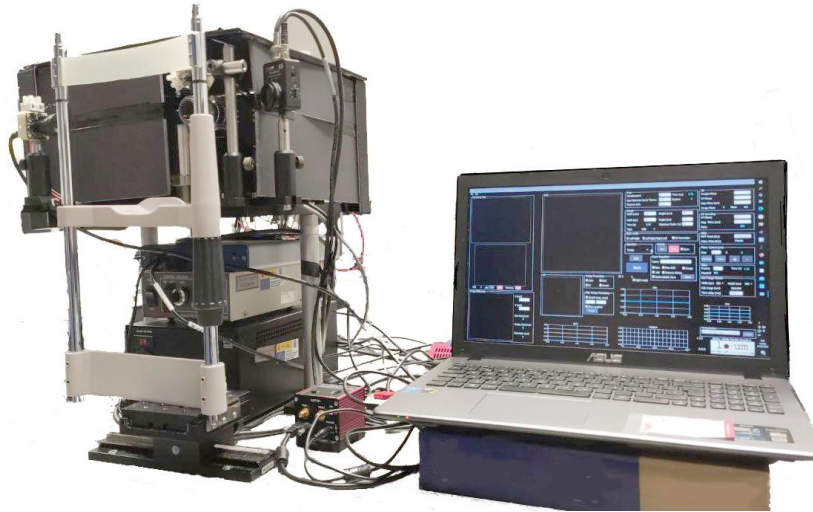
Todo el sistema está controlado mediante un software en C++ desarrollado en el LO-UM, que permite controlar el tiempo de exposición y cambiar los diferentes parámetros del registro, tales como la frecuencia de muestreo, el modo de escaneo, o el tamaño y la resolución de las imágenes.



**Figura 2.6.** Unidades de detección. PMT para registrar y amplificar la señal multifotónica (izquierda). Fotodetector D-RLI usado para la adquisición de la señal lineal (derecha).

Todos los elementos ópticos descritos, así como la parte electrónica y de detección (DAQ, fuentes de alimentación de la unidad de escaneo y PMT) del microscopio pueden confinarse en reducidas dimensiones dando lugar a un sistema clínico compacto (Figura 2.7). El hecho de que la plataforma superior vaya cerrada evita contribuciones de luz externa o parásita en la unidad de detección que pudieran afectar a las imágenes.



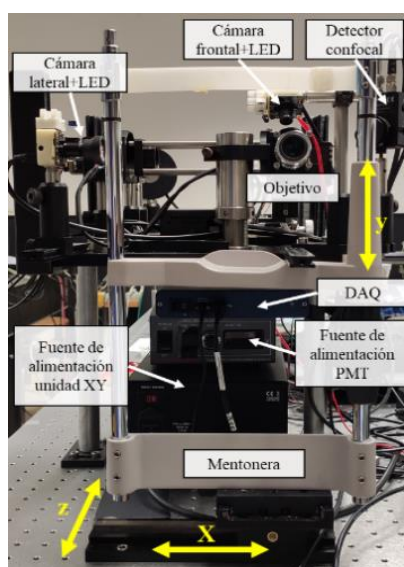


**Figura 2.7.** Sistema experimental compacto con una carcasa protectora que evita la contribución no deseada de luz parásita. A la derecha se puede observar el ordenador portátil que controla el sistema.

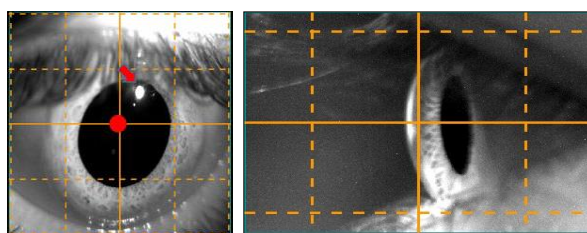
#### 2.1.4. Posición del sujeto

La Figura 2.8 presenta una vista frontal del microscopio compacto, donde se pueden ver los dos niveles desde otro ángulo. En el diseño del sistema, se ha procurado que la plataforma superior proporcione una mayor ergonomía y esté a una altura que permita comodidad a la hora de registrar imágenes de sujetos en vivo. En este caso, el sujeto se sitúa con el ojo a medir frente al objetivo, apoyando la barbilla en una mentonera para minimizar los movimientos involuntarios de la cabeza y regular la altura (Y). Está situada sobre una plataforma que permite ajustar la posición lateral (X) del ojo, así como la proximidad al objetivo para el ajuste del foco (Z).

Un sistema de cámaras adicionales (DMM 42BUC03-ML, *Imaging Source*) controla la posición de la muestra a estudiar con respecto al haz incidente. Una cámara está en posición lateral (véanse Figuras 2.1, 2.3 y 2.4) y otra en la parte superior, sobre el objetivo del microscopio, enfrente del sujeto/muestra (Figura 2.8). Un LED de 950 nm ilumina el ojo para poder visualizarse con dichas cámaras (Figura 2.9). Una vez encontrada la posición correcta, el LED se apaga automáticamente antes de que el obturador se abra y comience el registro de la imagen.



**Figura 2.8.** Vista frontal del sistema experimental: mentonera XYZ; cámaras frontal y lateral; LEDs; fotodetector para recoger la señal lineal IR reflejada; objetivo; DAQ, tarjeta de adquisición de datos; fuente de alimentación del PMT y fuente de alimentación de la unidad de escaneo XY.



**Figura 2.9.** Ejemplos de imágenes frontal y lateral, registradas por la cámara de control de posición para un ojo en vivo. El punto rojo indica la posición de incidencia del haz de iluminación antes de comenzar el registro de la imagen MP. La fecha roja indica la 1ª imagen de Purkinje resultado de la reflexión del LED usado como iluminación auxiliar.

### 2.1.5. Registro de imágenes

El procedimiento de registro de imágenes multifotónicas se ha diseñado para que funcione de dos formas diferentes. Por una parte, permite imágenes individuales para una posición del foco determinada y fija. Por otra parte, se puede adquirir una serie de imágenes en diferentes planos (a lo largo de la dirección Z) para con ellas, una vez grabadas, realizar la reconstrucción 3D. Esta última también se puede utilizar en “modo osciloscopio” en el cual se integra toda la señal para cada plano sin reconstruir las imágenes correspondientes.

La Figura 2.10 muestra la interfaz del *software* de control desarrollado. En él se pueden distinguir las siguientes partes:

1. Imágenes de las cámaras de monitorización y control de posición de la muestra (véase Figura 2.9).
2. Imagen multifotónica registrada.
3. Parámetros de integración.

4. Tamaño y resolución de la imagen a registrar.
5. Modo de escaneo de los espejos.
6. Velocidad de lectura de la PMT.
7. Ajuste de foco (posición del objetivo).
8. Si estamos obteniendo un “stack” de imágenes, permite modificar el número de planos, así como la profundidad y distancia entre ellos.
9. Número de imágenes para un vídeo (o imagen 3D) o de sub-imágenes de un mosaico.
10. Modo y formato a guardar los datos registrados, así como control del obturador.
11. Información gráfica sobre la señal multifotónica registrada (histograma, ...).

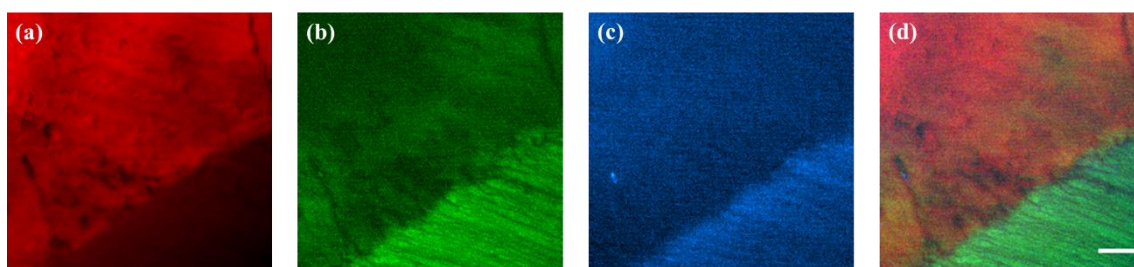
La aplicación es flexible y permite la variación de gran cantidad de parámetros al registrar imágenes. La influencia de todos estos parámetros se analizará en el Capítulo 3.



Figura 2.10. Interfaz del software de control desarrollado.

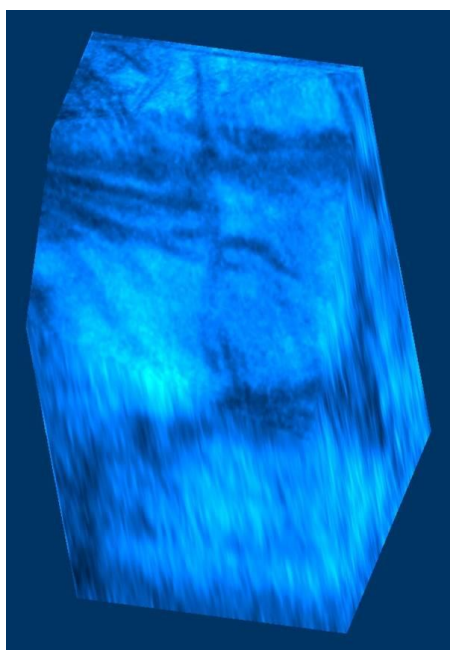
Debido a las diferentes características de las señales que se registran con el microscopio y para diferenciar entre imágenes TPEF, SHG y RLI, éstas se presentarán en falso color (puesto que las imágenes registradas originalmente están en escala de grises de 8 bits). En el caso de la señal SHG, las imágenes se mostrarán en azul, las TPEF en verde y las RLI en rojo. Las posibilidades que se abren al registrar imágenes simultáneas (o secuencialmente) por los canales TPEF/SHG y RLI son amplias, pues permiten un análisis estudio complementario del tejido. Un ejemplo de esto se presenta en la Figura 2.11. Aunque la muestra (una pieza dental) no es objeto de estudio en este trabajo, se puede observar cómo cada canal aporta información sobre las diferentes zonas de la muestra: esmalte, zona de unión y dentina del diente humano

(Martínez-Ojeda et al., 2020). En este caso en particular, el esmalte (parte superior-izquierda de la muestra) emite señal tanto lineal, que se registra por el canal RLI en falso color rojo (Figura 2.11a), como TPEF en color verde (Figura 2.11b). En cambio, la dentina (parte inferior-derecha de la muestra) emite tanto TPEF y SHG, que se muestra en color azul (Figura 2.11c). Incluso en la zona del esmalte se observa una rotura (“punto brillante”) que emite señal SHG debido a que la dentina queda expuesta.



**Figura 2.11.** Imágenes RLI (a), TPEF (b), SHG (c) y la composición de las tres imágenes (d) de la unión entre la dentina y el esmalte en un diente humano. Barra de escala: 25  $\mu\text{m}$ .

Si en lugar de usar el modo de imagen individual se utiliza el “modo *stack*” se puede realizar una representación 3D de la muestra. En la Figura 2.12 como ejemplo se presenta la reconstrucción 3D de la córnea humana a partir de imágenes SHG registradas a intervalos de 50  $\mu\text{m}$  hasta una profundidad de 400  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.12.** Reconstrucción 3D del estroma corneal humano a partir de imágenes SHG registradas a distintas profundidades. La imagen está representada en un falso color azul.

## 2.2. Procesado de imágenes

Además de registrar imágenes multifotónicas en condiciones experimentales determinadas, se han desarrollado una serie de herramientas para estudiar y analizar los tejidos de los que se



ha realizado imagen. Es por ello necesario el uso de métricas y parámetros de calidad que permitan caracterizar dichas imágenes y que posibiliten su comparación. Los diferentes parámetros que se usarán son entre otros: intensidad de la señal no lineal (mínima, máxima y total), acutancia, entropía, relación señal/ruido (SNR, del inglés *Signal-to-Noise Ratio*) y contraste.

El procesado se ha realizado con *software* desarrollado en Matlab® (MATLAB, 2017). Tanto para la asignación del falso color como para las reconstrucciones 3D se ha usado el *software* de dominio público ImajeJ® (Schindelin et al., 2012).

Con el objetivo de obtener imágenes con la mayor calidad posible, se han puesto a punto métodos de procesado que permiten la eliminación del ruido sin perder ningún tipo de información. Por otra parte, se han desarrollado algoritmos y técnicas para el análisis detallado de las estructuras, lo cual permite determinar no sólo la calidad de imagen sino también la organización de las fibras dentro de la muestra (si la hubiere) o la textura. Todas estas herramientas se describen en los siguientes apartados.

### **2.2.1. Calidad de imagen**

Debido a la necesidad de optimizar de forma fehaciente las diferentes propuestas en el estudio de estructuras, es preciso conocer si existe mejora objetiva de calidad entre las imágenes. La evaluación de la calidad de una imagen va a menudo ligada al “brillo” o a la “iluminación” de ésta cuando la realiza un observador. Sin embargo esta operación es puramente subjetiva y la aproximación no es siempre fiable (Stanciu et al., 2017).

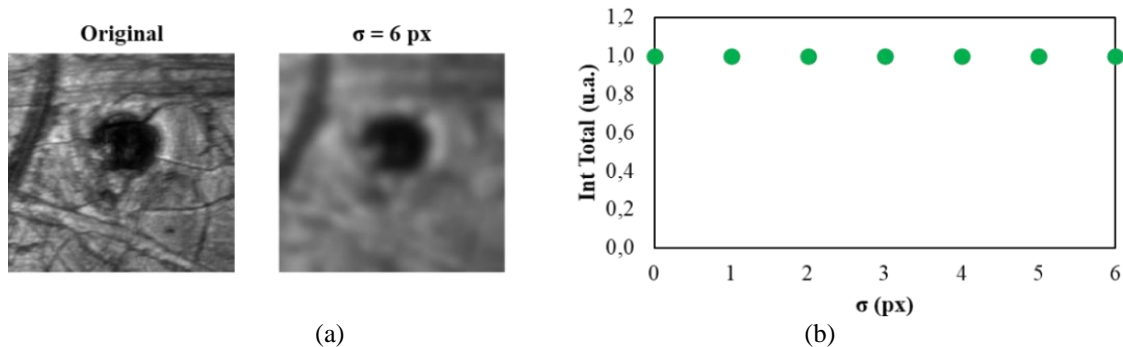
Por el contrario, se pretende llevar a cabo una evaluación objetiva, para que, independientemente de la intensidad aparente o el brillo en la imagen, se pueda estimar qué imagen es mejor. De este modo, se proponen distintas métricas.

- *Acutancia*: Es una métrica que se basa en la cuantificación de los contrastes locales dentro de la imagen asociados estrechamente con la detección de estructuras (Hunter et al., 2007). De esta forma, independientemente de la intensidad, la acutancia será nula si la imagen es uniforme. En cambio, cuanto mayor sean las variaciones locales de intensidad en la imagen, mayor será su valor.
- *SNR*: Establece la relación señal-ruido y numéricamente se calcula como el cociente entre la intensidad promedio de la imagen y la desviación estándar de la misma. La inversa del SNR se define como *Ruido Speckle* (Bueno & Campbell, 2002). Una imagen ruidosa, dará lugar a valores bajos de SNR (altos, en el caso del Ruido Speckle). Por ejemplo, en algunos tipos de ruido, como el “*salt & pepper*”, éste suele presentar valores muy extremos de

intensidad, que da lugar a una alta desviación estándar en la imagen, bajando por tanto el valor de la SNR.

- Nitidez o *Sharpness*: Aporta información sobre el contenido en frecuencias altas dentro de la imagen calculado usando la Transformada de Fourier (De & Masilamani, 2013). Cuanto menor es el valor de esta métrica, mayor “emborronamiento” se observará en la imagen y, por tanto, peor será el nivel de detalle o calidad de la misma.
- *SDQI* (del inglés, *Sparsity and Dominant Orientation based Quality Image*): Analiza el gradiente, así como la orientación y contenido de forma local y en toda la imagen, evaluando la estructura y el ruido de ésta, para obtener un valor promedio a partir de los valores locales (Rakhshanfar & Amer, 2018).

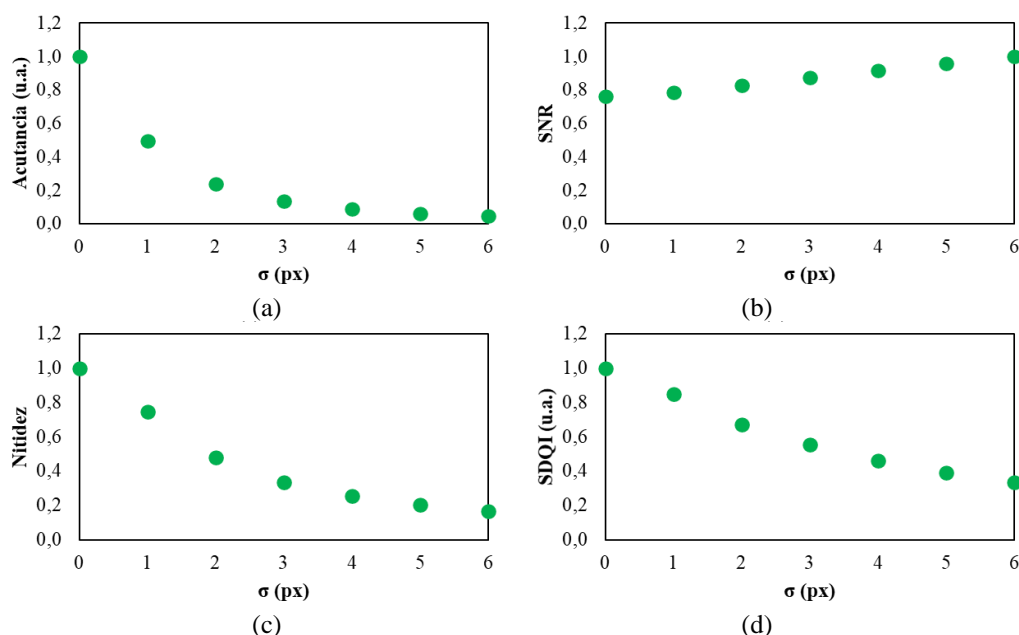
Para analizar el comportamiento de estas métricas con imágenes reales, vamos a utilizar como ejemplo una imagen TPEF real registrada con nuestro microscopio (Figura 2.13a, izquierda). A esta imagen original se le aplicó un filtro gaussiano (Figura 2.13a, derecha), que es eficaz para eliminar ruidos tipo *salt & pepper*, aunque en imágenes sin ruido puede eliminar detalles dando lugar a emborronamiento y degradado. Este filtro se aplicó en la imagen variando el radio de la gaussiana,  $\sigma$ , de forma discreta entre 1 y 6 píxeles (Figura 2.13b) que, aunque reduce el contraste no modifica la intensidad total de la imagen.



**Figura 2.13.** (a) Imágenes original y con filtro gaussiano ( $\sigma = 6$  px) de una muestra de celulosa. (b) Intensidad TPEF total de la imagen en función del parámetro  $\sigma$ .

La Figura 2.14 presenta los valores de las diferentes métricas de calidad de imagen en función del parámetro del filtro gaussiano.

En el caso de la acutancia y la nitidez, los valores disminuyen un 95% y 83% respectivamente. Para la métrica SDQI, el cambio de  $\sigma$ , desde 1 a 6, supone un empeoramiento de la imagen de un 63%. A diferencia de estas tres métricas, la SNR aumenta, lo cual se debe a que una disminución de las frecuencias altas supone una reducción en el contenido en detalles, que suaviza la imagen.



**Figura 2.14.** Variación de las distintas métricas de calidad de imagen en función del parámetro  $\sigma$  del filtro gaussiano: (a) acutancia; (b) SNR; (c) nitidez y (d) SDQI.

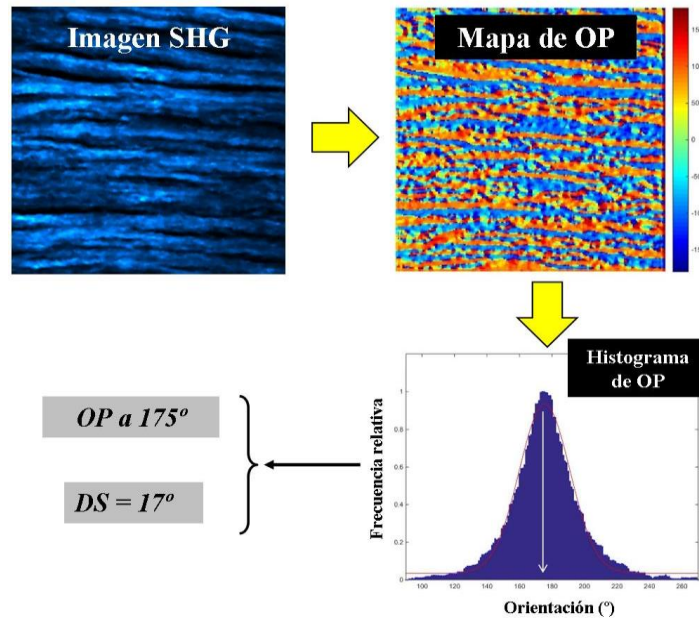
### 2.2.2. Organización de la muestra

Existen diferentes técnicas para estudiar cómo se organizan las fibras en una imagen multifotónica. Entre ellas destacan la Transformada Rápida de Fourier Rápida (FFT, del inglés, *Fast Fourier Transform*) (Batista et al., 2018b; Bueno et al., 2013b; Matteini et al., 2009), el índice de anisotropía (Lombardo et al., 2017), la Transformada de Radon (Mega et al., 2012) o el grado de ondulación (Tan et al., 2013). Aquí se ha optado por utilizar el denominado Tensor de Estructura (TdE) para el estudio de la distribución espacial de las fibras de colágeno en la córnea y la esclera (Ávila & Bueno, 2015). Con estas herramientas se pueden estudiar de forma objetiva si, por ejemplo, una patología corneal produce cambios estructurales en el tejido estromal (Ávila et al., 2019a; Mercatelli et al., 2017; Morishige et al., 2007a; Tan et al., 2006) o si las fibras de la esclera se modifican bajo diferentes condiciones experimentales (ametropía, presión intraocular,...).

El TdE informa sobre la orientación de las fibras píxel a píxel interpretando las escalas de grises de la imagen y calculando las derivadas parciales a lo largo de las direcciones X e Y. A partir del cálculo de los autovalores de la matriz de derivadas parciales se obtienen varios parámetros tales como el Grado de Organización o Isotropía, la Orientación Preferencial (OP) y la Dispersión Estructural (DS). Esta última se obtiene directamente como la desviación estándar del histograma de distribución de OPs.

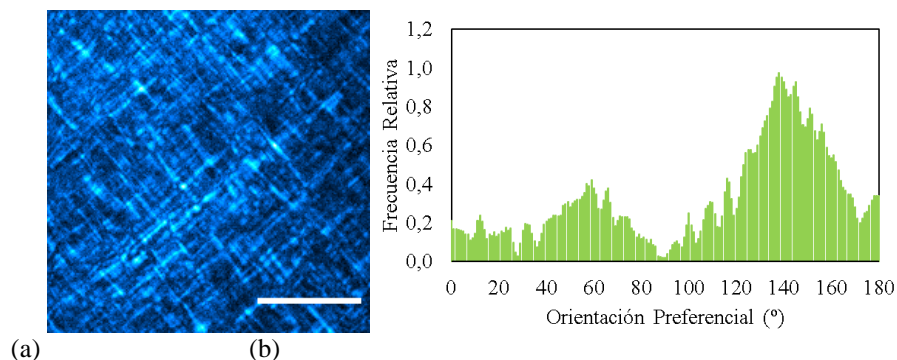
La Figura 2.15 muestra un ejemplo del método donde se ha representado la imagen SHG original, junto con el mapa de OP y el correspondiente histograma de frecuencias relativas de

OP. El valor de la OP se asocia con el pico en el histograma (si es que éste existe). Las fibras de colágeno estarán tanto más ordenadas (es decir, menor SD) cuanto más estrecho sea este pico. El caso extremo es el de un “histograma plano”, que correspondería a una muestra no organizada, donde no existe OP alguna.



**Figura 2.15.** Ejemplo de operación con el TdE sobre una imagen real SHG (corte histológico de una esclera humana). Se muestran también el mapa de OP y el histograma correspondiente, junto con los valores de OP y DS.

Aunque en términos absolutos la determinación de la OP de las fibras dentro de la imagen pueda parecer carente de sentido, si existen más OPs nos aporta una información más precisa de la organización de las fibras en términos relativos. Por ejemplo, en la Figura 2.16 se presenta un caso en el que la imagen SHG de una córnea de águila, donde se distingue que las fibras se organizan en dos direcciones, uno dominante, en torno a 143°, y otro secundario, alrededor de 53°, es decir, fibras perpendiculares entre sí. Por otro lado, los valores de la DS permiten evaluar si las muestras están organizadas, parcialmente organizadas o completamente desorganizadas, tal y como se describe en la Tabla 2.1 (Ávila & Bueno, 2015).



**Figura 2.16.** (a) Imagen SHG de una córnea de águila. (b) Histograma de OP correspondiente. Longitud de la barra de escala: 50  $\mu$ m.

**Tabla 2.1.** Clasificación de estructuras según el valor de DS calculado con el TdE.

Organizada	Organizada parcialmente	Desorganizada
$0^\circ \leq DS \leq 20^\circ$	$20^\circ < DS \leq 40^\circ$	$DS > 40^\circ$

### 2.2.3. Textura de la muestra

Una de las técnicas que destaca en el análisis de estructuras biológicas es la denominada Matriz de Dependencia de Niveles de Gris (GLCM, del inglés *Gray Level Co-occurrence Matrix*) descrita por Haralick en 1973 y relacionada directamente con la textura de la muestra (Haralick et al., 1973). Esencialmente es una herramienta que, dada una dirección en el espacio dentro de una imagen, calcula la frecuencia con la que aparecen dos niveles de gris separados cierta distancia (Figura 2.17). En particular, se determina la relación espacial entre los niveles de gris de la imagen dadas la distancia entre el pixel inicial ( $x_{00}$ ) y un pixel de interés ( $x_{ij}$ ), y la orientación (*offset*). Los parámetros que se obtienen son: energía, contraste, correlación y homogeneidad.

- **Energía** (ASM, del inglés *Angular Second Moment*): Se calcula a partir de la suma de los cuadrados de los elementos de la GLCM ( $p(i,j)$ ) y determina si existe algún nivel de gris dominante. En imágenes donde hay poca diferencia entre los niveles de gris (i.e. imagen con pocos detalles), la energía será baja.

$$Energía = \sum_{i,j} p(i,j)^2. \quad (2.1)$$

- **Contraste**: Aporta información sobre las variaciones locales de niveles de gris en la imagen. Así, en imágenes donde no se visualizan apenas estructuras, el valor es cercano a cero.

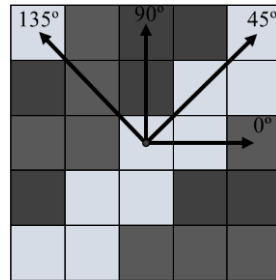
$$Contraste = \sum_{i,j} |i - j|^2 p(i,j). \quad (2.2)$$

- **Correlación**: Analiza la dependencia de los niveles de gris a lo largo de toda la imagen, siendo 1 (correlación positiva) o -1 (correlación negativa) en imágenes donde existan estructuras regulares que se repiten, o nula en imágenes constantes (uniformes). Siendo  $\mu_i$  ( $\mu_j$ ) y  $\sigma_i$  ( $\sigma_j$ ) la media y desviación estándar de las sumas de cada columna  $i$ -ésima (fila  $j$ -ésima) de la GLCM, la correlación se calcula como:

$$Correlación = \sum_{i,j} \frac{(i - \mu_i)(j - \mu_j)p(i,j)}{\sigma_i \sigma_j}. \quad (2.3)$$

- **Homogeneidad**: Como su propio nombre indica, valora el grado de uniformidad de la imagen. Calcula lo cerca que están los elementos de la GLCM a la GLCM diagonal.

$$\text{Homogeneidad} = \sum_{i,j} \frac{p(i,j)}{1 + (i - j)^2}. \quad (2.4)$$



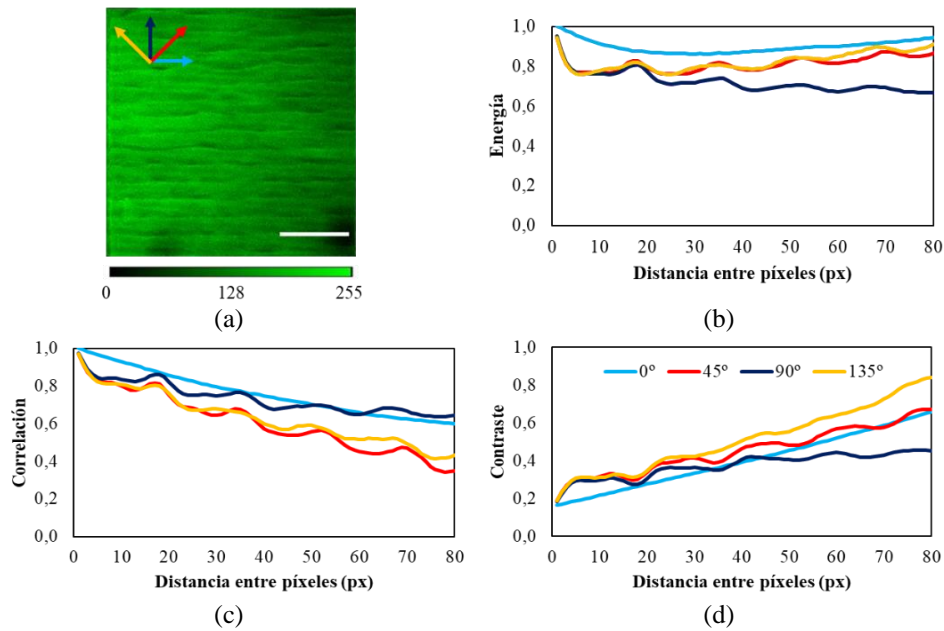
**Figura 2.17.** Esquema de cálculo de la GLCM.

El valor de estos parámetros varía dependiendo de la distancia entre los píxeles de estudio dentro de la imagen. Es por ello importante determinar una norma para unificar la forma de evaluar los resultados de modo que éstos sean lo más fiables posible.

En la Figura 2.18 se muestra cómo varían los parámetros de la GLCM al aumentar la distancia entre los píxeles para una imagen TPEF. En este caso, la imagen (Figura 2.18.a) presenta una estructura regular, con fibras alargadas horizontales y apiladas a lo largo del eje vertical. Por su parte, las gráficas muestran las variaciones de algunos parámetros para 4 direcciones espaciales diferentes (0°, 45°, 90° y 135°) en función de la distancia entre píxeles.

Para todas las direcciones, mientras que la energía (medida de la uniformidad) permanece aproximadamente constante, el contraste y la correlación varían de forma lineal con la distancia entre píxeles (la homogeneidad se comporta de forma similar a la correlación). Los valores de contraste aumentan con la distancia entre los píxeles, indicando que la muestra es más heterogénea con distancias más largas (esto es razonable ya que en entornos pequeños es poco probable encontrar grandes diferencias en los niveles de gris). Al contrario que el contraste, la correlación disminuye con la distancia entre los píxeles (independientemente de la dirección elegida), indicando de nuevo una falta de homogeneidad en la imagen.

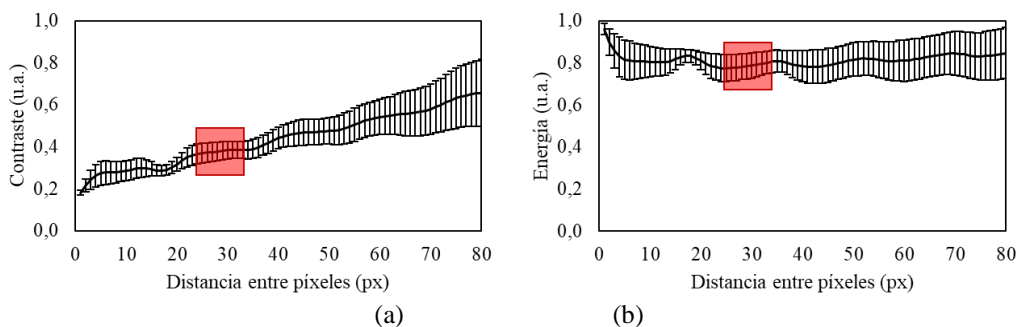
Es de interés destacar que a diferencia de 0°, en las direcciones de 45°, 90° y 135° se observan ondulaciones (picos y valles) que se reparten de forma más o menos regular, lo que indica que cada cierta distancia entre píxeles las estructuras se repiten. Esto es coherente con la distribución de fibras horizontales en la imagen a lo largo de la dirección vertical. Esta capacidad de distinguir fibras será útil para cálculos y análisis adicionales, como se verá en la sección 2.2.4.



**Figura 2.18.** (a) Imagen TPEF con estructuras alargadas horizontales donde se han indicado las 4 direcciones utilizadas en el análisis (0, 45, 90 y 135°). (b-d) Dependencia entre diferentes parámetros proporcionados por la GLCM y la distancia entre los píxeles para cada orientación: (b) energía, (c) correlación, (d) contraste. La muestra corresponde a un corte histológico de cristalino de conejo (escala: 50  $\mu$ m).

Hay que tener en cuenta que los valores de los parámetros de la GLCM que se mostrarán en los capítulos siguientes, serán un promedio de los resultados obtenidos a partir de las distancias entre píxeles en cada una de las direcciones de estudio. Como criterio a utilizar se han elegido las zonas donde las desviaciones estándar son similares. La ventana que se utilizará para caracterizar la textura de las imágenes se muestra en la Figura 2.19 para el contraste y la energía.

La evaluación de las características de textura de la muestra a partir de las imágenes resulta útil para diferenciar cuantitativamente entre tejidos sanos y patológicos (Batista et al., 2018b; Hristu et al., 2018; Teh et al., 2013).



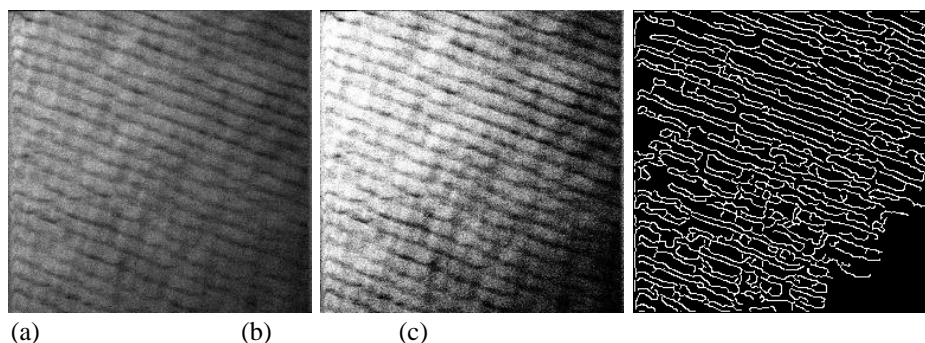
**Figura 2.19.** Valores promedio de contraste (izquierda) y energía (derecha) en función de la distancia entre los píxeles. Las barras de error indican la desviación estándar para cada distancia. Señalada en rojo, se muestra la ventana de datos que se usará en el cálculo del promedio para obtener un único valor en cada parámetro.

### 2.2.4. Densidad de fibras en la muestra

En el apartado anterior se ha explicado el funcionamiento de la GLCM y cómo se aplica a imágenes para estudiar su textura y potencialmente poder llevar a cabo una clasificación objetiva de los tejidos. De los parámetros descritos, el parámetro correlación puede aportar información extra. Si la correlación de una imagen es de 1 o -1, significa que hay una dependencia (positiva o negativa) entre píxeles separados una distancia  $d$ . Es de suponer que, en imágenes de muestras donde aparecen estructuras con fibras, la correlación tendrá un valor en torno a 1 cuando la distancia entre píxeles usada para el cálculo sea similar al tamaño de las fibras. Una vez conocido el tamaño de estas fibras, se podrá determinar otro parámetro esencial para el estudio de tejidos biológicos y que denominamos “densidad de fibras”.

Sin embargo, el cálculo de esta densidad de fibras no depende solamente de la distancia entre píxeles usada para la correlación vía la GLCM, sino también de la orientación de éstas. Teniendo en cuenta esto, el procedimiento para realizar dicho cálculo se describe a continuación.

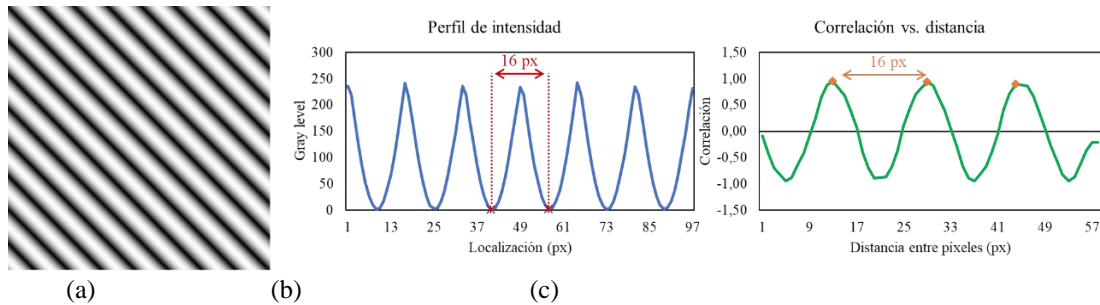
Dada la imagen a estudiar, se procede a estimar la orientación de las fibras. Para ello se usa la Transformada de Hough (TH) (Hough, 1962). Esta TH es una herramienta matemática que permite detectar formas en una imagen (líneas, círculos,...) y resulta particularmente útil para analizar la presencia de fibras en muestras biológicas (Bueno et al., 2020). De forma breve, el algoritmo de la TH genera una matriz de acumulación de dimensiones  $n_\rho \times m_\theta$ , donde las filas corresponden a  $\rho$  y las columnas a  $\theta$ , siendo  $(\rho, \theta)$  las coordenadas polares de la línea (i.e. la fibra) detectada. Información detallada sobre el procedimiento se puede encontrar en (Illingworth & Kittler, 1988). Para una mayor eficiencia del método, previamente se aplica un filtro de detección de bordes (Canny, 1986) como se muestra en la Figura 2.20.



**Figura 2.20.** Ejemplo de filtrado previo de una imagen para determinar la orientación de las fibras presentes y posteriormente su densidad. (a) Imagen TPEF original; (b) imagen con el contraste maximizado; (c) imagen filtrada para dejar únicamente los bordes de las estructuras. Las imágenes tienen dimensiones  $180 \times 180 \mu\text{m}^2$  y corresponden a un corte histológico de un cristalino de conejo.

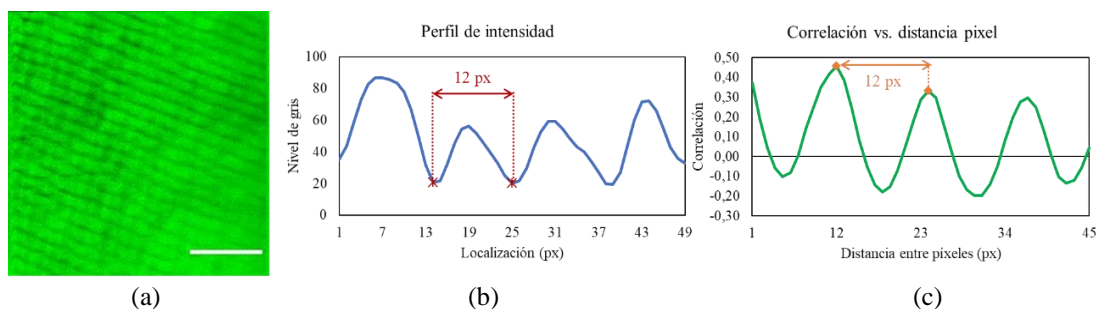


Una vez determinada la orientación de las fibras, se configura la GLCM para que realice el análisis en la dirección perpendicular a las fibras detectadas, con una distancia en píxeles variable. En la Figura 2.21 se muestra una imagen de prueba para testear el *software* desarrollado, junto con su perfil de intensidad y la gráfica de la correlación en función de la distancia entre píxeles.



**Figura 2.21.** Test para detección y estimación del tamaño de las fibras. (a) Imagen de prueba; (b) perfil de intensidad local de la imagen en la dirección perpendicular a las fibras, determinada por la TH; (c) valores de correlación.

En la Figura 2.22 se presenta un ejemplo de aplicación a una imagen TPEF real. Se puede observar la coincidencia entre el tamaño de la fibra mostrado en el perfil de intensidad y el que se obtiene a partir de la correlación.



**Figura 2.22.** Detección de fibras para la estimación del tamaño para el ejemplo de la Figura 2.20. (a) Imagen TPEF; (b) perfil de intensidad local de la imagen; (c) valores de correlación. Barra de escala: 50 $\mu$ m.

La distancia entre mínimos en el perfil de intensidad indica los límites de cada fibra individual. En el caso de la correlación, los picos de gráfica indican que los píxeles separados esa distancia tienen un valor de gris similar (sería 1 si fueran iguales, como en la Figura 2.21c). Los valles de la gráfica, en cambio, indican que los píxeles separados esa distancia son muy diferentes, correlación inversa (sería -1 si los valores de gris correlacionados fueran un máximo y un mínimo, Figura 2.21.c). Por esta razón se opta por localizar los máximos de la función de correlación. En el ejemplo de la Figura 2.22, esta variación de la correlación indica que hay una estructura en la imagen que se va repitiendo cada 12 píxeles, coincidiendo con el tamaño de fibras que se observa al realizar el perfil de intensidad.

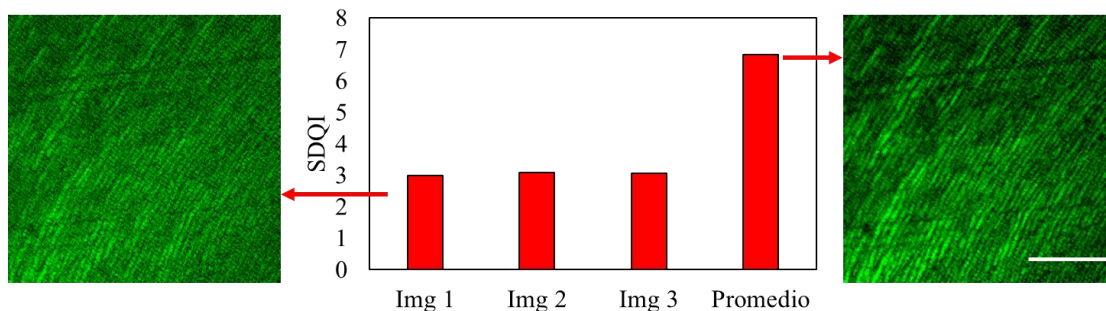
Una vez conocido el tamaño de las fibras y teniendo en cuenta las dimensiones reales de la imagen, se puede estimar fácilmente su densidad (en fibras/mm). Para el caso de la Figura 2.22, la densidad fibrilar correspondiente sería de 119 fibras/mm.

### 2.2.5. Reducción del ruido

Las imágenes de microscopía multifotónica se ven afectadas por las condiciones experimentales y contienen unos niveles de ruido no tolerables (electrónico, fotones no balísticos, etc) que hacen que la calidad de la imagen sea menor que la esperable.

La primera opción para reducir el ruido de las imágenes y aumentar la calidad de éstas es utilizar un promediado de varias imágenes de la misma zona (usando un modo de registro de imágenes individuales secuencial de un único plano de la muestra). Aunque es un método muy utilizado, se ha demostrado que, a partir de cierto número de imágenes promediadas, la calidad se mantiene constante y no aumenta al añadir más (Hunter et al., 2007). En este trabajo, mientras no se aluda expresamente a imágenes individuales, las utilizadas son resultado de promedios de entre 3 y 5 imágenes, dependiendo del tipo de muestra. Debe destacarse que “mínimos desfases” en los espejos del escáner hacen que imágenes sucesivas del mismo plano puedan estar ligeramente desplazadas unas con respecto a otras en la dirección horizontal. Este inconveniente es fácil de solventar durante el procesado mediante una operación de correlación y es preciso tenerlo siempre en cuenta antes del realizar el promediado. Si en lugar de un registro de imágenes de un único plano, se registra un *stack 3D* de imágenes en la dirección Z (caso de muestras gruesas) y varias imágenes para cada profundidad, la reducción del ruido pasa por repetir la operación descrita para cada plano individual.

La Figura 2.23 muestra un ejemplo de cómo influye el promediado en una imagen TPEF. Además de una mera comparación subjetiva entre una imagen individual original (izquierda) y la imagen promedio de 3 individuales (derecha), el uso de la métrica SDQI (gráfica central) aporta información suficiente sobre la mejora de ésta última (siendo algo más del doble).

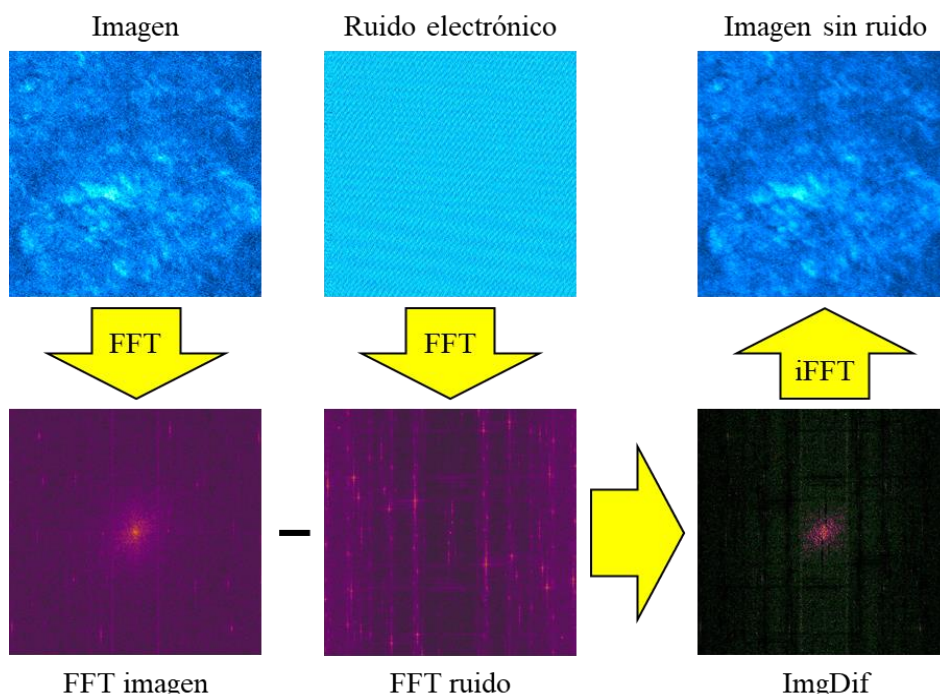


**Figura 2.23.** Imagen TPEF individual (izquierda) e imagen promedio de tres individuales (derecha). La gráfica central representa la métrica SDQI de las 3 imágenes individuales y de la imagen promediada. La escala de color es la misma para ambas imágenes. La muestra corresponde a la dentina de una pieza dental. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

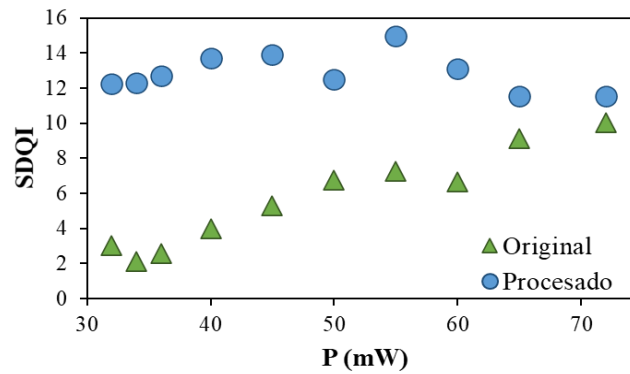
Por otro lado, la contribución del ruido de una imagen se puede estudiar utilizando la FFT. Para su caracterización, el primer paso es determinar si el ruido es periódico (o sea, que se repite de forma similar en todas las imágenes), caso en el que se puede eliminar/minimizar mediante el procedimiento que se describe a continuación. Este método, que puede ser automatizado en ImageJ, es interesante en el registro de imágenes en vivo, pues evita tener que registrar varias imágenes para promediarlas o aumentar el tiempo de registro para reducir el ruido, aunque luego sea necesario invertir tiempo en post-procesado.

En la Figura 2.24, como ejemplo representativo, se muestra una imagen SHG en la que existe cierto ruido electrónico que se aprecia claramente al calcular la FFT (FFT imagen). Por otro lado, manteniendo el obturador cerrado es posible registrar una imagen que contiene únicamente el ruido de fondo (luz residual, ruido electrónico). Al restar las FFTs de ambas imágenes (ImgDif) se elimina la información perteneciente al ruido, aunque es posible que también se pierdan algunos detalles (ya que son frecuencias altas también). A continuación, se realiza la inversa de la FFT (iFFT) que da lugar a la imagen filtrada (Imagen sin ruido).

En la Figura 2.25 se muestra cómo la eliminación del ruido periódico lleva a un aumento de la calidad de imagen. Los resultados corresponden a imágenes multifotónicas registradas con diferente potencia del haz láser incidente.



**Figura 2.24.** Procedimiento para eliminar retirar el ruido electrónico de las imágenes usando la FFT.



**Figura 2.25.** Valores de SDQI para imágenes SHG obtenidas con diferente potencia de entrada. En la figura se comparan los resultados para las imágenes originales y las imágenes procesadas.

### 2.3. Deconvolución ciega marginal

La deconvolución es un proceso de restauración de un objeto a partir de la imagen registrada y la PSF del sistema. El objeto restaurado (o imagen deconvolucionada) será de mayor calidad que la imagen original (mayor contraste y resolución), pudiendo observarse detalles que eran imposibles de detectar en la imagen original.

La deconvolución de imágenes donde se desconoce la PSF se denomina “deconvolución ciega” (del inglés, *blind deconvolution*) (Ayers & Dainty, 1988). También se suele utilizar la denominación “deconvolución miope” (del inglés, *myopic deconvolution*), aunque este término habitualmente se refiere a los casos en los que hay cierta información *a priori* de la PSF (Conan et al., 1998). Esta técnica representa una herramienta valiosa en imágenes biomédicas puesto que permite mejorar la calidad de las imágenes obtenidas sin calibrar el sistema de detección y sin apenas información de éste.

En el caso de microscopía multifotónica, la imagen registrada está afectada principalmente por la contribución de las aberraciones de la propia muestra, sobre todo en las capas más profundas (Bueno, 2014; Skorsetz et al., 2016). Pero, además, dicho registro puede estar también afectado por ruido aditivo procedente tanto del detector como de fotones “no balísticos” (i.e. que no corresponden a la señal que viene de la muestra observada). Además, si la muestra no es estática, sino que las imágenes corresponden a muestras en condiciones en vivo, puede existir cierta degradación extra debida fundamentalmente a pequeños desplazamientos no controlados, como son los movimientos oculares en el caso del ojo o los latidos del corazón en el caso de imágenes del córtex cerebral en modelos animales.

Por tanto, en la situación que concierne a este trabajo el objetivo es restaurar una imagen en la que se desconoce la degradación que ha sufrido. Debido a ello, una de las opciones para reconstruir el objeto original es utilizar una técnica de “deconvolución ciega marginal” (en

inglés *marginal blind deconvolution*) (Blanco & Mugnier, 2011). Este método tiene la ventaja de que permite estimar la PSF y el objeto, sin necesidad de supervisar el procesado.

Según Blanco y Mugnier, en imagen biomédica las técnicas de deconvolución están pensadas para reconstruir/mejorar imágenes individuales 2D a partir de objetos 3D (Blanco & Mugnier, 2011). Así, en un modelo de formación de imagen se tendría que:

$$i_{3D} = h_{3D} \otimes_{3D} o_{3D} + n, \quad (2.5)$$

donde  $h_{3D}$  denota la PSF en 3D y  $n$  el ruido.

Si se asume que el objeto es invariante por traslaciones a lo largo del eje óptico dentro del intervalo de la profundidad de foco del instrumento, planos fuera de esa zona contribuirían a la imagen con un fondo aproximadamente constante (i.e. PSF que tiene un espectro estrecho), y, por tanto:

$$o_{3D} = o_{2D} \cdot \alpha(z), \quad (2.6)$$

siendo  $\alpha(z)$  el flujo normalizado emitido (energía) para cada plano de profundidad  $z$  (i.e. la integral de  $\alpha$  en el intervalo considerado es la unidad).

Teniendo en cuenta las ecuaciones (2.5) y (2.6), se puede demostrar (Blanco & Mugnier, 2011) que la imagen  $i_{2D}$  para una profundidad  $z_j$  determinada es la convolución del objeto  $o_{2D}$  con una PSF 2D global ( $h_{2D}$ ) que es la combinación lineal de PSFs 2D individuales (cada una conjugada con un plano diferente del objeto y siempre dentro de la profundidad de foco) pesadas por el flujo en cada plano.

$$i_{2D} = h_{2D} \otimes o_{2D} + n, \quad (2.7)$$

$$h_{2D} = \sum_j \alpha_j \cdot h_j, \quad (2.8)$$

siendo  $h_j$  la PSF a la profundidad  $z_j$ ,  $\alpha_j = \alpha(z_j)$  y  $n$  el ruido, que es independiente del objeto.

El término deconvolución miope proviene precisamente del hecho de que cada  $\alpha_j$  corresponde a un plano y cada  $h_j$  a una PSF con un valor diferente de desenfoque. Para evitar indeterminaciones, en el problema inverso de deconvolución la PSF en cada iteración ha de ser no negativa y normalizada, con lo cual además ha de verificarse que  $\sum \alpha_j = 1$ . Esto asegura que la “energía” de cada objeto reconstruido se conserva tras cada operación (Robles Arias, 2003).

El objetivo sería por tanto encontrar ambos, la PSF  $h_{2D}$  y el objeto de forma conjunta, procedimiento que como ya se ha dicho se conoce como deconvolución ciega. Sin embargo, como se puede apreciar llegado este punto, hay muchas incógnitas y pocos datos. Además,

varias combinaciones de  $h_j$  podrían dar lugar a varias  $h_{2D}$  que fuesen solución del problema y hay que aplicar por tanto un método de estimación de “máxima verosimilitud” (del inglés *maximum likelihood*).

Con nuestras imágenes multifotónicas podemos simplificar este problema de la siguiente manera. Cuando se dispone de una muestra gruesa, se suelen registrar *stacks* 3D de imágenes 2D. Sin embargo, cada imagen se puede tratar de forma independiente porque debido a la confocalidad inherente, la separación entre planos consecutivos es siempre mayor que la profundidad de foco. En estas condiciones, la imagen registrada ( $i$ ) de un objeto ( $o$ ) se puede expresar como la operación de convolución de la ecuación (2.7) donde se presupone que la PSF ( $h$ ) es la combinación lineal de PSFs (6 en nuestro caso) con diferentes valores de desenfoque, donde las incógnitas son los coeficientes  $\alpha_j$ . Por su parte, la imagen es afectada por un ruido que se puede considerar como gaussiano con varianza  $\sigma$ .

En esencia, el algoritmo utilizado aquí tiene como objetivo encontrar una PSF  $g$  que permite calcular el objeto  $o$  partiendo de

$$\hat{x} = g \otimes i, \quad (2.9)$$

siendo  $\hat{x}$  la imagen restaurada que minimiza el error cuadrático medio (MSE, del inglés *Mean Squared Error*):

$$\varepsilon = E|i - \hat{x}|^2, \quad (2.10)$$

donde  $E$  denota el valor esperado.

Esta  $g$  puede calcularse utilizando el filtro de Wiener (Umbaugh, 2010) que en el espacio de frecuencias se expresa como:

$$G = \frac{H^*}{|H|^2 + \frac{S_n}{S_i}}. \quad (2.11)$$

En esta expresión,  $H$  y  $H^*$  son la FFT de la PSF y su conjugada compleja, respectivamente;  $S_n$  es la densidad espectral de potencia (PSD, del inglés de *power spectral density*) del ruido y  $S_i$  la PSD de la imagen  $i$ . El término  $S_n/S_i$  se puede interpretar como la inversa de la señal-ruido, de tal forma que si es cercano a cero  $S_n/S_i \sim 0$  (ruido mucho menor que la señal), entonces  $G = H^{-1}$  (filtro inverso). Si por el contrario  $S_n/S_i \rightarrow \infty$  entonces  $G \rightarrow 0$ . En esencia, el filtro de Wiener se comporta como un paso banda, en el cual el paso baja está asociado a  $S_n/S_i$  y en paso alta a  $H^{-1}$ . Para cada iteración  $N$ -ésima, la imagen restaurada  $\hat{x}_N$  se podrá calcular realizando la FFT inversa de:

$$\hat{X}_N = G_N \cdot I, \quad (2.12)$$

siendo  $\hat{X}_N$  e  $I$  las FFT de  $\hat{x}_N$  y de la imagen original  $i$  respectivamente. La Figura 2.26 muestra un diagrama del proceso de deconvolución empleado para procesar las imágenes de microscopía multifotónica.

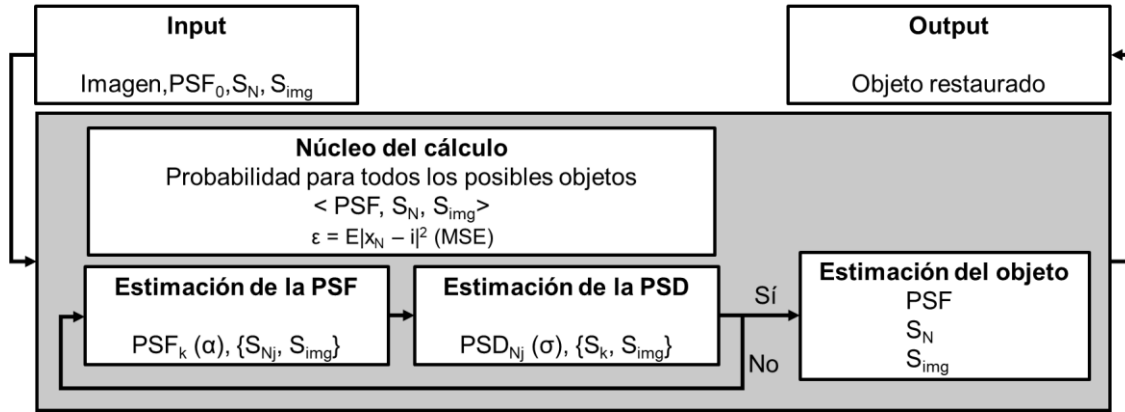


Figura 2.26. Descripción gráfica del proceso de deconvolución.

## 2.4. Muestras utilizadas

Se han empleado muestras tanto biológicas como no biológicas. Además, las imágenes de las muestras biológicas se han registrado en condiciones *ex vivo* (estáticas) y en condiciones *in vivo* (ojo humano).

Las muestras no biológicas han servido para el calibrado inicial del sistema experimental. Se han utilizado muestras de malla de seda y celulosa teñidas con el marcador DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para obtener señal TPEF elevada.

### 2.4.1. Muestras y sujetos

La Tabla 2.2 recoge detalles sobre muestras utilizadas en condiciones *ex vivo*. En la misma se indica si la muestra está teñida o no, el tipo de fijación y el tipo de señal no lineal que emite. Los tejidos oculares humanos fueron donados por el Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia. Los tejidos oculares de los distintos modelos animales fueron cedidos por la Universidad de Tübingen (escleras de pollo), la Universidad de Valladolid (córnea de conejo, pollo y águila), el Departamento de Oftalmología (retinas de ratón y rata), el Departamento de Ciencias Sociosanitarias (cristalinos de conejo) y el Departamento de Anatomía Patológica (tejido anoftálmico) de la UMU. Las córneas de cerdo y bovino se obtuvieron de mataderos locales.

**Tabla 2.2.** Clasificación de los tejidos *ex vivo* utilizados en este trabajo.

<b>Tejido</b>	<b>Tinción</b>	<b>Fijación</b>	<b>Señal MP</b>
Aves			
Córnea de águila	No	No	SHG
Córnea de pollo	No	No	SHG
Esclera de pollo	No	No	SHG
Mamíferos			
Córnea de cerdo	No	No	SHG
Córnea de bovino	No	No	SHG
Córnea de conejo	No	No	SHG
Cristalino de conejo	H&E	Sí	TPEF
Córnea humana	No	Sí	SHG
Esclera humana	No	No	SHG
Retina humana	No	Sí	TPEF
Retina de ratón	No	Sí	TPEF
Retina de rata	No	Sí	TPEF
Tejido anoftálmico	No	Sí	SHG/TPEF
Membrana epirretiniana	No	No	SHG/TPEF

Por su parte, las imágenes multifotónicas obtenidas *in vivo* pertenecen a zonas de la córnea, la esclera y el limbo esclerocorneal, entre otras. Los sujetos involucrados en el estudio eran todos sanos (sin patologías oculares) y participaron de forma voluntaria en este estudio.



# Capítulo 3

## Análisis de los parámetros de registro óptimos

El registro adecuado de una imagen multifotónica depende de multitud de factores, no sólo técnicos sino también asociados al tipo de muestra a estudiar. El equilibrio entre los diferentes parámetros ha de ser tal que la imagen registrada sea de una calidad suficientemente alta como para poder extraer información útil sobre su estructura. Además, si la muestra bajo estudio está en condiciones en vivo, la estabilidad temporal y la ausencia de *fotodaño* son esenciales, lo cual ha de ir ligado a los límites de seguridad establecidos.

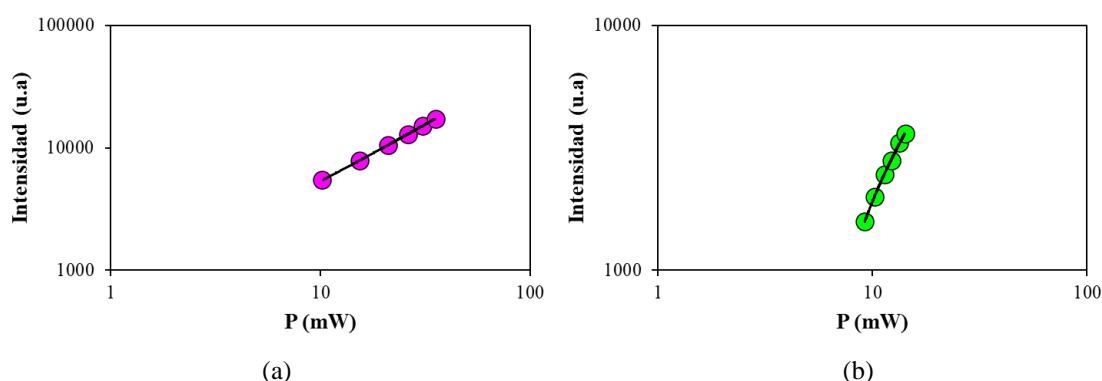
Este capítulo analiza los parámetros que determinan el funcionamiento correcto del microscopio multifotónico en cuanto a la adquisición de imágenes. Explorar estos aspectos es esencial antes de poder usar el instrumento en condiciones en vivo. Es por ello que en este primer bloque de resultados se testeará y pondrá a punto el microscopio, con el objeto de analizar las posibles limitaciones. Para ello se usarán muestras *ex vivo* (i.e. estáticas) y se estudiarán diferentes parámetros que permitan obtener imágenes con calidad optimizada, tales como la velocidad de registro, el tamaño real de la imagen o la resolución.



### 3.1. Detección de señal lineal y no lineal

El sistema experimental es capaz de registrar imágenes tanto en modo no lineal o multifotónico, como en modo lineal (imagen RLI). Mientras que la longitud de onda asociada a la primera está en el rango visible y depende del tipo de señal no lineal detectada (TPEF o SHG), la segunda es netamente infrarroja. Este carácter espectral de la luz registrada es tan importante como la relación entre la potencia del haz de entrada y la intensidad de la señal registrada. Tal es así, que mientras que en las imágenes RLI la relación es lineal, en las multifotónicas esta relación es cuadrática (Hasegawa, 1998).

La Figura 3.1 muestra la relación entre la potencia del láser incidente utilizada y las señales registradas (lineales y no lineales). Las gráficas se han representado en escala logarítmica para una visualización directa de la pendiente de la recta de ajuste. En ambos casos dicho ajuste lineal fue estadísticamente significativo ( $R = 1.00$ ,  $p < 0.0001$ ). Sin embargo, la diferencia fundamental está en la pendiente de la recta, de tal forma que mientras que para la imagen RLI (señal lineal) la pendiente es  $0.93 \pm 0.01$ , para la señal no lineal (TPEF en este caso en concreto) la pendiente es  $1.91 \pm 0.05$ . Ambos valores son cercanos a los nominales, 1 en el primer caso y 2 en el último (Cheng et al., 2014).



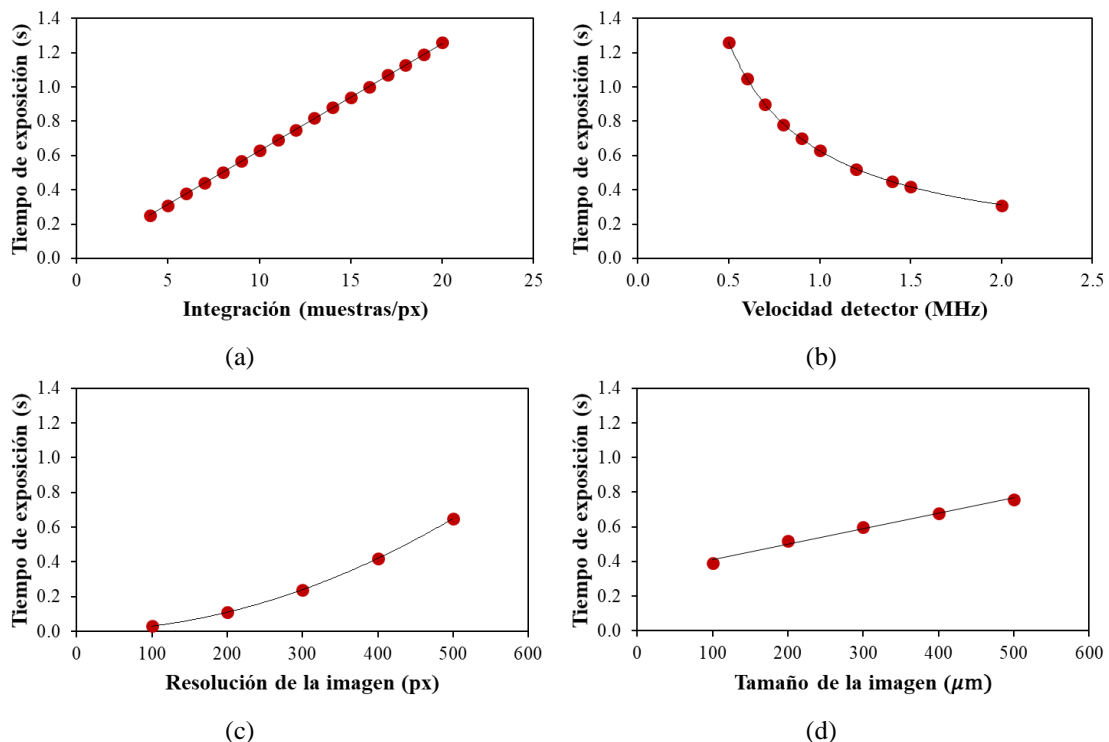
**Figura 3.1.** Dependencia entre la intensidad de la señal registrada y la potencia del láser que ilumina la muestra. (a) Señal lineal RLI integrada en toda la imagen; (b) señal no lineal integrada en toda la imagen TPEF. Para ambos casos se usó una muestra de celulosa.

### 3.2. Parámetros de registro y tiempo de exposición

La determinación de los parámetros de registro óptimos tiene como objetivo global establecer el tiempo mínimo de exposición necesario para registrar una imagen multifotónica con una “buena calidad” según métricas objetivas. Es por ello que la primera tarea será el análisis de la influencia de los diferentes parámetros de registro en este tiempo de exposición, también denominado velocidad de registro. Este tiempo de exposición está determinado por los siguientes factores:

- Integración o frecuencia de muestreo del PMT. Este parámetro se ha variado desde un mínimo de 5 muestras/px hasta un máximo de 20 muestras/px.
- Velocidad de lectura de la PMT. Es el tiempo que se invierte en leer cada muestra tomada. Los valores se han variado en el intervalo entre 0.5 y 2 MHz.
- Resolución de la imagen: extensión de la imagen en  $\text{px}^2$ .
- Tamaño de la imagen: tamaño real de la imagen en  $\mu\text{m}^2$ .

Estos parámetros están relacionados de manera directa con la velocidad de los espejos de la unidad de escaneo y, por ende, con el tiempo que el tejido está expuesto a la luz láser. En la Figura 3.2 se muestra la relación entre el tiempo de exposición invertido en registrar una imagen multifotónica y cada uno de estos parámetros por separado.



**Figura 3.2.** Variación del tiempo de exposición en función de los parámetros de registro de la imagen: (a) integración; (b) velocidad de lectura de la PMT; (c) resolución de la imagen; (d) tamaño real de la imagen. La potencia del láser sobre la muestra (celulosa en este caso) fue siempre constante y de 4.5 mW. Las líneas negras continuas representan el mejor ajuste para cada conjunto de datos.

La Figura 3.2a presenta una relación lineal significativa ( $R = 1.00$ ,  $p < 0.0001$ ) entre la frecuencia de muestreo (o integración) y el tiempo de exposición, manteniendo constantes el resto de las variables (velocidad de lectura de la PMT a 2 MHz, tamaño real de la imagen  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$  y resolución de  $300 \times 300 \text{px}^2$ ). Esta frecuencia de muestreo juega un papel crítico, ya que, para una imagen de tamaño y resolución constante, se puede llegar a aumentar hasta casi 6 veces el tiempo de exposición.

A diferencia de la integración, la relación entre la velocidad de lectura de la PMT y el tiempo de exposición sigue una caída exponencial ( $R = 0.98$ ,  $p < 0.0001$ ). La Figura 3.2b muestra este comportamiento, manteniendo una frecuencia de muestreo constante a 5 muestras/px, con el mismo tamaño de imagen y resolución que en el caso anterior.

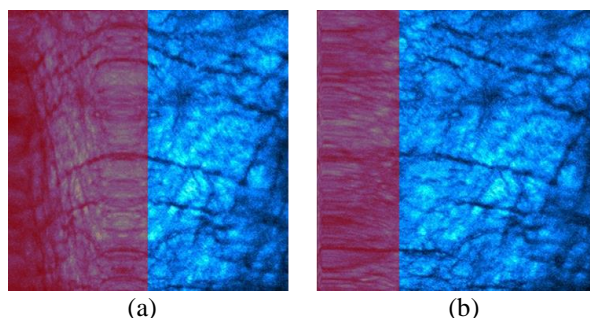
En la Figura 3.2c se muestran los cambios en el tiempo de exposición en función de la resolución de la imagen. La dependencia entre ellos no es lineal, sino cuadrática ( $R = 1.00$ ,  $p < 0.0001$ ). En este caso el tamaño de la imagen se fijó a  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ , la lectura de la PMT a 2 MHz y la integración a 5 muestras/px.

Entre el tamaño de la imagen (para una resolución de  $300 \times 300 \text{ px}^2$ ) y el tiempo de exposición hay una relación lineal (Figura 3.2d). En particular, para un registro de 8 muestras/px a 2 MHz, el paso de una imagen de  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  y otra de  $500 \times 500 \mu\text{m}^2$  hace que el tiempo de exposición se duplique (de 0.4 a 0.8 s, aproximadamente).

### 3.3. Distorsión en la imagen por acción del escáner

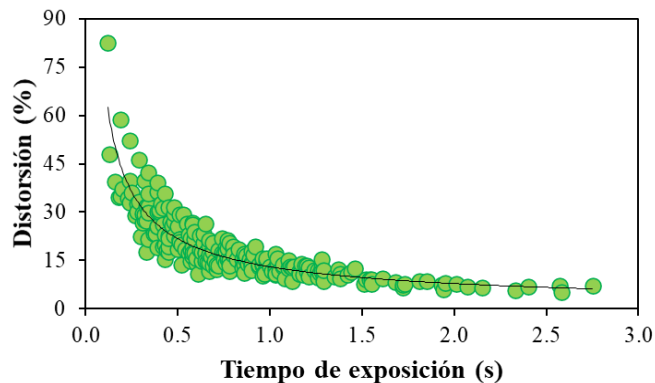
La velocidad de los espejos que forman la unidad de escaneo junto con la sincronización en la detección del PMT determinan que el registro de una imagen sea correcto. Sin embargo, la inercia de los espejos en su movimiento y el “retorno” de éstos a la posición original de barrido (en la dirección X) puede provocar que en la imagen aparezca una “zona no útil” que trae consigo una reducción en el “tamaño efectivo” (u operativo) de la imagen registrada.

El *software* que controla el sistema experimental permite corregir parcialmente esta inercia reduciendo esta “zona no útil”, aunque aumentando levemente el tiempo del registro. Un ejemplo de esto se muestra en la Figura 3.3, donde la distorsión de la imagen sin corregir (Figura 3.3a) es de aproximadamente el 50% con un tiempo de registro de 0.26 s, mientras que al aplicar el factor de corrección (Figura 3.3b), manteniendo constantes los parámetros de registro (velocidad de detección, registro, tamaño de imagen y resolución) la distorsión pasa a ser del 25% y el tiempo de registro de 0.37 s.



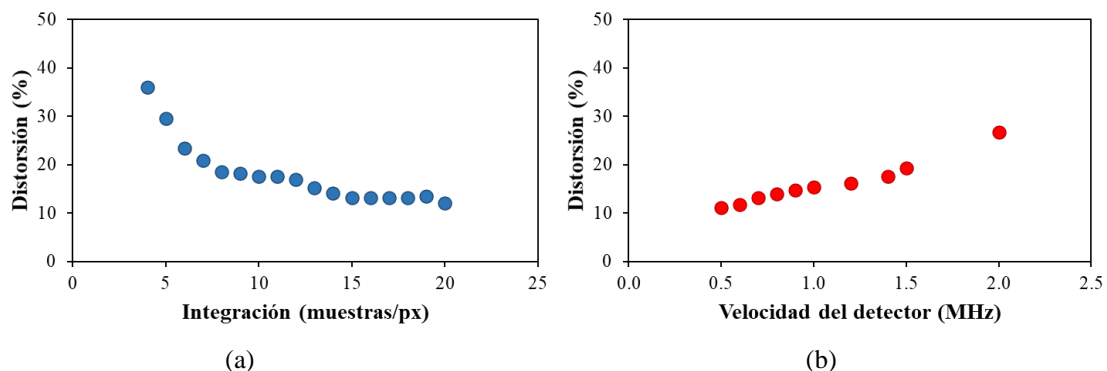
**Figura 3.3.** Imágenes SHG registradas en las mismas condiciones experimentales (a) con corrección y (b) sin corrección de la inercia de los espejos.

Esta corrección se aplica a todas las imágenes de forma sistemática, con el objeto de reducir la distorsión inicial y optimizar el tiempo de registro modificando el resto de los parámetros definidos previamente. La Figura 3.4 representa la relación entre el tiempo de exposición y el tamaño de la zona distorsionada (en % con respecto al tamaño total de la imagen). Los datos de la gráfica incluyen todas las condiciones experimentales de la Figura 3.2. De forma general, se observa una relación inversa: cuanto mayor es el tiempo de exposición, menor será la zona afectada por la distorsión de la que no se extrae información.



**Figura 3.4.** Distorsión de la imagen (zona no útil vs. tamaño total de la imagen, en %) en función del tiempo de exposición usado para registrar la imagen. La línea continua se corresponde con el menor ajuste:  $y = a \cdot x^b$ ,  $a = 13.40 \pm 0.33$ ,  $b = -0.72 \pm 0.02$ ,  $R = 0.90$ ;  $p < 0.0001$ .

Para un estudio más en profundidad de esta limitación, se ha estimado cómo es la relación entre la zona de distorsión y los parámetros de registro dependientes del detector (frecuencia muestreo y velocidad de lectura), manteniendo constante el tamaño y la resolución de la imagen ( $180 \times 180 \mu\text{m}^2$  y  $300 \times 300 \text{px}^2$ ). Los resultados se muestran en la Figura 3.5.

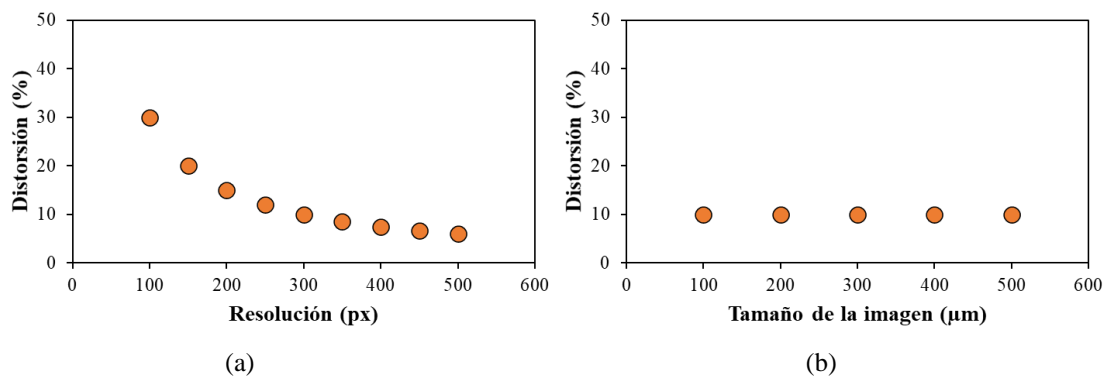


**Figura 3.5.** Relación de la zona de distorsión (% del tamaño total de la imagen) en función del número de muestras integradas (a) y la velocidad de lectura del detector (b).

Fijada la velocidad de lectura a su máximo (2 MHz), a partir de una integración mayor de 8 muestras/px (Figura 3.5a) la distorsión permanece aproximadamente constante (en  $15 \pm 2\%$ ). Esto indica que, a pesar de que el tiempo de exposición aumente con el número de muestras integradas por píxel, la distorsión prácticamente se estabiliza, lo cual es ventajoso para

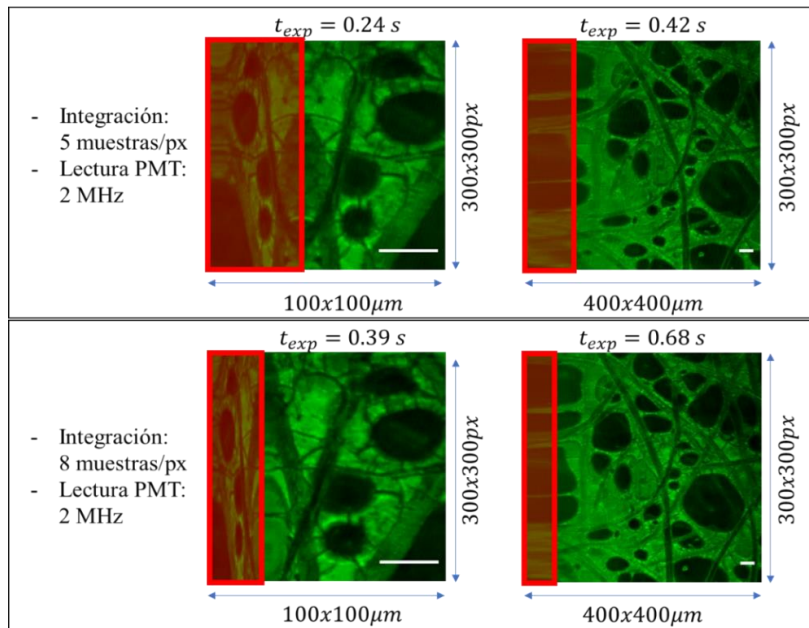
optimizar la adquisición. Por otro lado, manteniendo constante el número de muestras integradas por píxel (5 muestras/px en este caso) y variando la velocidad de lectura del PMT, la distorsión aumenta de forma lineal (Figura 3.5b, ajuste lineal,  $R = 0.98$ ,  $p < 0.0001$ ). Aunque, en estas condiciones, un valor 0.5 MHz proporciona un mínimo en la zona de distorsión, esta velocidad de adquisición va asociada a un tiempo de exposición mayor de 1 s, como ya se ha visto en la Figura 3.2b.

Al modificar la resolución de la imagen, la distorsión también se ve afectada. Por ejemplo, con una imagen de  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ , un valor de 8 muestras/px y velocidad del detector de 1 MHz, se observa una reducción de la zona distorsionada con el aumento de la resolución de la imagen (Figura 3.6a). El número de píxeles total que contribuyen a la distorsión es el mismo en cada uno de los casos del ejemplo (30 px), pero su proporción respecto al tamaño total de la imagen sí que disminuye. En el caso del tamaño de la imagen, no existe gran variación de la distorsión. Por ejemplo, para una imagen de  $300 \times 300 \text{ px}^2$ , un valor de integración de 8 muestras/px y velocidad del detector de 1 MHz, el valor de distorsión se mantiene constante al variar el tamaño de la imagen, ya que el número de píxeles afectados por la distorsión es siempre el mismo, 30 px (que representa un 10% de las imágenes en este caso; Figura 3.6b).



**Figura 3.6.** Relación de la zona de distorsión en función de la resolución (a, con un tamaño de la imagen fijado  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ ) y del tamaño total de la imagen (b, para una resolución de  $300 \times 300 \text{ px}^2$ ). En ambos casos se usó una integración de 8 muestras/px y una velocidad de la PMT de 1 MHz.

Para visualizar el efecto de la distorsión, la Figura 3.7 presenta ejemplos representativos de una imagen TPEF donde se puede observar directamente cómo la zona de distorsión (marcada en rojo) se ve afectada con los diferentes parámetros, manteniendo fijo el tamaño de la imagen en píxeles y la velocidad de lectura.

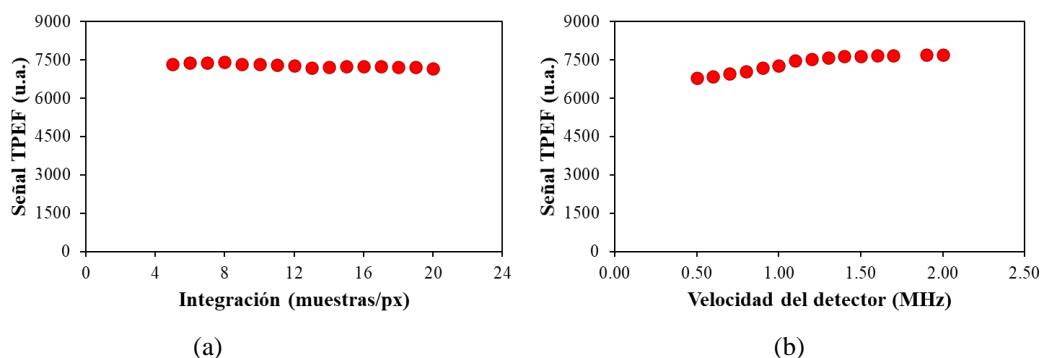


**Figura 3.7.** Ejemplo que muestra el tamaño de la zona distorsionada de una imagen TPEF en función de los diferentes parámetros de registro.

### 3.4. Parámetros de registro y señal multifotónica

Hasta ahora se ha analizado cómo influyen los parámetros de registro en el tiempo de exposición y en la zona de distorsión de la imagen. Sin embargo, es también importante conocer cómo influyen éstos en los niveles de señal no lineal que se registran, pues son estos los que van a determinar que en una imagen se puedan observar estructuras y por tanto ésta sea viable para extraer información.

La Figura 3.8 muestra la constancia en la señal TPEF registrada por el detector al cambiar de forma independiente la integración (Figura 3.8a, velocidad: 2 MHz) y la velocidad de lectura de la PMT (Figura 3.8b, integración: 10 muestras/px) manteniendo constante la resolución y el tamaño de las imágenes TPEF ( $200 \times 200 \text{ px}^2$  y  $100 \times 100 \text{ μm}^2$ , respectivamente).

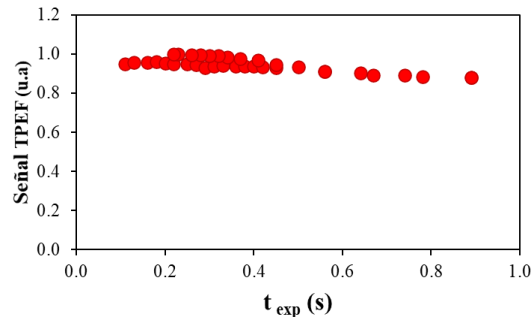


**Figura 3.8.** Variación de la señal TPEF en función de la integración (a) y la velocidad de detector (b).

Puesto que estos cambios en integración y velocidad de registro modifican el tiempo de exposición (Figura 3.2), en la Figura 3.9 se combinan los datos de la figura precedente para



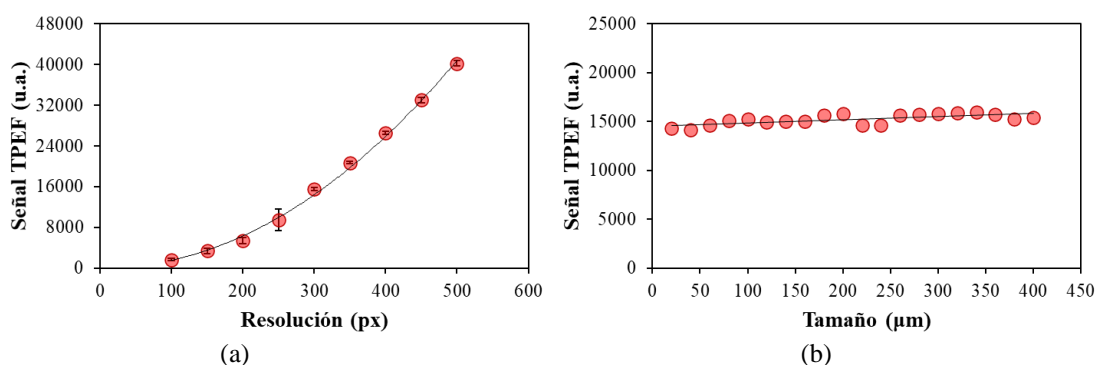
mostrar la relación entre el tiempo de exposición y la señal TPEF (normalizada para una mejor visualización). Como es de esperar, fijados el tamaño de la imagen y su resolución, las variaciones en la señal TPEF detectada son mínimas al cambiar el tiempo de registro (valor medio =  $0.94 \pm 0.04$ ).



**Figura 3.9.** Variación de la señal TPEF en función del tiempo de exposición manteniendo la resolución de la imagen y el tamaño constante.

Que no existan variaciones importantes en la señal con estos parámetros de registro es un resultado interesante, puesto que, aunque éstos influyen en la distorsión que se produce en las imágenes (Figura 3.4), será posible combinarlos para reducir el tiempo de exposición si es necesario, sin que la señal registrada se vea afectada.

De forma opuesta a lo mostrado en las Figura 3.8 y 3.9, los cambios en la señal no lineal tienen lugar con el aumento de la resolución (Figura 3.10a) y éstos que se ajustan a una parábola ( $R = 0.99$ ,  $p < 0.0001$ ). Es por ello que comparaciones directas de señales multifotónicas entre imágenes solamente se debe hacer si éstas tienen el mismo tamaño en píxeles. En este caso, los valores presentados corresponden a la media para cuatro tamaños de imagen diferentes ( $100 \times 100$ ,  $200 \times 200$ ,  $300 \times 300$  y  $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ ), manteniendo fija la integración (10 muestras/px) y la velocidad de lectura del detector (1 MHz). Por el contrario, el aumento del tamaño de la imagen registrada mantenido fija la resolución ( $300 \times 300 \text{ px}^2$ ) no trae consigo cambio notable en la señal detectada (Figura 3.10b, 10 muestras/px, 1 MHz).



**Figura 3.10.** Variación de la señal TPEF en función de la resolución (a) y el tamaño de imagen (b). Las líneas representan los mejores ajustes a los datos.

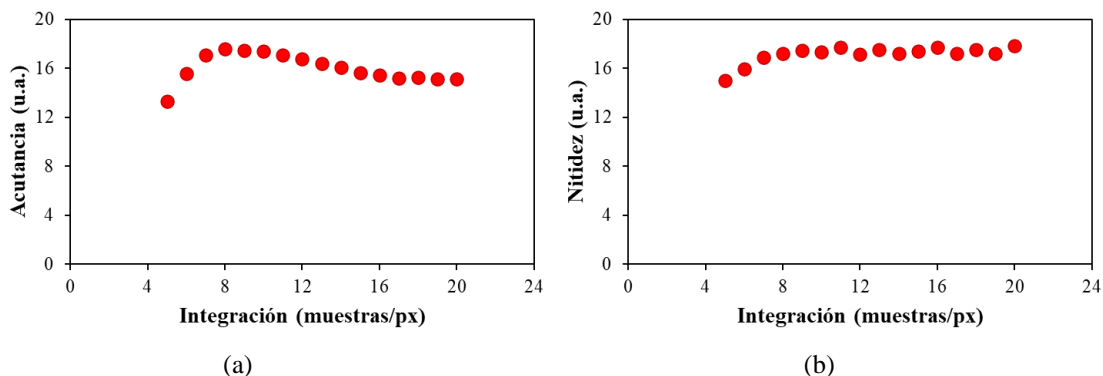
### 3.5. Parámetros de registro y calidad de imagen

En una imagen multifotónica, un aumento global de la señal no implica que ésta sea de mejor calidad (Stanciu et al., 2017). Puesto que de cada imagen es preciso extraer información estructural, es crítico que la calidad de ésta sea lo suficientemente alta y que, en aplicaciones en vivo, el tiempo de exposición necesario para registrarla no sobrepase los límites de seguridad y estabilidad.

En ese sentido y de forma similar a lo que se ha hecho para la señal no lineal en el apartado anterior, en esta sección se evalúa la calidad de imagen registrada en función de los diferentes parámetros de registro.

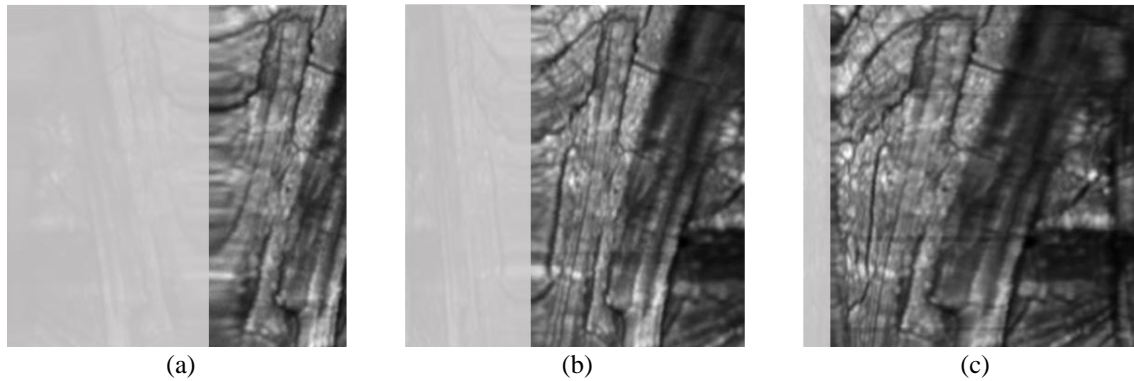
#### *Integración (frecuencia de muestreo)*

La Figura 3.11 muestra las variaciones en acutancia y nitidez en función de los valores de integración manteniendo el resto de los parámetros fijos. Hasta una integración de 8 muestras/px se observa un ligero aumento tanto de la acutancia como de la nitidez. A partir de ese punto ambas métricas presentan un valor aproximadamente constante independientemente de que el número de muestras/px aumente. La SNR y la SDQI se comportan de forma similar.



**Figura 3.11.** Variación de la calidad de imagen en función del valor de integración para imágenes de  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  y  $200 \times 200 \text{px}^2$ , adquiridas a 2 MHz.

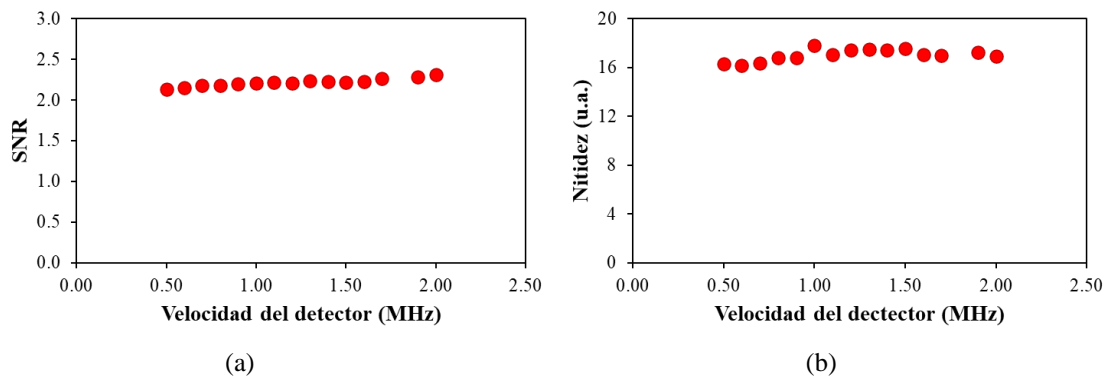
Para valores de integración de 5 ( $t_{\text{exp}}=0.11$  s), 8 ( $t_{\text{exp}}=0.18$  s) y 20 muestras/px ( $t_{\text{exp}}=0.45$  s) la Figura 3.12 presenta una comparación visual entre imágenes. En ellas se puede apreciar la reducción de la zona de distorsión debido al correspondiente aumento del tiempo de exposición estrechamente ligado al valor de integración de la PMT (véase también la Figura 3.5).



**Figura 3.12.** Imágenes registradas con diferentes valores de integración: 5 (a), 8 (b) y 20 muestras/px (c). El tamaño y zona de registro de las imágenes es el mismo para todas las imágenes:  $200 \times 200 \text{ px}^2$  y  $100 \times 100 \text{ }\mu\text{m}^2$  respectivamente. Velocidad del detector: 2 MHz.

### Velocidad de detección

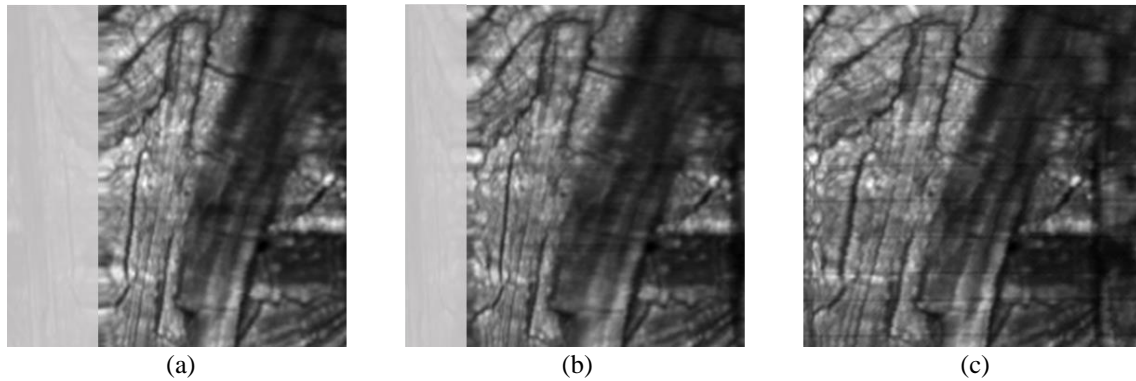
En la Figura 3.13 se recogen los cambios en la calidad de imagen al variar únicamente la velocidad de lectura del detector, para lo cual se ha mantenido constante el tamaño de la imagen ( $100 \times 100 \text{ }\mu\text{m}^2$ ), la resolución ( $200 \times 200 \text{ px}^2$ ) y el número de muestras integradas para cada píxel (10 muestras/px).



**Figura 3.13.** Parámetros de calidad de imagen en función de la velocidad de adquisición de la PMT: SNR (a) y nitidez (b). Las imágenes registradas tienen la misma resolución y tamaño, así como el mismo número de muestras integradas para cada píxel (véase el texto).

Los resultados muestran que la velocidad de lectura no modifica significativamente la calidad de las imágenes. Este mismo comportamiento se encontró con la señal multifotónica (Figura 3.8). Esto es ventajoso, porque el cambio en el tiempo de exposición ligado a la frecuencia de detección no tendrá, por tanto, un efecto notable en la calidad de la imagen obtenida.

Sin embargo, este parámetro sí influye en la zona de distorsión de las imágenes pues éste aumenta de forma lineal con el tiempo de exposición de las imágenes (Figura 3.5b). Para frecuencias de lectura de 2 ( $t_{\text{exp}}=0.22 \text{ s}$ ), 1.5 ( $t_{\text{exp}}=0.30 \text{ s}$ ) y 0.5 MHz ( $t_{\text{exp}}=0.89 \text{ s}$ ) la Figura 3.14 muestra las correspondientes imágenes registradas. Se observa que para el valor más bajo de lectura (0.5 MHz), la zona de distorsión es mínima.

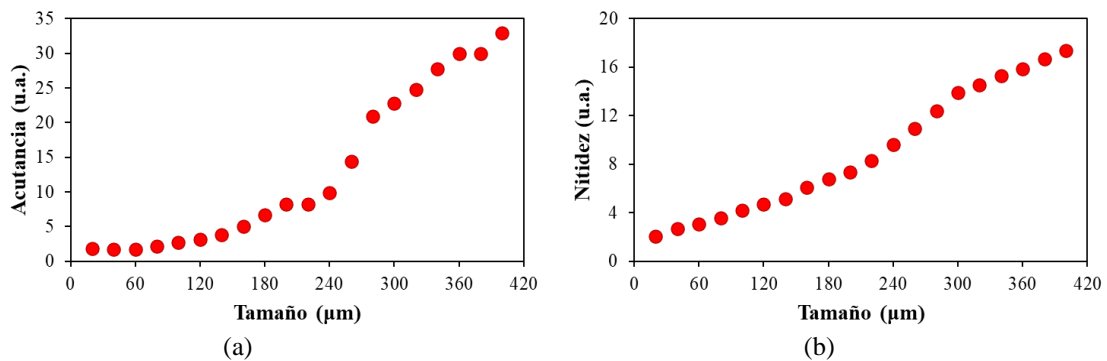


**Figura 3.14.** Imágenes registradas con diferentes frecuencias de detección: 2 (a), 1.5 (b) y 0.5 MHz (c). La integración, la resolución y el tamaño de las imágenes fueron 10 muestras/px, 200x200 px<sup>2</sup> y 100x100 μm<sup>2</sup> respectivamente.

### Tamaño de las imágenes

Cuando el tamaño real de las imágenes es el que varía (manteniendo constantes el valor de integración y la velocidad de lectura del detector) el comportamiento de las métricas es diferente. La Figura 3.15 presenta la acutancia y la nitidez en función de dicho tamaño, para una resolución fija de 300x300 px<sup>2</sup>.

Con estas condiciones experimentales los valores de ambas métricas aumentan con el tamaño de la imagen. La razón de esto estriba en que imágenes de mayor tamaño podrían presentar zonas menos homogéneas (véase por ejemplo la Figura 3.7) donde las diferencias entre niveles de grises (heterogeneidad) hace que el valor de la métrica sea superior. Áreas más pequeñas serían más uniformes (mayor homogeneidad) y por tanto el valor de la métrica se reducirá.

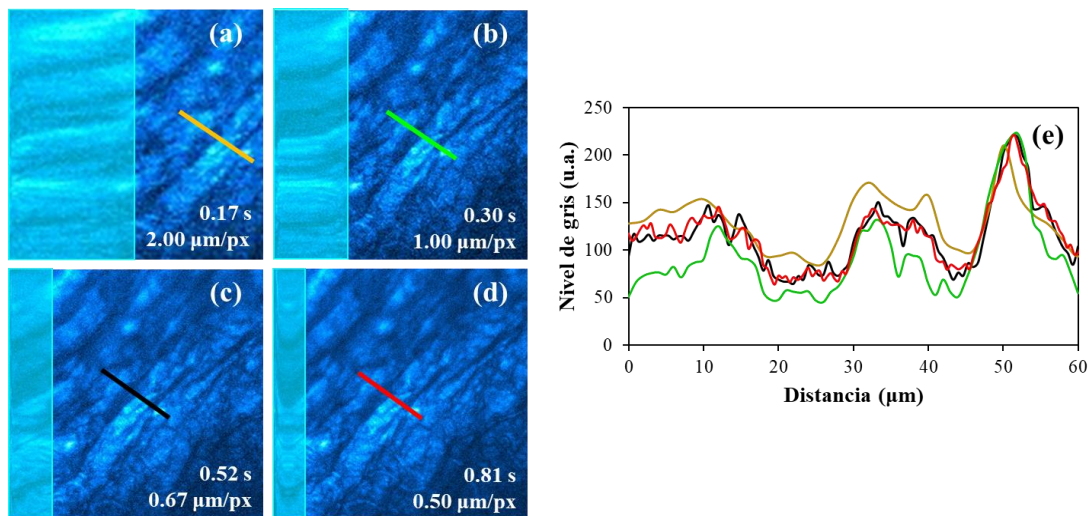


**Figura 3.15.** Acutancia y nitidez en función del tamaño real de la imagen para una resolución de 300x300 px<sup>2</sup>. Todas las imágenes fueron adquiridas con los mismos parámetros de registro (ver texto).

### Resolución de las imágenes

Otro parámetro a tener en cuenta es la resolución de las imágenes. Así, por ejemplo, resoluciones bajas (i.e. menor número de píxeles por imagen), nos permiten reducir el tiempo de registro (Figura 3.2c), aunque si se reduce demasiado nos arriesgamos a perder detalles de interés. En la Figura 3.16 se muestran las imágenes de una misma zona en una muestra de

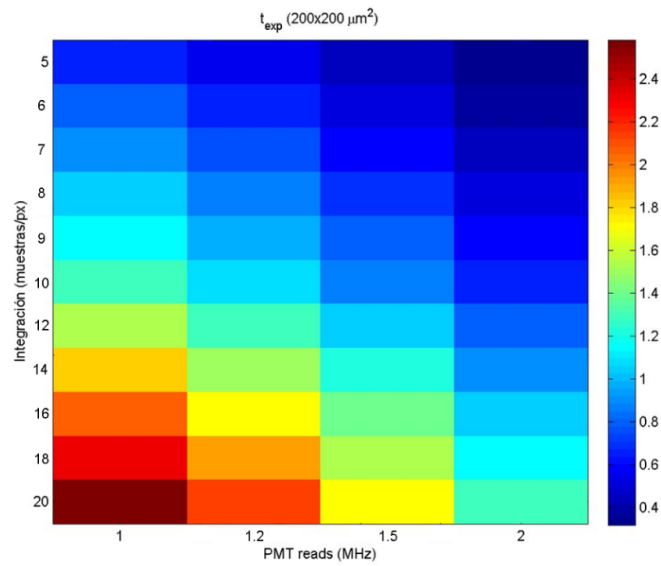
esclera humana en condiciones *ex vivo* con diferente resolución:  $100 \times 100 \text{ px}^2$ ,  $200 \times 200 \text{ px}^2$ ,  $300 \times 300 \text{ px}^2$  y  $400 \times 400 \text{ px}^2$ , el resto de los parámetros de registro permanecen constantes: tamaño de imagen de  $200 \times 200 \text{ }\mu\text{m}^2$ , velocidad de detección de 2 MHz e integración de 8 muestras/px, con tiempos de exposición que varían desde 0.17 s hasta 0.81 s. Los perfiles de las zonas marcadas sobre las imágenes se representan en la gráfica de la derecha (Figura 3.16e). Aunque el aumento de la calidad es evidente, sobre todo al comparar con la imagen de  $100 \times 100 \text{ px}^2$ , donde directamente las estructuras parecen tener mayor tamaño debido al submuestreo (línea dorada del perfil). Se puede comprobar cómo, para resoluciones por debajo de  $1 \text{ }\mu\text{m}/\text{px}$  (Figura 3.16c y 3.16d), no existe cambios drásticos en la forma de las estructuras observadas, aunque, evidentemente, dentro de estas estructuras se pueden llegar a resolver más detalles. Además, en dichas imágenes se puede observar también cómo disminuye la distorsión (que pasa del 48% al 10 %) con tiempos de exposición por debajo de 1 s. Por tanto, llegado el momento, si fuera necesario, podría disminuirse la resolución de las imágenes, reduciendo así el tiempo de exposición, siempre dentro de los límites para evitar tanto el submuestreo como las distorsiones grandes.



**Figura 3.16.** Imágenes SHG registradas con diferentes resoluciones:  $100 \times 100 \text{ px}^2$  (a),  $200 \times 200 \text{ px}^2$  (b),  $300 \times 300 \text{ px}^2$  (c),  $400 \times 400 \text{ px}^2$  (d) y representación gráfica de los perfiles de intensidad de las zonas marcadas sobre las imágenes (e). La integración, la velocidad del detector y el tamaño de las imágenes fueron 8 muestras/px, 2 MHz y  $200 \times 200 \text{ }\mu\text{m}^2$  respectivamente.

### Combinación de parámetros

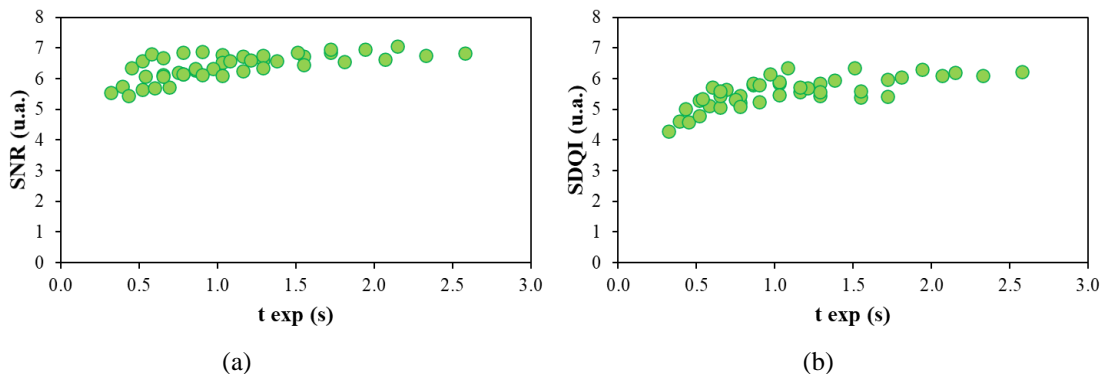
Para saber la combinación de parámetros permite obtener imágenes con la mejor calidad posible utilizando el mínimo tiempo de exposición se registraron imágenes combinando la velocidad de lectura del detector (1, 1.2, 1.5 y 2 MHz) y el valor de la integración (5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 muestras/px). Se ha estudiado la calidad de imagen para una resolución de  $300 \times 300 \text{ px}^2$  y dos tamaños distintos ( $100 \times 100 \text{ }\mu\text{m}^2$  y  $200 \times 200 \text{ }\mu\text{m}^2$ ).



**Figura 3.17.** Tiempo de exposición necesario para el registro de imagen en función del valor de integración y la velocidad del detector.

La Figura 3.17 muestra el tiempo de exposición (imágenes de  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$  con  $300 \times 300 \text{px}^2$ ) para las combinaciones de velocidad de lectura y número de muestras integradas para cada píxel. El rango de colores va desde los azules (0.32 s) donde la distorsión es máxima ( $\sim 24\%$ ) hasta los rojos (2.59 s) donde es mínima ( $\sim 8\%$ ). Para imágenes de  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ , los tiempos estarían en el rango entre 0.16 s y 1.93 s.

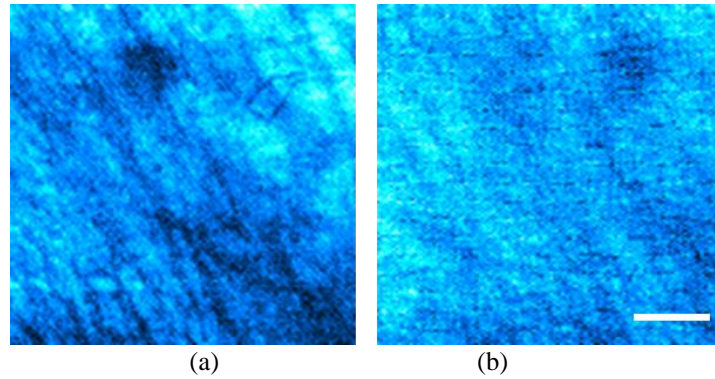
Para cada imagen se calcularon los valores correspondientes de las métricas de calidad. En la Figura 3.18 se presentan los resultados para la SDQI y la SNR. Como ya se indicó anteriormente, un mayor tiempo invertido en el registro de la imagen no significa necesariamente una mayor calidad. Aunque con tiempos de exposición muy cortos, esto podría llegar a afectar.



**Figura 3.18.** Parámetros de calidad de imagen en función del tiempo de exposición.

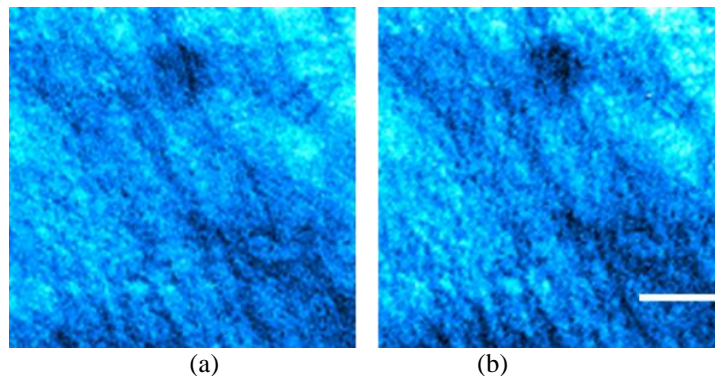
A modo de ejemplo, en la Figura 3.19 se pueden observar imágenes SHG con SNR máximo y mínimo. Los tiempos de registro (distorsión en %) para dichas imágenes fueron respectivamente 2.15 s (4 %) y 0.43 s (15 %).





**Figura 3.19.** (a) Imagen SHG con SNR máxima (20 muestras/px, 1.2 MHz) y SNR mínimo (5 muestras/px, 1.5 MHz). La muestra corresponde a una membrana epirretiniana humana. Escala: 25  $\mu\text{m}$ .

Para tiempos por debajo de 1 s, además de la calidad de imagen, es necesario tener en cuenta los valores de distorsión (véase Figura 3.3). Así, la Figura 3.20 muestra las imágenes con máximo valor de SDQI y SNR registradas en menos de 1 s (0.97 y 0.90 s), donde las zonas de distorsión se corresponden con un 7 y un 8 % respectivamente. Se puede apreciar que ambas imágenes son similares, a pesar de que la métrica maximizada es diferente.



**Figura 3.20.** (a) Imagen con SDQI máximo (9 muestras/px, 1.5 MHz); imagen con SNR máxima (14 muestras/px, 2 MHz). Escala: 25  $\mu\text{m}$ .

### 3.6. Discusión

En esencia, la clave del proceso está en establecer el tiempo de exposición mínimo a partir del cual, la imagen con una resolución y tamaño determinados aporte la máxima información. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la mayor limitación es que este tiempo de exposición está estrechamente ligado a la distorsión que se produce en la imagen registrada.

Fijados un tamaño y una resolución, el efecto de los diferentes parámetros de registro en el tiempo de exposición difiere, aunque la mayor influencia recae sobre la velocidad del detector (Figura 3.2). Un aumento en dicha velocidad reduce el tiempo de exposición, pero a su vez aumenta la distorsión (Figura 3.3 y Figura 3.5). Por su parte, el tiempo de exposición crece con la integración, aunque la distorsión permanece moderadamente constante a partir de 8 muestras/px. A su vez, manteniendo constantes tanto el número de muestras integradas como

la velocidad del detector, encontramos que, a pesar de que una reducción de la resolución reduciría el tiempo de exposición (Figura 3.2c), el número de píxeles que forman la zona distorsionada es constante, pero, en proporción al tamaño total, la distorsión aumenta (Figura 3.6a). Por otro lado, el tamaño de la imagen también influye en el tiempo de exposición (Figura 3.2d), aunque la distorsión permanece constante (Figura 3.6b), esto quiere decir que, si fuera necesario reducir el tiempo de exposición sería posible hacerlo disminuyendo el tamaño de la imagen, sin afectar en gran medida a la zona de distorsión de la imagen, aumentando, a su vez, la resolución. Según los resultados mostrados, para imágenes de  $200 \times 200 \text{ px}^2$  y  $300 \times 300 \text{ px}^2$  es posible obtener imágenes con tiempos de exposición menores de 1 s y distorsión reducida al combinar el resto de los parámetros.

La señal multifotónica prácticamente no varía con el tiempo de exposición, cuando éste se modifica vía la integración, la velocidad de registro de la PMT y/o el tamaño de la imagen (Figura 3.9 y Figura 3.10b). Sin embargo, el cambio en la resolución muestra una dependencia cuadrática (Figura 3.10a). Por su parte, la calidad de imagen tampoco cambia con la velocidad de registro ni para integraciones mayores de 8 muestras/px (Figura 3.11 y Figura 3.13), aunque sí lo hace con la resolución o el tamaño (Figura 3.15). Tal es así, que, para resolución y tamaños prefijados, tiempos por encima de 1 s (vía cambios en la velocidad de registro o integración) no consiguen que la calidad de la imagen aumente (Figura 3.18). Teniendo todos estos factores en cuenta, se puede decir que, por ejemplo, para una imagen de  $200 \times 200 \text{ } \mu\text{m}^2$ , con una resolución de  $300 \times 300 \text{ px}^2$ , registrada a 2 MHz e integrando 5 muestras/px, el tiempo de exposición es de 0.32 s y la distorsión asociada de un 20% del tamaño total. Si para registrar dicha imagen la integración sube a 8 muestras/px, el tiempo de exposición sería de 0.45 s, la distorsión de un 10 % y la zona útil de la imagen sería de  $180 \times 180 \text{ } \mu\text{m}^2$ .

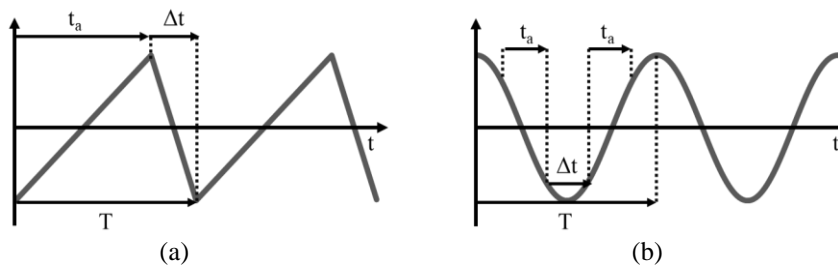
Por el otro lado, si se quisiera llegar a una distorsión aproximada de un 10% modificando la velocidad de lectura de la PMT en lugar de la integración, habría que bajar hasta los 0.6 MHz. Esto haría que el tiempo de tiempo de exposición subiese hasta 1.05 s, que es más del doble del tiempo invertido al modificar solamente el número de muestras integradas. Esto corrobora que, efectivamente, la velocidad de lectura del detector es la que más impacto tiene.

Los espejos galvanométricos como los empleados en esta Tesis Doctoral, están muy extendidos en instrumentos que emplean escaneo láser, tanto en el del campo de la microscopía (Sanderson, 2004) como en OCT (Duma et al., 2015), aunque también se emplean en impresión 3D (Jigang et al., 2018). Se pueden distinguir dos formas de escaneo y ambas están disponibles en el *software* de nuestro microscopio: “left-right” y “left-right-right-left” (Figura 3.21). En el primer modo, el galvo-X escanea la muestra de izquierda a derecha y vuelve rápidamente hacia



el lado izquierdo para escanear la siguiente fila, esta función de escaneo es conocida como escaneo lineal o en diente de sierra (Duma, 2010). En el segundo caso, el galvo-X escanea la muestra de izquierda a derecha y la siguiente fila de derecha a izquierda. Este tipo de escaneo se conoce como sinusoidal (Duma, 2010).

En el primer modo, la velocidad a la que deben moverse para registrar una imagen en tiempos reducidos dota de cierta inercia a los espejos provocando que tardan en sincronizarse, lo que produce la distorsión mostrada por ejemplo en las Figura 3.7, Figura 3.12 y Figura 3.14. En el segundo caso, para la velocidad de escaneo con la que trabajamos, se producen distorsiones importantes en ambos laterales de la imagen debido a que el tiempo que permanece escaneando es similar al que tarda en parar y volver a escanear. La relación entre ambas, que se conoce como eficiencia de escaneo o *scan duty* (Duma, 2010), es baja en el escaneo sinusoidal, pero alta en el modelo lineal. Se han presentado diferentes funciones para mejorar ambos métodos de escaneo tales como la triangular o paraboloidal (Duma et al., 2015).



**Figura 3.21.** Modo de escaneo (a) left-right y (b) left-right-right-left.

Por otro lado, otras posibles distorsiones son las de barril y corsé, que se producen cuando el plano de escaneo se encuentra lejos de los espejos. Éstas se pueden compensar mediante algoritmos, calibrando los espejos como se describe en (Jigang et al., 2018; Xie et al., 2005). En el presente caso, nuestro *software* aplica durante el registro una corrección que compensa parcialmente la inercia y las distorsiones (Figura 3.3), incrementando levemente el tiempo de registro. Debido a la necesidad de mantener libres los parámetros de registro para llegar a un compromiso entre calidad de imagen y tiempo de exposición, no es posible compensarla completamente. Para solventar este problema, Wang y colaboradores escanean una zona mayor y recortan posteriormente la imagen, eliminando la zona no útil (Wang et al., 2015).

Es tamaño de imagen con los parámetros equilibrados es similar al utilizado en previos experimentos en nuestro grupo de investigación (Bueno et al., 2010). En ellos se demuestra que es éste suficiente para observar detalles en muestras de tejidos oculares (córnea, esclera) y para calcular de forma adecuada tanto métricas de calidad (Stanciu et al., 2017), como extraer información fiable asociada con la estructura y disposición espacial de fibras de colágeno (Ávila et al., 2019a).



# Capítulo 4

## Microscopía multifotónica del ojo humano en vivo

Este capítulo muestra la aplicación directa del sistema experimental de registro de imágenes multifotónicas del ojo humano en vivo. En primer lugar, se realizará un estudio para calcular la MPE con este instrumento siguiendo el estándar ANSI Z136.1 y de la INCRP (*International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection*). De esta forma, se garantiza en todo momento la seguridad y protección de las estructuras oculares en vivo. Una vez conocida la MPE se valorará la capacidad del sistema experimental para optimizar el registro de imágenes multifotónicas. Finalmente, se presentarán imágenes registradas en vivo de distintas estructuras oculares (córnea y esclera, principalmente). También se evaluará la repetibilidad del instrumento y se compararán las estructuras oculares visualizadas en vivo con las obtenidas en condiciones *ex vivo*.

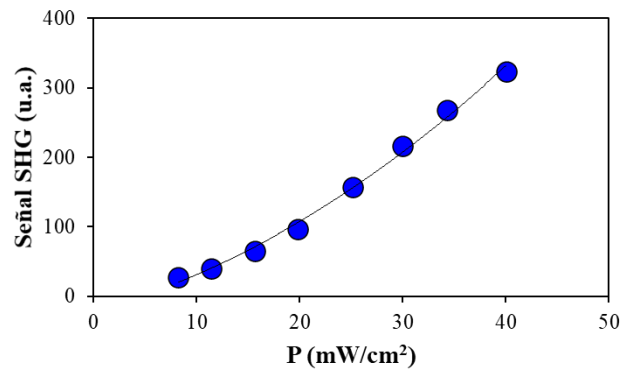


#### 4.1. Seguridad en el registro de imágenes del ojo humano en vivo

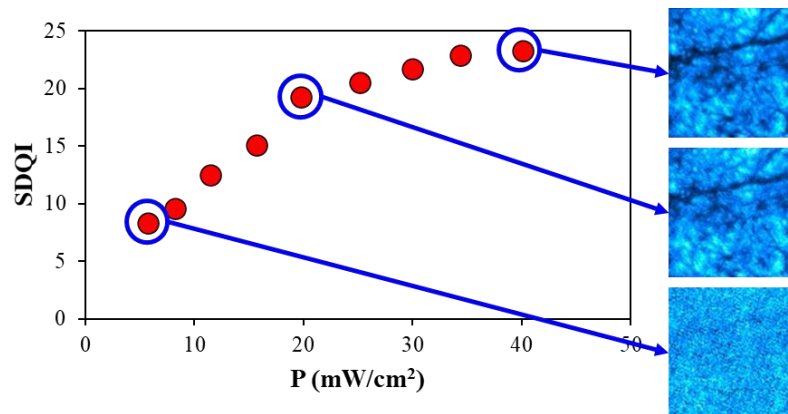
El sistema experimental está pensado para registrar fundamentalmente imágenes multifotónicas de tejidos oculares en vivo, aunque su versatilidad permite también registrar imágenes de muestras en condiciones *ex vivo*. Sin embargo, debido a lo delicado de estas estructuras biológicas, es indispensable mantener unas condiciones experimentales de seguridad para protegerlas. Consecuentemente, en la primera parte de del presente capítulo se pretende responder las siguientes preguntas:

- (1) ¿Cuál es la potencia mínima requerida para registrar una imagen SHG óptima en vivo de las estructuras oculares con alto contenido en colágeno (córnea y esclera)?
- (2) ¿Es esta potencia segura para el tejido?
- (3) ¿Afecta a la retina la luz del láser pulsado que no contribuye a la generación de SHG y se propaga a través del globo ocular?

Para contestar a estas preguntas se ha utilizado el estándar ANSI Z136.1-2000 (Delori et al., 2007) y la INCRP (Sloney et al., 2005). Con respecto a la primera pregunta, en la Figura 4.1 se presenta la relación cuadrática ( $R = 0.99$ ,  $p < 0.0001$ ) entre la señal SHG y la potencia del láser en el plano de la muestra, cuando se utiliza un tiempo de exposición de 0.45 s y una resolución de 1  $\mu\text{m}/\text{px}$ . La muestra empleada para estas medidas fue esclera humana. Por su parte, la Figura 4.2 muestra los valores de la métrica SDQI para cada una de las imágenes registradas. Para potencias menores de 10  $\text{mW}/\text{cm}^2$  en el plano de la muestra, no es posible extraer información ya que la calidad de imagen es insuficiente ( $\text{SDQI} = 8.3$ ), por estar la señal notablemente por debajo del nivel del ruido ( $\text{SNR} = 0.9$ ). Al aumentar la potencia a 20  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , la señal pasa a estar por encima del ruido ( $\text{SNR} = 1.9$ ) y la calidad de imagen es más del doble ( $\text{SDQI} = 19.3$ ), condiciones suficientes para poder detectar estructuras biológicas dentro de la propia imagen. La calidad de imagen va aumentando de forma moderada hasta que a partir de 40  $\text{mW}/\text{cm}^2$  ( $\text{SDQI} = 23.3$ ), un aumento en la potencia no contribuye más a dicho aumento y por tanto tampoco a una mejor visualización de detalles estructurales. Por tanto, bajo nuestras condiciones experimentales, 20  $\text{mW}/\text{cm}^2$  sería la potencia mínima requerida en el plano de la muestra para tener una señal eficiente.



**Figura 4.1.** Variación de la señal SHG en función de la potencia de la fuente de iluminación en el plano de la muestra (ecuación ajuste:  $y = 0.11x^2 + 4.06x - 21.37$ ).



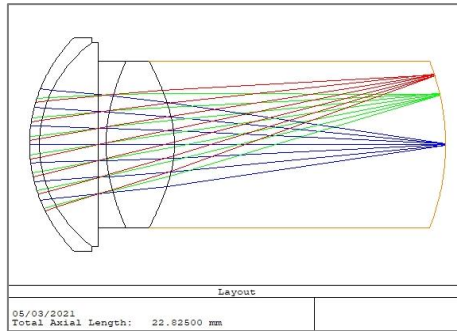
**Figura 4.2.** Valores de la métrica SDQI en función de la potencia de la fuente de iluminación en el plano de la muestra. A la derecha se muestran las imágenes SHG para potencias de 7, 20 y 40 mW/cm².

Para contestar a las dos preguntas restantes es necesario tener en cuenta diferentes factores que engloban tanto las características de la fuente de iluminación, como las del propio sistema experimental.

#### 4.1.1. Máxima exposición láser permitida en la retina

Cuando el dispositivo experimental desarrollado en este trabajo se usa para registrar imágenes SHG de la córnea, el foco del objetivo se situará sobre ésta. Sin embargo, como la generación SHG no es un proceso muy eficiente (véase el Capítulo 1), parte de la luz incidente (i.e. pares de fotones) que llegan al tejido no contribuyen al fenómeno no lineal y por lo tanto siguen su trayectoria atravesando el resto de los tejidos oculares y llegando a la retina. En términos generales, dicho haz de luz forma un cono con su base en la retina y su vértice en la córnea (foco del objetivo).

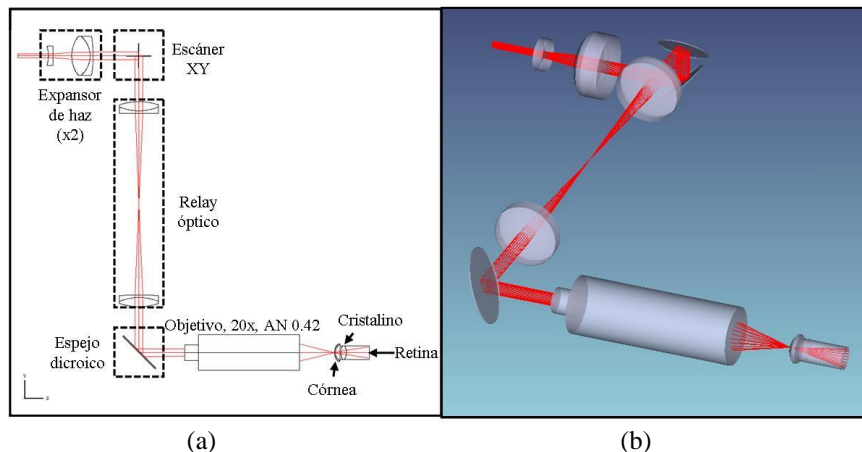
Para determinar el tamaño de la base de este cono de luz se ha empleado el *software* de diseño óptico Zemax™. Se ha utilizado un modelo de ojo esquemático (Bakaraju et al., 2010) que se presenta en la Figura 4.3.



**Figura 4.3.** Esquema del modelo de ojo de Bakaraju y colaboradores (Bakaraju et al., 2010) diseñado en Zemax. En este modelo la córnea es un menisco convexo-cóncavo y el cristalino una lente biconvexa. Entre córnea y cristalino se encuentra la pupila. Puesto que el modelo considera un ojo emétrepe, los rayos de un objeto en el infinito se enfocan sobre la retina (plano focal imagen del ojo completo).

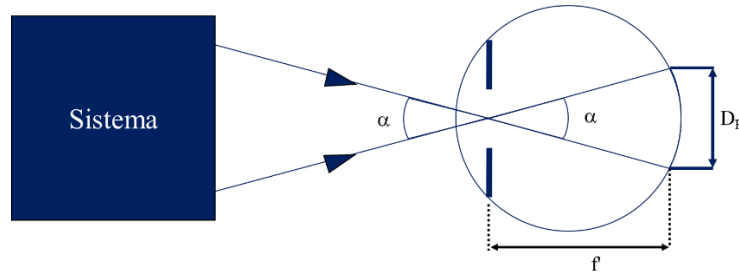
Un esquema del diseño de los elementos del sistema se muestra en la Figura 4.4. Las lentes pertenecen al catálogo de ThorLabs Inc. y están disponibles en la librería de Zemax. El diseño del objetivo fue enviado por el fabricante en modo “caja negra”, por razones relacionadas con la propiedad intelectual (patente). El tamaño del haz, que tras atravesar el telescopio de Galileo invertido se expande de 3 a 5.74 mm, pasa por los espejos de la unidad de escaneo, el sistema telescópico y se refleja en el espejo dicróico. Finalmente, el objetivo focaliza dicho haz sobre la córnea. Tras propagarse a través del modelo de ojo, la proyección sobre la retina subtende un tamaño angular de 85 mrad desde la cara anterior de la córnea. Teniendo en cuenta el modelo de ojo, la base del cono tiene un diámetro  $D_R$  de 3.88 mm y ocupa un área  $A_R$  sobre la retina de  $11.80 \text{ mm}^2$ .

Es necesario indicar que para calcular los límites de seguridad supondremos el peor escenario posible: un haz estático focalizado sobre la córnea. En términos reales, el haz focalizado sobre la córnea (y por tanto la zona retiniana iluminada) está en constante movimiento sobre la zona de registro de la muestra. Es por ello que el tiempo de exposición real podría ser mayor que el calcularemos a continuación.



**Figura 4.4.** (a) Esquema 2D del sistema experimental en Zemax. (b) Representación en 3D. Para detalles sobre los componentes ópticos se puede consultar el Capítulo 2.

Como se ha comentado previamente, en el cálculo de los límites de exposición se ha seguido el estándar ANSI Z136.1-2000 (Delori et al., 2007). Uno de los principales parámetros para el cálculo de los límites de iluminación en la retina es el ángulo visual ( $\alpha$ ). En el modelo que se emplea para los cálculos en las normas ANSI se emplea por simplicidad el ojo de Gullstrand ( $f' = 17$  mm). Usando el tamaño retiniano calculado en Zemax ( $D_R = 3.88$  mm), calculamos el tamaño angular con el mismo modelo que se usa en el estándar ANSI (Figura 4.5), así pues,  $\alpha = 2 \cdot \text{atan}(D_R/2f') = 227$  mrad.



**Figura 4.5.** Esquema de la iluminación retiniana donde el plano de la pupila coincide con el punto nodal.

La irradiancia corneal<sup>3</sup> ( $E_C$ ) se calcula a partir de su propia definición como muestra la ecuación 4.1.

$$E_C = \frac{d\Phi}{ds_C} = L_S \Omega \approx \frac{\pi}{4} L_S \alpha^2. \quad (4.1)$$

Por extensión, la irradiancia en retina ( $E_R$ ) será:

$$E_R = \frac{d\Phi}{ds_R} = E_C \frac{A_{pup}}{A_{ret}} \approx E_C \cdot \rho \cdot \frac{D_{pup}^2}{f'^2 \alpha^2} \approx \frac{4\rho\Phi}{\pi f'^2 \alpha^2}, \quad (4.2)$$

donde  $\rho$  expresa la transmitancia de los medios oculares (que depende de la longitud de onda de la fuente de iluminación), y  $\Phi$  es el flujo que entra en el ojo.

La norma ANSI Z136.1-2000 permite hacer el cálculo de la máxima irradiancia permitida en la córnea ( $MPE_C$ ) con parámetros que dependen de la fuente de iluminación, tales como de la extensión de la fuente ( $C_E(\alpha)$ ) y de la longitud de onda ( $C_T(\lambda)$ ). A su vez, dispone de diferentes reglas para comprobar los límites de seguridad (exposición máxima) y que en nuestro caso particular irá ligado a las características de los pulsos que emite el láser. Para un láser con una duración de pulso  $\tau < 1$  ns y una frecuencia de repetición mayor que la frecuencia de repetición crítica,  $F_{CR} = 56 \cdot 10^4$  Hz (pulsos de  $\sim 400$  fs sobre la muestra en nuestro sistema y  $F = 76 \cdot 10^6$  Hz), hay que comprobar las reglas 1 y 2 para el cálculo del flujo máximo en vatios

<sup>3</sup>Conceptos de fotometría: la energía radiante de una fuente se expresa Julios (J); así, la energía integrada por unidad de tiempo se conoce como flujo radiante ( $\Phi$ ) y tiene dimensiones de potencia, vatios ( $W = J/s$ ). La irradiancia ( $E$ ) es el flujo radiante incidente por unidad de superficie ( $W/m^2$ ) y la radiancia ( $L$ ) se defina como el flujo incidente por unidad superficie y de ángulo sólido ( $\Omega = \alpha^2 \cdot \pi/4$ ) en una dirección determinada ( $W/m^2 \cdot sr$ ).



que entra a través de la pupila,  $MP\Phi$  (ecuaciones 4.3a y 4.3b), sin tener en cuenta los límites fotoquímicos, ya que  $\lambda > 600$  nm.

$$\text{Regla 1: } MP\Phi_{R1} = \delta \cdot MP\Phi[\tau], \quad (4.3a)$$

$$\text{Regla 2: } MP\Phi_{R2} = MP\Phi[T]. \quad (4.3b)$$

La elección de una u otra depende de cuál es el umbral más bajo, es decir, determinar cuál es la que más limita y usar el más restrictivo.

**- Regla 1:  $MP\Phi$  límite para un pulso**

Siguiendo la regla 1, la magnitud  $MP\Phi_{R1}$  se calcula a partir de la ecuación 4.4, ya que la duración de cada pulso es menor de 10 ps. Los parámetros que componen esta ecuación son el factor de discontinuidad ( $C_J$ ), siendo 1 el valor de este último parámetro,  $C_T(\lambda)$  representa la absorción en los medios oculares dependiente de la longitud de onda y  $C_E(\alpha)$  es el factor del tamaño de la fuente (Delori et al., 2007).

$$MP\Phi[\tau] = 5.78 \cdot 10^{-9} \cdot C_T \cdot C_J \cdot C_E \cdot \tau^{-1}. \quad (4.4)$$

El valor de  $C_T(\lambda)$  se calcula a partir de la ecuación 4.5, para una longitud de onda  $700 < \lambda < 1050$  nm. Por otro lado,  $C_E(\alpha)$  se calcula con la ecuación 4.6 para un ángulo visual extenso,  $\alpha > 100$  mrad:

$$C_T(\lambda) = 10^{0.002(\lambda-700)}, \quad (4.5)$$

$$C_E(\alpha) = \frac{\alpha^2}{\alpha_{min} \cdot \alpha_{max}}, \quad (4.6)$$

donde  $\alpha$  ya se calculó previamente (227 mrad) y es mayor que  $\alpha_{min} = 1.5$  mrad y que  $\alpha_{max} = 100$  mrad. Los valores de ambos parámetros son:  $C_T(\lambda) = 1.58$  y  $C_E(\alpha) = 344$ .

A partir de aquí, el flujo máximo (en vatios) que puede entrar a través de la pupila se puede calcular sustituyendo en la ecuación 4.3a:

$$MP\Phi_{R1} = \delta[5.78 \cdot 10^{-9} \cdot C_T \cdot C_J \cdot C_E \cdot \tau^{-1}], \quad (4.7)$$

con  $\delta = \tau \cdot F$ , dando como resultado  $MP\Phi_{R1} = 268$  W.

**- Regla 2:  $MP\Phi$  en exposición continua**

Por otro lado,  $MP\Phi_{R2}$  es el límite de exposición continua. En este caso, el valor umbral dependerá del tiempo de exposición ( $T$ ) que se sitúa entre un valor mínimo ( $T_{min} = 1.8 \cdot 10^{-5}$  s, dependiente de  $\lambda$ ) y uno máximo ( $T_2 = 100$  s, dependiente de  $\alpha$ ):

$$MP\Phi[T] = 6.93 \cdot 10^{-4} \cdot C_E \cdot C_T \cdot P^{-1} \cdot t^{-0.25}, \quad (4.8)$$

donde  $P(T, \lambda)$  es el factor de pupila que vale 1 cuando  $\lambda > 700$  nm. Suponiendo  $T_{min}$  y sustituyendo en la ecuación 4.8 los parámetros definidos previamente, el valor de  $MP\Phi_{R2}$  será de 5.79 W. Si usamos por ejemplo  $T = 0.11$  s (uno de los valores experimentales obtenido en el

Capítulo 3), entonces  $MP\Phi_{R2} = 655$  mW. Puesto que en cualquiera de los casos  $MP\Phi_{R2}$  es menor que  $MP\Phi_{R1}$ , esta regla 2 será la que limite la exposición.

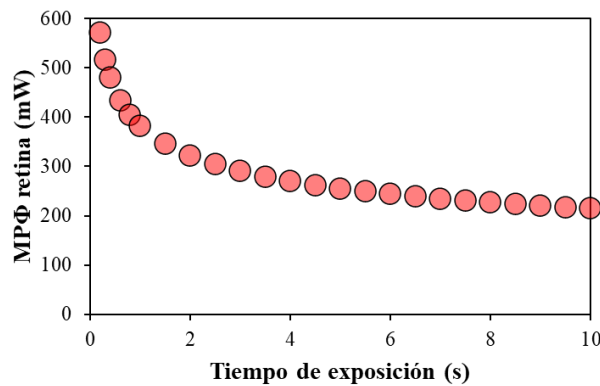
Teniendo por tanto en cuenta esto, para  $\alpha > 100$  mrad, la máxima irradiancia en retina ( $MPE_R$ ) se puede calcular, en  $W/cm^2$ , como:

$$MPE_R = 2.04 \cdot C_T \cdot P^{-1} \cdot T^{-0.25}. \quad (4.9)$$

Conocido el área de la proyección retiniana ( $A_R = 11.80$  mm<sup>2</sup>), el límite de potencia para proteger la retina se calcula como:

$$MP\Phi_R[T] = MPE_R [T] \cdot A_R. \quad (4.10)$$

En la Figura 4.6 se muestra la máxima potencia permitida en la retina ( $MP\Phi_R$ , en mW), para tiempos de exposición en el rango que va desde 0.2 s hasta 10 s.



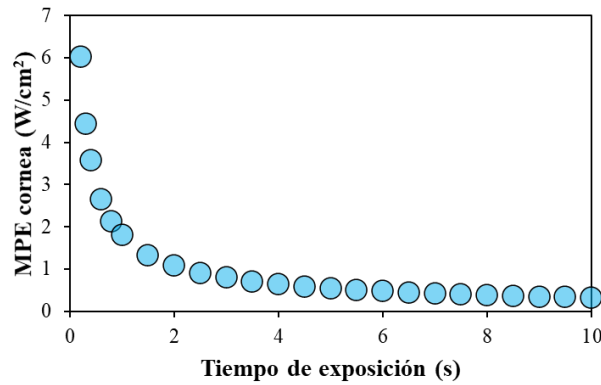
**Figura 4.6.** Máxima potencia láser en función del tiempo de exposición para proteger la retina. El cálculo se ha realizado para una proyección retiniana de 11.80 mm<sup>2</sup>.

#### 4.1.2. Máxima exposición láser permitida en la córnea

Por otro lado, según las recomendaciones de ICNIRP para evitar daños en córnea y cristalino durante el uso de láseres IR pulsados, con tiempos de exposición menores de 45 s, la  $MPE_c$  ( $W/cm^2$ ) no debe ser superior a (Sloney et al., 2005):

$$MPE_c = 1.8 \cdot t^{-0.75}. \quad (4.11)$$

En la Figura 4.7 se observa la representación gráfica de este umbral en función del tiempo de exposición. La máxima exposición es de 300 mW/cm<sup>2</sup> a 10 s (hemos de recordar que los tiempos con los que hemos estado trabajando en el Capítulo 3 han estado siempre por debajo de 3 s). Este umbral garantiza la protección del segmento anterior de ojo por daño térmico de radiación IR, evitando el fotodaño en la córnea y la generación de cataratas en el cristalino.



**Figura 4.7.** Máxima irradiancia permitida en función del tiempo de exposición para proteger la córnea y el cristalino.

### 4.1.3. Condiciones de exposición experimental

Para conocer exactamente si estamos cumpliendo los límites de seguridad que se han explicado y calculado en los dos apartados anteriores, a continuación, vamos a establecer de nuevo tres cuestiones clave:

- (1) ¿Cuál es la  $MPE_C$  para no producir daños en la córnea y el cristalino con el tiempo de exposición óptimo? ¿Es este nivel dañino para la retina?
- (2) ¿Cuál es la  $MP\Phi_R$  para no producir daños en la retina con el tiempo de exposición óptimo? ¿Sería ésta dañina para la córnea y el cristalino?
- (3) ¿Cuál es la exposición láser en la córnea y la retina en condiciones experimentales reales? ¿Es esta exposición dañina para córnea, cristalino y retina?

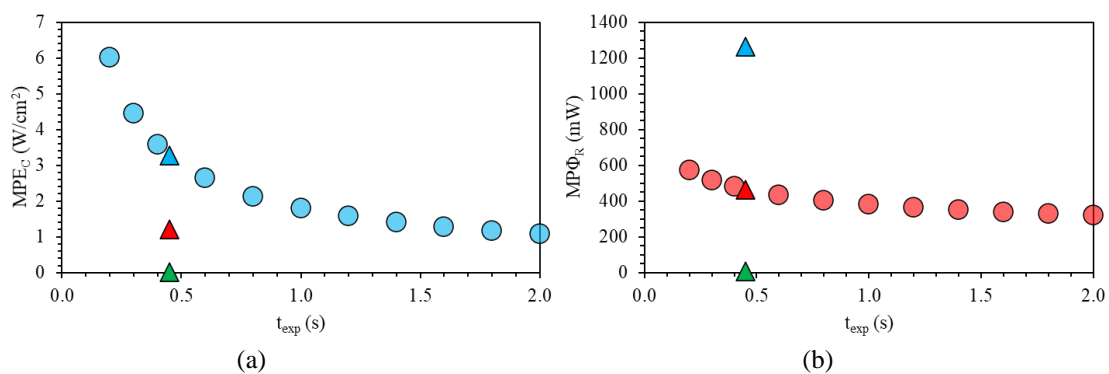
Para obtener una imagen de buena calidad y resolución, con distorsión reducida, el tiempo de exposición mínimo requerido es de 0.45 s. Este tiempo de exposición correspondería a una  $MPE_C = 3.28 \text{ W/cm}^2$ . A partir de este valor podemos determinar usando la ecuación 4.2 cuál sería la irradiancia en la proyección retiniana ( $E_R$ ). De esta forma, suponiendo el mismo tamaño de pupila que emplean en las normas ANSI (dilatada, de 7 mm, ya que  $\lambda > 700 \text{ nm}$ ), con un  $A_{pup} = 0.385 \text{ cm}^2$  la irradiancia retiniana será de  $E_R = 10.69 \text{ W/cm}^2$ , es decir, la potencia en la proyección retiniana correspondería a  $\Phi_R = 1261 \text{ mW}$ . Este valor podría llegar a ocasionar daños irreparables en el tejido, aunque está muy por encima del  $MP\Phi$  en la retina, y es muy superior a la potencia nominal de la fuente de iluminación utilizada en este trabajo.

Por otro lado, para evitar daños en la retina con tiempo de exposición de 0.45 s,  $MPE_R = 3.95 \text{ W/cm}^2$  y, consecuentemente,  $MP\Phi_R = 466 \text{ mW}$ . De nuevo, a partir de la ecuación 4.2, podemos calcular cuál es la irradiancia, en este caso corneal, resultando,  $E_C = 1.21 \text{ W/cm}^2$ . Este resultado se encuentra de nuevo muy por encima de la exposición experimental aquí empleada.

A partir de la densidad de potencia experimental óptima ( $E_{Cexp} = 20 \text{ mW/cm}^2$ ) para obtener una imagen de buena calidad calculamos cuál es la exposición en la proyección retiniana.  $E_{Rexp}$

resulta ser de  $0.07 \text{ W/cm}^2$ , lo que equivale a  $\Phi_R = 7.70 \text{ mW}$ , valor que está 60 veces por debajo del límite para ese tiempo de exposición (Figura 4.6).

En la Figura 4.8 se muestran de nuevo los datos de  $MPE_C$  y  $MP\Phi_R$ , añadiendo los valores límites calculados en este apartado. Así pues, en azul, al igual que antes se muestran los valores  $MPE_C$  umbral para cada tiempo de exposición. El triángulo azul señala el  $MPE_C$  para  $t = 0.45 \text{ s}$ . El triángulo rojo señala el  $MPE_C$  para proteger la retina para el mismo tiempo de exposición. Finalmente, el triángulo verde señala las condiciones experimentales reales con  $20 \text{ mW/cm}^2$  que es la irradiancia a la que se ve expuesta la córnea en nuestros experimentos. Se puede observar cómo este valor está muy por debajo del umbral para evitar dañar la retina.



**Figura 4.8.** (a) Máxima irradiancia permitida en función del tiempo de exposición para proteger la córnea. (b) Máxima potencia permitida en la retina en función del tiempo de exposición. Sobre cada gráfica se han representado el valor umbral para proteger la córnea (triángulo azul) y para proteger la retina (triángulo rojo) con una exposición de 0.45 s. El triángulo verde indica los valores con las condiciones experimentales reales.

Todo lo expuesto hasta este momento, nos indica que podemos registrar una imagen de la córnea con total seguridad y sin dañar ninguna de las estructuras, pero ¿hasta qué tiempo de exposición seguiría siendo seguro el registro? Esto es clave porque el *software* desarrollado para controlar el microscopio permite registrar vídeos, además de series de imágenes a diferentes profundidades. Al estar registrando varias imágenes, estas modalidades incrementarían considerablemente el tiempo de registro y, por tanto, el de exposición.

Aplicando la ecuación 4.10, el tiempo de exposición máximo para, por ejemplo, un vídeo sin causar daños en la córnea es de 403 s, es decir, 6.72 min. Además, conocida la exposición experimental en retina el tiempo máximo de exposición permitido sería  $6.03 \cdot 10^6 \text{ s}$ , es decir, aproximadamente 70 días. En cualquier caso, el umbral de exposición en la córnea limita el tiempo durante el que se puede realizar el registro en una misma zona.

Una serie de imágenes de la córnea con la profundidad se puede realizar en tiempos muy reducidos, sin sobrepasar nunca el límite de tiempo de exposición calculado aquí. Además, en el hipotético caso de que existiera un fallo mecánico y, por ejemplo, el obturador no cerrara a

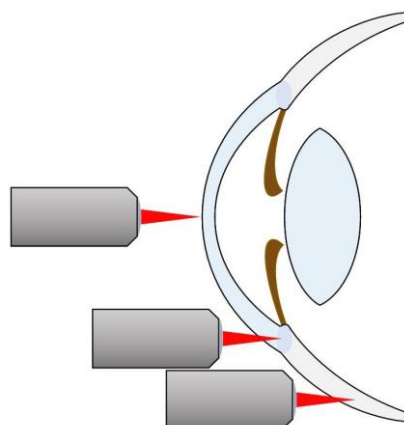
tiempo, estos cálculos nos permiten conocer el tiempo de respuesta máximo para evitar provocar daños irreversibles en el sujeto. La Tabla 4.1 recoge las condiciones experimentales y límites teóricos calculados para la irradiancia en córnea y retina, así como los tiempos de exposición límite con la irradiancia experimental aplicada en córnea.

**Tabla 4.1.** Condiciones experimentales y límites máximos de irradiancia y exposición permitida.

Experimental	Límites córnea	Límites retina
$t_{\text{exp}}$ (s)	$MPE_C$ máx. (mW/cm <sup>2</sup> )	$MP\Phi_R$ máx. (mW)
0.45	395	466
$MPE_C$ (mW/cm <sup>2</sup> )	$t_{\text{exp}}$ máx. (s)	$t_{\text{exp}}$ máx. (s)
20	403	$6.03 \cdot 10^6$

## 4.2. Imágenes multifotónicas de estructuras ocular en vivo

En este apartado se describirán las imágenes obtenidas y se mostrarán las capacidades del instrumento. Las estructuras de especial interés han sido principalmente la córnea, la esclera y el limbo esclerocorneal (Figura 4.9).

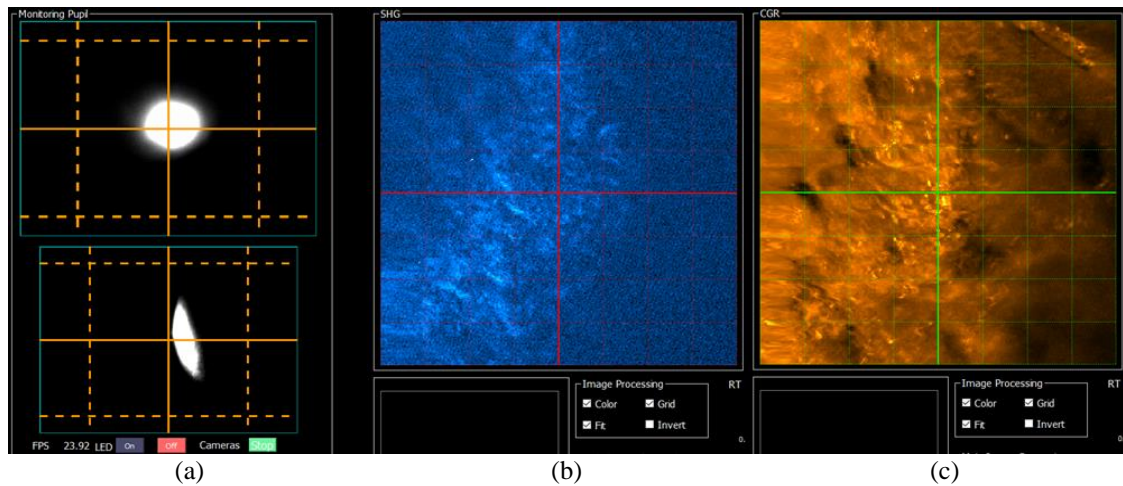


**Figura 4.9.** Esquema gráfico de la localización de las zonas de especial interés donde se han registrado imágenes: córnea, limbo esclerocorneal y esclera.

Uno de los pasos previos antes del registro de imágenes es calibrar la posición de las cámaras frontal, lateral y el detector RLI (Figura 4.10). Cuando las imágenes de las cámaras auxiliares están conjugadas con la posición del foco del objetivo, la imagen registrada por el microscopio “estará en foco”. Para que la operación de calibrado fuese lo más parecida a la situación en vivo, se utilizó un ojo *ex vivo* de modelo animal.

Una vez calibradas las cámaras se procedió a situar al sujeto sobre la mentonera que permite el ajuste XYZ (como se mostró en la Figura 2.7). En el proceso de registro, se le pidió que mantuviera la vista fijada en un estímulo de fijación para minimizar los movimientos oculares involuntarios. La potencia empleada fue de 20 mW/cm<sup>2</sup>. Para dar más estabilidad a las imágenes

en vivo fue necesario aumentar la integración hasta 15 muestras/px. Para compensar este aumento en la integración y reducir el tiempo de exposición fue necesario reducir la resolución hasta  $1.5 \mu\text{m}/\text{px}$  en casi todos los casos que veremos en los próximos apartados. Esta reducción de la resolución no causa pérdida de información estructural.

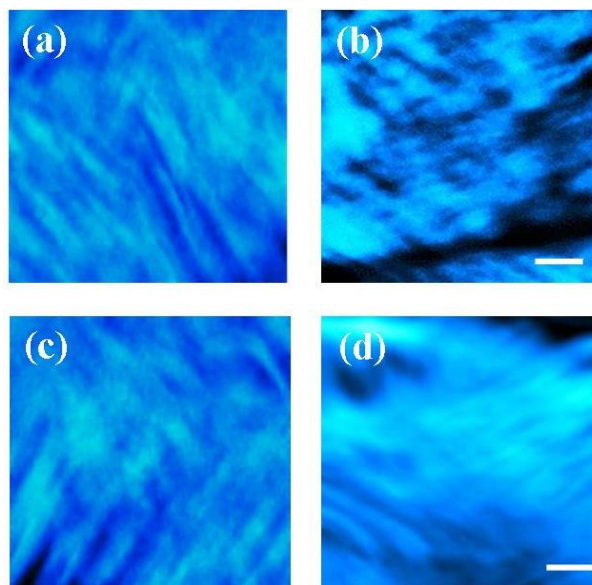


**Figura 4.10.** Posición de las cámaras frontal y lateral (a), para registrar una imagen SHG (b) y una imagen RLI (c) en un modelo animal de globo ocular.

#### 4.2.1. Imágenes SHG de la córnea

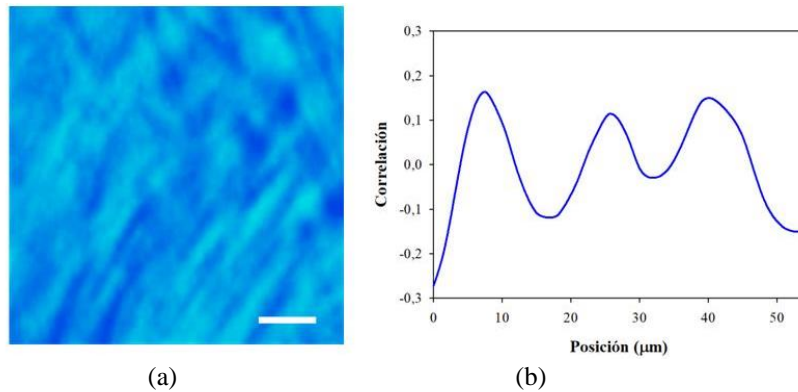
##### - Estructura central de la córnea

En la Figura 4.11 se presentan las imágenes del colágeno en el ápex corneal en dos sujetos y dos localizaciones en profundidad. El tiempo de exposición de cada imagen individual fue de 0.42 s. A simple vista se pueden distinguir fibras individuales en las imágenes de ambos sujetos. Dichas fibras se distribuyen de forma perpendicular entrelazadas, este no parece variar al registrar imágenes a mayor profundidad (Figura 4.11c,d).



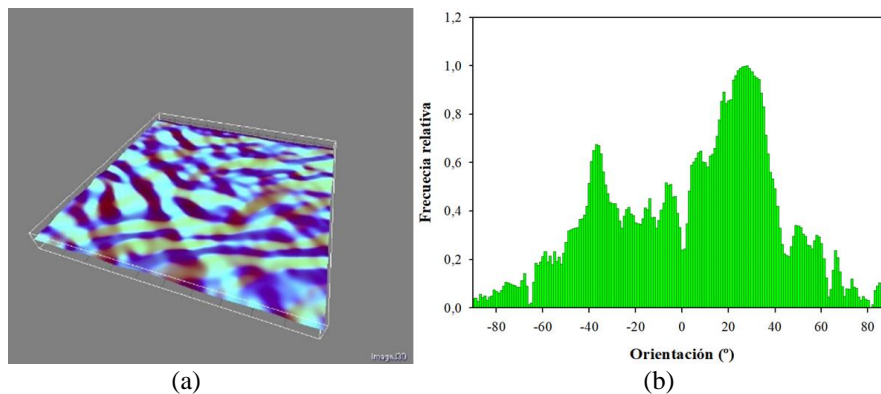
**Figura 4.11.** Imágenes SHG del ápex corneal de dos sujetos diferentes en el estroma anterior (a, b) y a  $100 \mu\text{m}$  de profundidad aproximadamente (c, d). Escala:  $50 \mu\text{m}$ .

A partir de las imágenes mostradas en la Figura 4.11 se puede determinar que la resolución empleada es efectiva para distinguir fibras individuales. Un ejemplo representativo se presenta en la Figura 4.12, donde el tamaño de las fibras calculado es de  $19.0 \pm 2.3 \mu\text{m}$ . Este valor es coherente con el tamaño de las fibras en la zona central de la córnea en condiciones *ex vivo* (Bueno et al., 2011).



**Figura 4.12.** (a) Imagen SHG de la córnea central humana en vivo. (b) Función de correlación que permite el cálculo de la densidad de fibras.

Esta resolución permite, además, generar mapas topográficos que aportan una visualización más detallada de las imágenes (Figura 4.13a). En la organización de las fibras del estroma corneal aparecen dos direcciones principales ortogonales o cuasi ortogonales ( $PO_1 = -42^\circ$  y  $PO_2 = 28^\circ$ ) con una DS de  $12^\circ$  (Figura 4.13b).



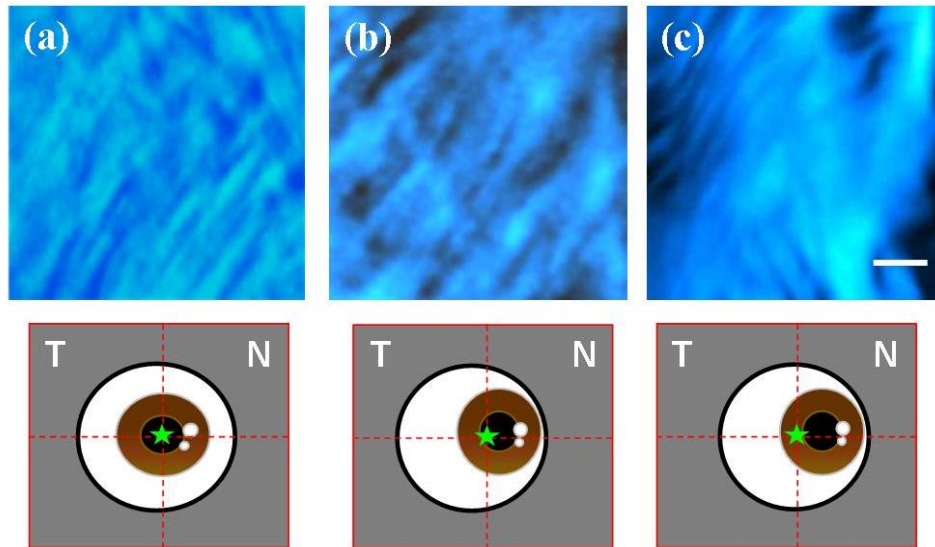
**Figura 4.13.** (a) Topografía de la imagen SHG en vivo del ápex corneal. (b) Histograma de frecuencia de OP al aplicar el TdE (b).

#### - Estroma corneal en localizaciones excéntricas

Existen patologías que afectan a la córnea en localizaciones más excéntricas como es el caso de la degeneración marginal pelúcida. Es por ello que también se ha realizado el estudio del estroma corneal en distintas localizaciones que van desde el ápex hasta el limbo esclerocorneal. En las imágenes SHG de la Figura 4.14 se pueden observar cualitativamente los cambios en la distribución espacial del estroma corneal con la excentricidad. En la parte inferior de la figura se muestra esquemáticamente la localización aproximada de la zona de registro.



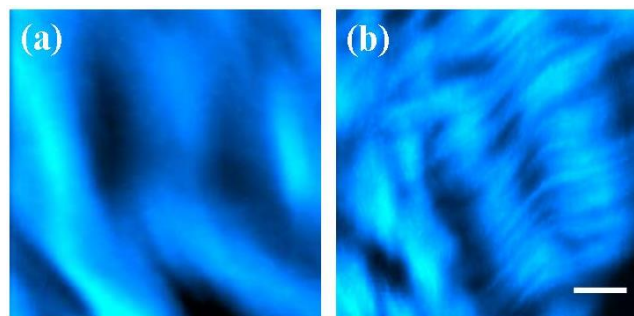
La estructura esencialmente pasa de una zona de entrecruzamiento de las fibras a una donde la disposición es paralela. Esta disposición cambia bruscamente al llegar a la localización del limbo esclerocorneal donde su disposición es más irregular y con fibras más cortas, donde también se puede apreciar la zona de salto del tejido corneal al escleral (veáse más adelante, por ejemplo, la Figura 4.20).



**Figura 4.14.** Imágenes SHG del estroma corneal desde el ápex hacia la periferia. Las ilustraciones inferiores indican la zona de registro.

#### 4.2.2. Imágenes SHG de la esclera

Se ha estudiado también la esclera por ser ésta otra de las estructuras oculares con alto contenido en colágeno. En la Figura 4.15 se muestra una imagen SHG de la esclera (zona temporal excéntrica) usando dos resoluciones diferentes.



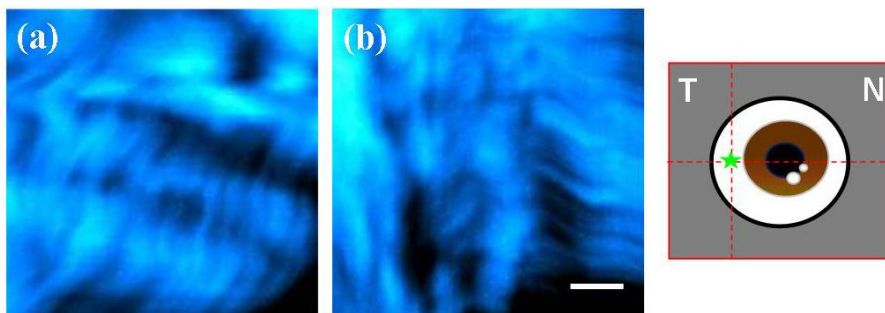
**Figura 4.15.** Imágenes SHG de la esclera en vivo registradas con una resolución de 3 (a) y 1.5  $\mu\text{m}/\text{px}$  (b).

Mientras que en la imagen de la derecha es posible observar las fibras apiladas en una determinada dirección, en la de la izquierda solamente aparecen unas fibras verticales de mayor grosor. Lo que está ocurriendo en realidad es que cuando las condiciones de registro no están optimizadas, es posible que el efecto de submuestreo por una baja resolución de la imagen haga que fibras de determinado tamaño no lleguen a visualizarse correctamente. En este caso se ha



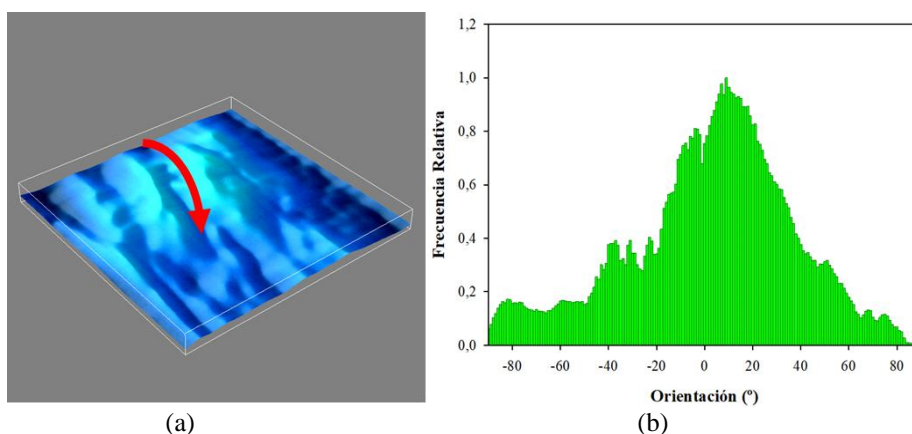
pasado de una resolución de 3  $\mu\text{m}/\text{px}$  (Figura 4.15a) a una de 1.5  $\mu\text{m}/\text{px}$  (Figura 4.15b). Así, al calcular la densidad de fibras en la imagen registrada con el *software* desarrollado en este trabajo se pasa de  $65.0 \pm 7.7 \mu\text{m}$  a  $22.0 \pm 1.7 \mu\text{m}$ .

En la Figura 4.16 se muestran algunas imágenes SHG representativas de localizaciones similares (temporal, próxima al limbo) en dos sujetos diferentes. Como es de esperar, la estructura es muy parecida y es posible distinguir las fibras individuales apiladas. La resolución de las imágenes es de 1.5  $\mu\text{m}/\text{px}$ . En este caso el tamaño de las fibras en esa zona de la esclera es de  $20.5 \pm 1.8 \mu\text{m}$ , valor similar al obtenido al analizar la imagen SHG de la Figura 4.15b.



**Figura 4.16.** Imágenes SHG de la esclera en vivo en una zona temporal próxima al limbo. Escala: 50  $\mu\text{m}$ . La zona de registro se muestra en la representación esquemática de la derecha.

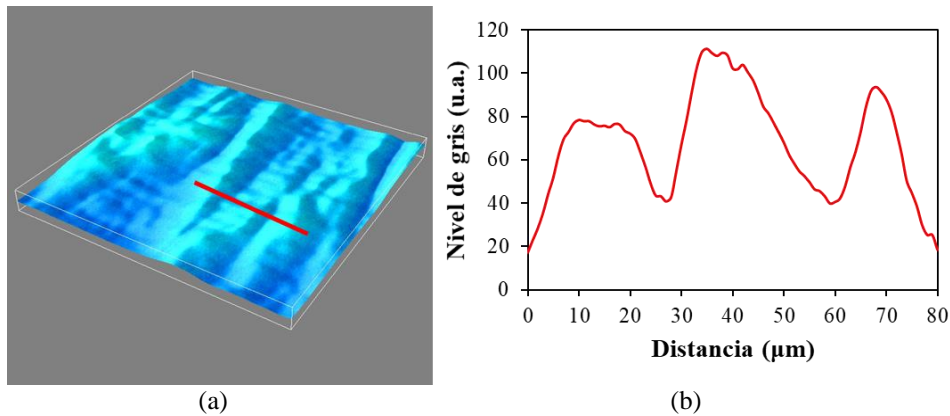
La Figura 4.17a presenta una topografía de otra imagen SHG de la esclera. En la imagen es posible distinguir fibras individuales de la propia esclera e incluso, al igual que con la córnea, analizar la organización del tejido (Figura 4.17b) que en esta zona resulta estar casi organizado ( $\text{DS} = 22^\circ$ ). Fuera de la zona marcada con la flecha roja se observa cómo las fibras, conservando la dirección, van pasando hacia zonas más profundas del tejido dando la falsa sensación de que el tamaño de las fibras se reduce.



**Figura 4.17.** (a) Topografía de una imagen SHG de la esclera en vivo en una zona próxima al limbo esclerocorneal (tiempo de exposición: 0.5 s; resolución: 1  $\mu\text{m}/\text{px}$ ). (b) Histograma de frecuencias relativas de OP obtenido al aplicar el TdE.

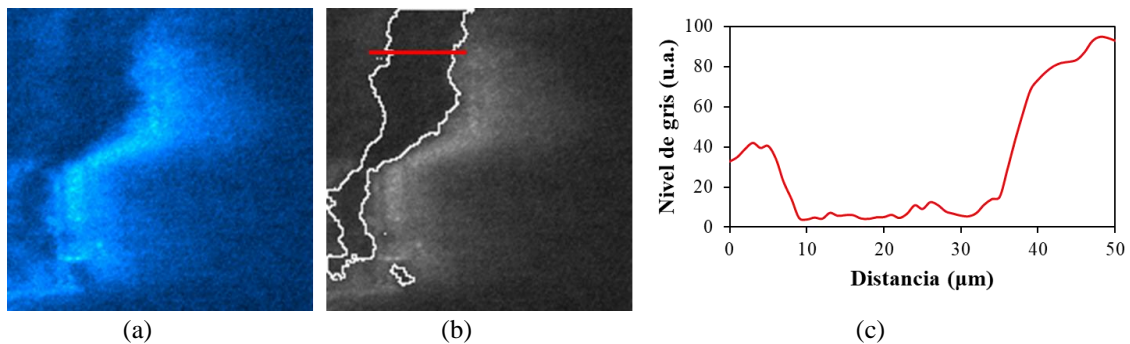
La topografía de otra imagen SHG de la esclera de otro sujeto (zona nasal excéntrica y mismas condiciones de registro que la anterior) se muestra en la Figura 4.17a. El análisis del

perfil de intensidad de la zona señalada en color rojo (Figura 4.17b) permite determinar el tamaño de las fibras que en este caso es de  $26 \pm 4 \mu\text{m}$ .



**Figura 4.18.** (a) Topografía de una imagen SHG de la esclera en vivo en una zona excéntrica hacia el lado nasal (tiempo de exposición: 0.5 s; resolución:  $1 \mu\text{m}/\text{px}$ ). (b) Perfil de intensidad a lo largo de la línea roja.

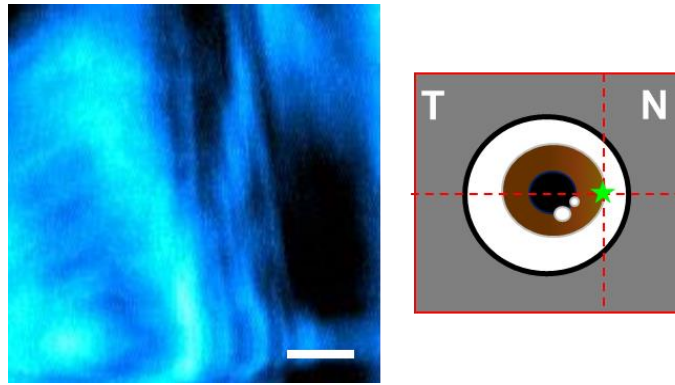
También es posible observar algunos capilares de la esclera, los cuales destacan en negro sobre la señal multifotónica del tejido escleral, tal y como se puede observar en la Figura 4.19a. Las diferentes herramientas de post-procesado aquí desarrolladas nos permiten sacar información de interés. Por ejemplo, aplicando diferentes niveles de umbralizado, es posible destacar los bordes (Figura 4.19b) y conocer cómo discurren estas venas por el tejido o medir su calibre. En este caso el tamaño es de unas  $25 \mu\text{m}$ , valor típico de arteriolas y vénulas (Figura 4.19c).



**Figura 4.19.** Imagen SHG de una vena en la esclera (a), con un resaltado de los bordes (b) y el perfil de intensidad para determinar su calibre (c).

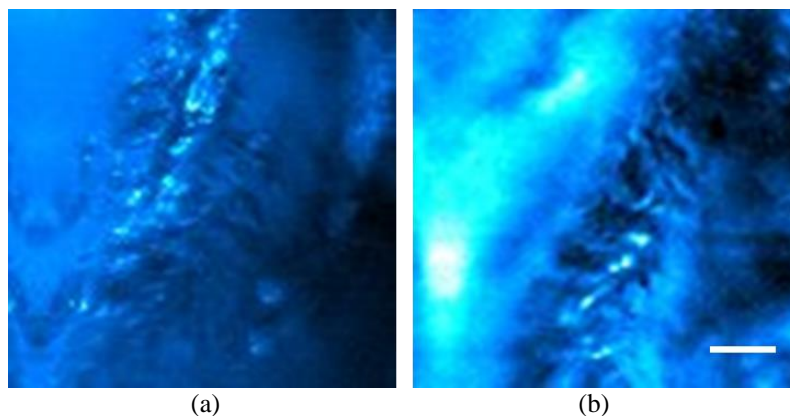
### 4.2.3. Imágenes SHG del limbo esclerocorneal

La zona del limbo esclerocorneal es también muy importante en el estudio del ojo, ya que en su región más externa (ligeramente sobreelevada) se encuentra la transición estructural de la córnea a la esclera, y en la interna se alojan las células madre que se encargan de la regeneración del epitelio corneal. Una imagen SHG en vivo de la zona de transición externa se presenta en la Figura 4.20.



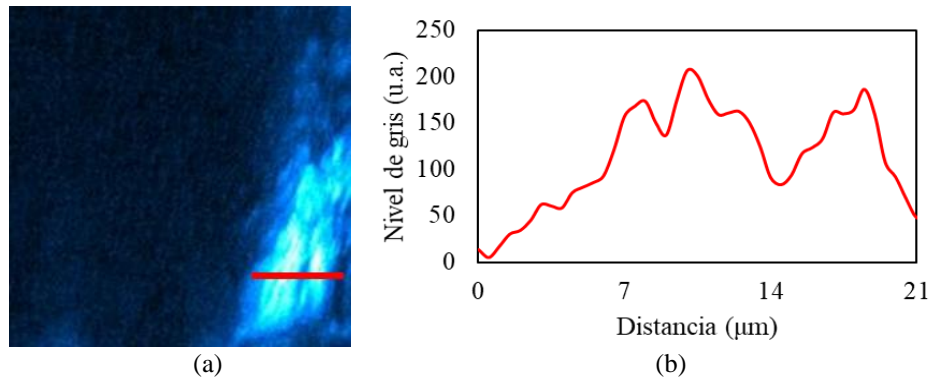
**Figura 4.20.** Imagen SHG de la zona más externa del limbo esclerocorneal. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . A la derecha, una representación gráfica de la zona de registro.

Por su parte, la Figura 4.21 muestra imágenes SHG de la zona limbar interna donde se visualiza una “sutura” entre el colágeno escleral y el corneal. Las imágenes de esta zona de transición muestran bastante irregularidad debido al entrecruzamiento entre las fibras de colágeno de la esclera y de la córnea.



**Figura 4.21.** Imágenes SHG de la zona interna del limbo esclerocorneal en vivo en dos sujetos diferentes. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

Una imagen SHG de la misma zona del limbo con mayor resolución mayor ( $0.5 \mu\text{m}/\text{px}$ , i.e. menor tamaño de imagen) se muestra en la Figura 4.22a. En dicha imagen se puede ver en primer plano esta zona de intersección, destacando sobre las estructuras del fondo oscuro que, debido a la irregularidad de la zona, se encuentra fuera de foco. En esta imagen es posible analizar más detalladamente esta intersección entre la córnea y la esclera, distinguiendo incluso las fibras dentro de esta zona de la sutura, tal y como se muestra en el perfil de intensidad (Figura 4.22b).

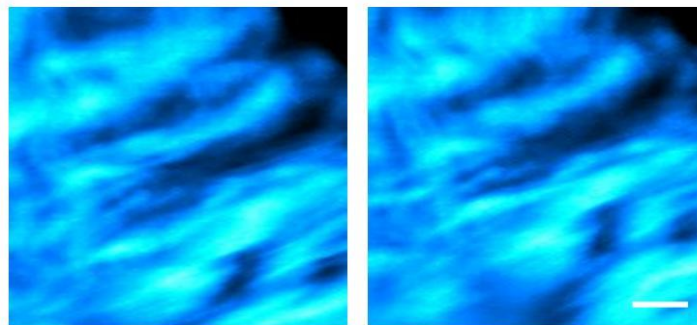


**Figura 4.22.** Imagen SHG del limbo (a) y perfil de intensidad de la zona marcada con la línea roja (b).

#### 4.2.4. Repetibilidad

Un requisito imprescindible para confirmar que un sistema experimental es robusto es que las medidas sean reproducibles, es decir, que, en las mismas condiciones experimentales las imágenes sean similares. En instrumentos orientados al registro de imágenes del ojo en vivo, este hecho no es trivial puesto que la estabilidad del sujeto juega un papel fundamental en la operación de registro.

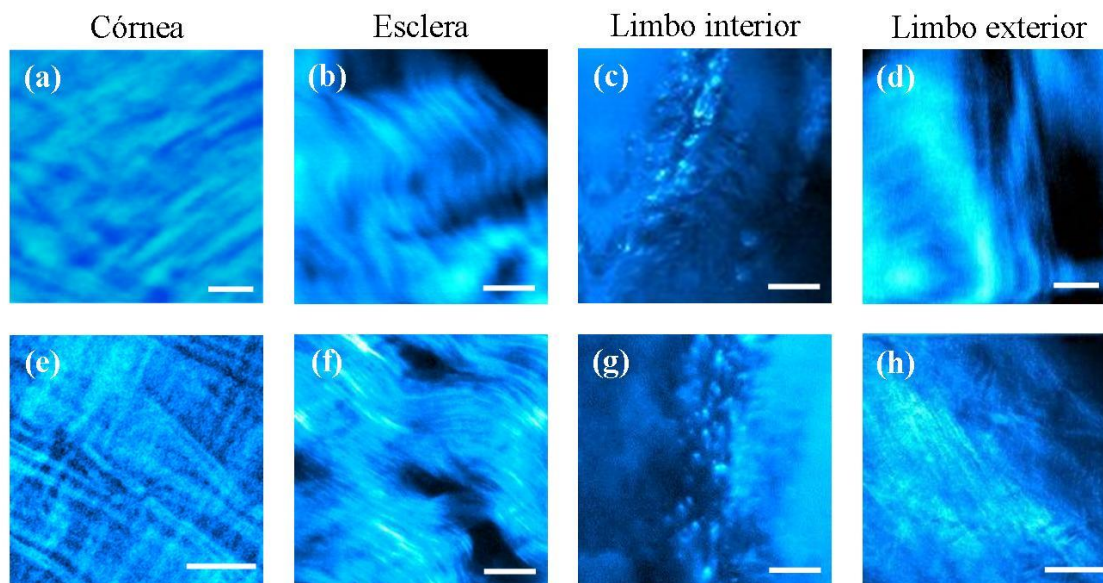
Las imágenes de la Figura 4.23 se han utilizado para evaluar experimentalmente la repetibilidad del instrumento. Los paneles superiores presentan imágenes SHG de la periferia corneal registradas con un intervalo de tiempo de 0.45 s. Como se puede ver, las estructuras de las imágenes son similares confirmando que los movimientos oculares no han afectado de forma importante ni a la calidad de la imagen ni a la visualización de detalles.



**Figura 4.23.** Imágenes SHG secuenciales usadas para la evaluación de la repetitividad del instrumento. Barra de escala: 50 μm.

#### 4.2.5. Comparación de imágenes multifotónicas: *En vivo* vs. *Ex vivo*

En las secciones anteriores se han mostrado imágenes SHG del estroma corneal, la esclera y el limbo esclerocorneal. Sin embargo, es importante determinar si estas imágenes son similares a lo observado hasta el momento en imágenes SHG de las mismas estructuras en condiciones *ex vivo*. La Figura 4.24 compara imágenes SHG registradas en condiciones *en vivo* y *ex vivo* de la esclera, el limbo (externo e interno) y la esclera de ojos humanos.

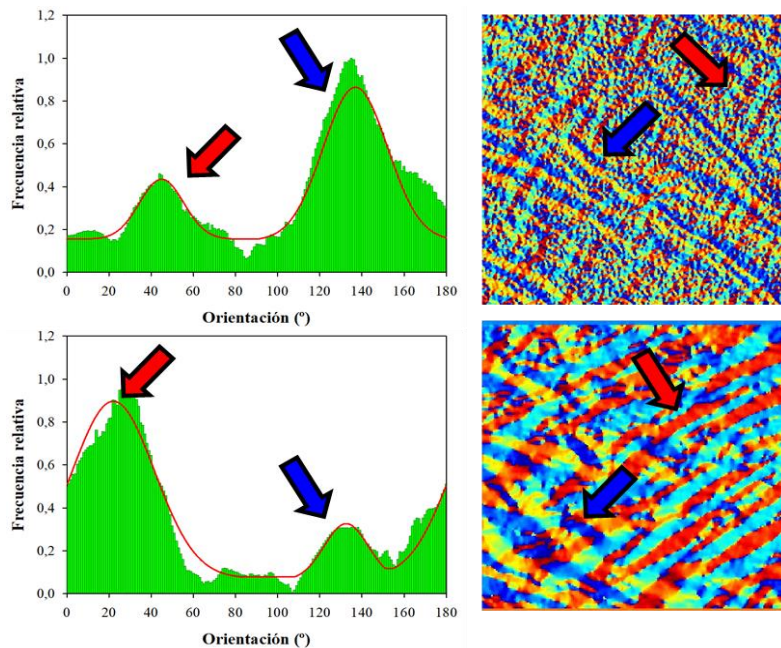


**Figura 4.24.** Comparación de imágenes SHG en vivo (a-d) y *ex vivo* (e-h) de la córnea (a, e), la esclera (b, f) y parte interior (c, g) y exterior (d, h) del limbo esclerocorneal. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

A pesar de las diferencias en las condiciones de registro, las estructuras que se observan son comparables. Si bien las imágenes *ex vivo*, en la mayoría de los casos, presentan una mayor resolución y detalles son más fácilmente detectables al tratarse de una muestra estática. En particular en la córnea se aprecia la estructura de fibras entrecruzadas típica de la zona del ápex y en la esclera, la estructura de fibras apiladas que discurren con disposición ondulada. En ambas imágenes del limbo interior esclerocorneal se observa claramente la zona de “sutura” o transición que separa la córnea de la esclera. Finalmente, en la zona exterior del limbo se visualiza tanto fibras de colágeno como la depresión que se corresponde con parte de la imagen con ausencia de señal SHG por estar ésta fuera del plano de foco (recuérdese que el área es una zona abultada tipo *bump*).

Para completar esta comparativa, se ha aplicado el TdE a las imágenes SHG de la córnea (Figura 4.24a y Figura 4.24e), cuyos resultados se muestra en la Figura 4.25. Para ambas imágenes, tanto los histogramas como los mapas reflejan la presencia de dos OPs. En particular, para los casos presentados, las localizaciones de los máximos son  $45^\circ$  y  $137^\circ$  para la imagen *ex vivo* (histograma y mapa superiores), y  $22^\circ$  y  $133^\circ$  para la en vivo (histograma y mapa inferiores). Los valores de DS se corresponden con muestras de colágeno ordenadas ( $DS < 20^\circ$ ):  $11^\circ$  para ambos.





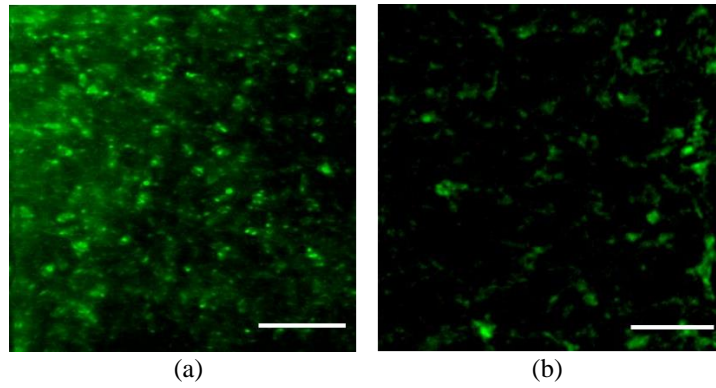
**Figura 4.25.** Histogramas y mapas de OP de las imágenes SHG de la córnea de las Figura 4.24a y la Figura 2.24e: *ex vivo* (superior) y en vivo (inferior). Las flechas señalan las OPs de la distribución de fibras de colágeno estromal.

#### 4.2.6. Imágenes multifotónicas de otras estructuras oculares de interés

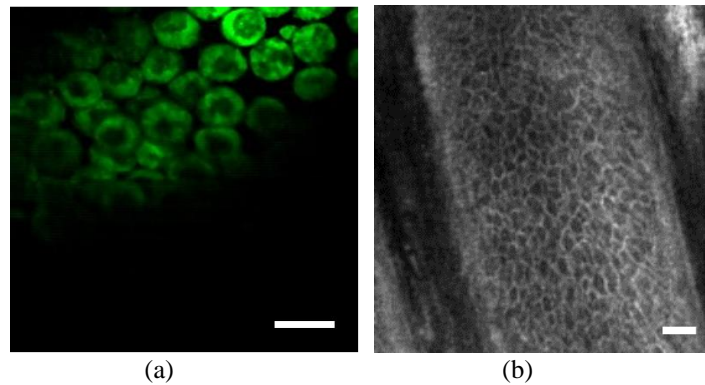
Más allá de la visualización de estructuras con alto contenido en colágeno como son la córnea y la esclera, la microscopía no lineal también permite ver otras estructuras oculares de gran importancia por sus funciones para mantener la integridad de la córnea. Es el caso de las células epiteliales y endoteliales, los queratocitos o la malla trabecular. Puesto que estas estructuras carecen de colágeno, la señal multifotónica corresponderá exclusivamente a señal TPEF, por lo cual, para proceder a su registro se ha de intercambiar el filtro SHG por uno TPEF en el brazo de detección de microscopio (véase Figura 2.1).

En la Figura 4.26 se presentan imágenes TPEF de los queratocitos corneales registradas en vivo (a) y *ex vivo* (b). Los queratocitos se encargan de mantener el colágeno vivo y se encuentran entre las lamelas del estroma corneal. Debido a la poca uniformidad de los cuerpos celulares de los queratocitos, es más útil medir su densidad. Así, las densidades de queratocitos en las imágenes en vivo y *ex vivo* son, respectivamente,  $5194 \pm 638$  y  $4042 \pm 1091$  células/mm<sup>2</sup>.

También se han podido registrar imágenes de las células en las empalizadas de Vogt del limbo interior esclerocorneal desde donde se inicia el proceso de proliferación y migración de las células del epitelio para su renovación. En la Figura 4.27 se comparan imágenes de las células del limbo en vivo (a, TPEF) y *ex vivo* (b, confocal). Se puede ver cómo la emisión de señal TPEF de las células individuales se corresponde con el citoplasma donde se encuentran los fluoróforos intrínsecos. Por el contrario, el núcleo no emite señal TPEF.

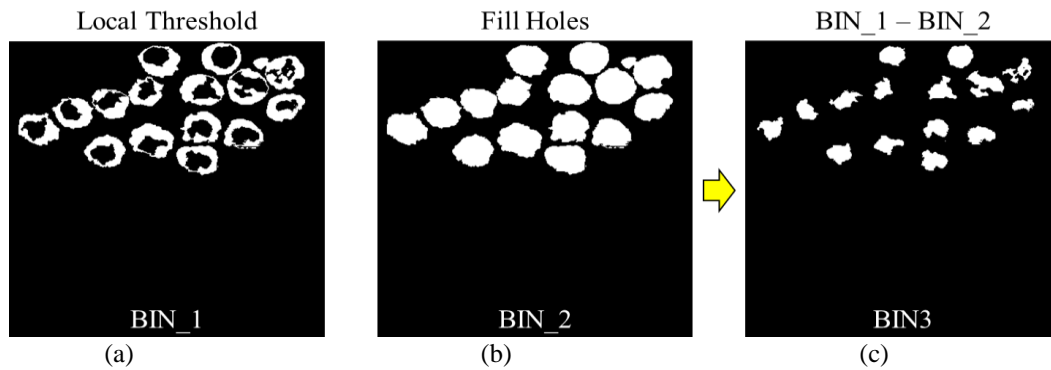


**Figura 4.26.** Imágenes TPEF de los queratocitos en la córnea humana en vivo (a) y *ex vivo* (b). Escala: 50  $\mu\text{m}$ .



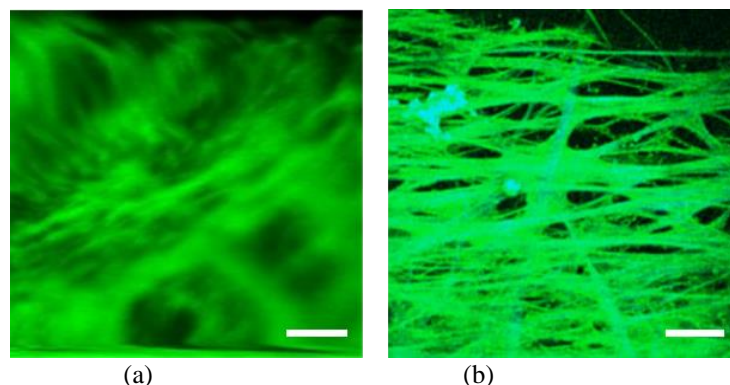
**Figura 4.27.** Imagen TPEF en vivo (a) e imagen confocal *ex vivo* (b) de las células basales del limbo esclerocorneal. La Figura (b) se ha adaptado de (Shortt et al., 2007). Escala: 25  $\mu\text{m}$ .

Tomando como base la imagen de la Figura 4.27a, en la Figura 4.28 se representa el procesamiento llevado a cabo para calcular el tamaño, densidad y la relación nucleocitoplasmática (NCR, del inglés *Nuclear-to-Cytoplasm Ratio*) (Arpitha et al., 2005). En primer lugar, se aplica un umbralizado local sobre la imagen original (imagen BIN\_1, Figura 4.28a). A continuación, usando herramientas de binarizado se rellenan los huecos (imagen BIN\_2, Figura 4.28b) para obtener el tamaño total de las células mediante la herramienta “Analizar Partículas”. Al restar las imágenes BIN\_1 y BIN\_2 se puede conseguir una imagen sólo de los núcleos (imagen BIN\_3, Figura 4.28c). De nuevo, mediante la herramienta “Analizar Partículas” se calcula el tamaño de los núcleos de dichas células. En la zona del limbo esclerocorneal, las células tienen una dimensión promedio de  $228.5 \pm 28.3 \mu\text{m}^2$ . Suponiendo un área circular, el tamaño medio de las células sería de  $17.1 \pm 1.1 \mu\text{m}$ , por otro lado, el valor de NCR varía entre 0.23 y 0.46 y, finalmente, la densidad de células sería de, aproximadamente,  $4443 \pm 588 \text{ células/mm}^2$ . Este tipo de procesamiento y análisis son sencillos de realizar e, incluso, podría incluirse como herramienta para una valoración *in situ* de las estructuras de la imagen.



**Figura 4.28.** Ejemplo de procesamiento para el cálculo del tamaño de las células limbares. Umbralizado local (a), rellenado de huecos (b) y diferencia entre las anteriores (c).

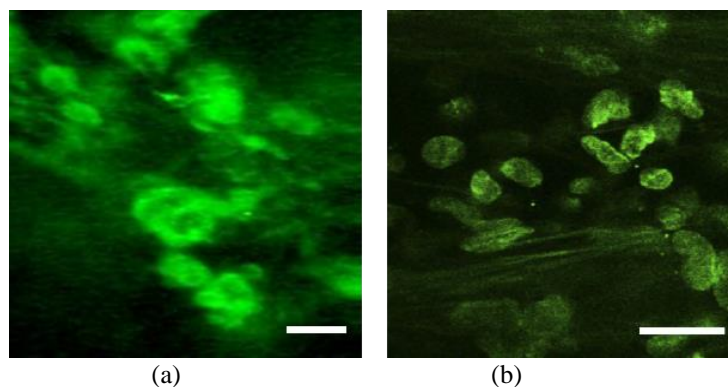
Otra estructura que también se encuentra en la zona del limbo esclerocorneal es la malla trabecular, cuya función es drenar el humor acuoso de la cámara anterior del ojo hacia el canal de Schlemm, regulando así la PIO (Abu-Hassan et al., 2014). La malla trabecular está formada casi en su totalidad por elastina, por lo que es posible observarla mediante microscopía TPEF (Aptel et al., 2010). En la Figura 4.29 se muestran imágenes TPEF registradas en vivo (a) y *ex vivo* (b) de la malla trabecular. A pesar de que, en condiciones en vivo, no se ven tan definidas las fibras, sí que es posible observar la estructura de red tridimensional con las fibras entrelazadas.



**Figura 4.29.** Imágenes de la malla trabecular del ojo humano en condiciones en vivo (a) y *ex vivo* (b). La imagen (b) se ha adaptado de (Ammar et al., 2010). Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

Adherido al endotelio del canal de Schlemm se encuentra el tejido yuxtacanalicular que tiene la función de guiar el drenaje del humor acuoso. Está formada por entre 2 y 5 capas de células amorfas y discontinuas (Abu-Hassan et al., 2014). La estructura de este tejido se puede observar claramente en la imagen TPEF de la córnea humana en vivo de la Figura 4.30a. Comparativamente, en la Figura 4.30b se muestra la imagen TPEF del tejido yuxtacanalicular en una córnea humana *ex vivo* (Gonzalez et al., 2016) donde las estructuras amorfas de diferentes tamaños son muy similares a las obtenidas en condiciones en vivo.





**Figura 4.30.** Imágenes TPEF del tejido yuxtacanalicular del ojo humano en condiciones en vivo (a) y ex vivo (b). Imagen (b) adaptada de (Gonzalez et al., 2016). Barra de escala: 25  $\mu$ m.

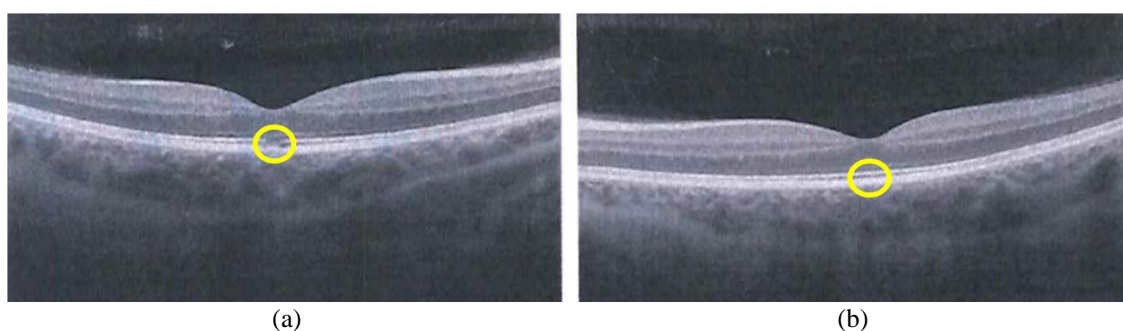
### 4.3. Discusión

A pesar de su potencial, el uso de la microscopía multifotónica en condiciones en vivo es muy reducido, limitándose a varios intentos en modelos animales (Latour et al., 2012; Wang et al., 2005). Una de las razones de la escasez de este tipo de estudios ha sido la dificultad de definir unos parámetros de registro seguros que permitan obtener imágenes de buena calidad, tanto en transmisión o en reflexión. Varios autores han demostrado que tanto la eficiencia del proceso SHG como la calidad de las imágenes SHG obtenidas en reflexión suele ser notablemente menor que cuando se trabaja en transmisión, por ser el fenómeno SHG muy direccional (Chen et al., 2012a; del Barco & Bueno, 2012; Zipfel et al., 2003). Sin embargo, para aplicaciones en vivo como en la que aquí trabajamos, la configuración del registro debe de ser obligatoriamente en reflexión. En cualquier caso, en este capítulo se ha demostrado que tanto la resolución como la eficiencia del registro son suficientes como para obtener imágenes de las diferentes estructuras del segmento anterior del ojo con suficiente resolución y calidad como para ser analizadas y obtener información precisa y fiable.

El presente capítulo se divide en dos grandes bloques. En el primer bloque se ha presentado el cálculo de los límites de seguridad para el uso del microscopio multifotónico en el ojo humano en vivo, teniendo en cuenta tanto las propiedades físicas de la fuente de iluminación láser como las características técnicas del dispositivo experimental. En el segundo bloque se han mostrado en detalle su funcionamiento y capacidades a la hora de registrar imágenes multifotónicas de diferentes estructuras oculares.

Cuando la luz láser incide en el ojo, ésta puede, o bien, ser absorbida por la córnea y/o el cristalino o transmitirse por el ojo hasta la retina. Se sabe que el ojo funciona como una lente convergente para longitudes de onda desde 400 a 1400 nm, longitudes de onda por debajo y por encima de este rango (ultravioleta, UV, e IR respectivamente), son absorbidas por la córnea y el cristalino, pudiendo producir cataratas y queratitis (Alonso-Fernández et al., 2010). La

radiación en el rango [400-700] nm se conoce como espectro visible pues el ojo humano la detecta. El rango del espectro entre 700 y 1400 nm se denomina IR cercano (NIR, del inglés *Near Infrared*). Este rango es especialmente dañino para la retina, ya que: (1) la córnea y el cristalino absorben ese tipo de radiación y, además, (2) el ojo no es sensible, no puede detectarla, no se produce el reflejo de aversión y por tanto la exposición podría ser mayor de la MPE produciendo daños irreversibles en la retina. Un ejemplo de daños producido por un láser en el ojo se presenta en la Figura 4.31a. En la imagen OCT se ve una herida en la capa de los fotorreceptores en la zona subfoveal debido a la exposición a un láser NIR de femtosegundos como el utilizado en el sistema experimental empleado en esta Tesis Doctoral. Por comparación directa, en la Figura 4.31b la retina corresponde al ojo contralateral sano, con la capa de los fotorreceptores intacta.



**Figura 4.31.** Imágenes OCT de un fondo de ojo con una quemadura en la capa de los fotorreceptores de la retina (a) y de uno sano (b). El círculo amarillo indica la zona afectada. Imágenes cedidas por la Clínica Oftalmológica Oftalvist, Murcia.

Debido a las graves consecuencias que puede acarrear el uso no apropiado de láseres, es necesario llevar a cabo una clasificación de estos con el objeto de determinar el tipo de protecciones y medidas de seguridad que se deben seguir. En general, la norma UNE-EN 60825-1 (Normalización Española de la Internacional IEC 60825-1, equivalente de la norma estadounidense ANSI Z136.1) distingue 7 clases según el riesgo asociado a su uso, del más seguro al más peligroso: Clase 1, 1M, 2, 2M, 3R, 3B, 4. Esta clasificación se basa en si la MPE es mayor o menor que el tiempo reflejo de aversión (0.25 s) (Smalley, 2011).

La determinación de los niveles de seguridad de láseres que, a priori, no son seguros para el ojo humano desnudo es, por tanto, de gran importancia en el desarrollo de instrumentación láser para aplicaciones oftálmicas. En general, se sigue la norma ANSI Z136.1 para la regulación de los límites de seguridad de los láseres. Ésta está basada en reportes experimentales de los umbrales de fotodaño en función de parámetros como la longitud de onda, el tiempo de exposición y el tamaño de la zona iluminada sobre la retina. Los límites están fijados para ser, como mínimo, 10 veces menores que el umbral de fotodaño que a su vez está

fijado al 50% de probabilidad de causar daño visible en el tejido (Delori et al., 2007). La longitud de onda es un parámetro de gran importancia a la hora de determinar el MPE ya que, como se ha indicado anteriormente, no todas las longitudes de onda son absorbidas y transmitidas igual por las estructuras oculares.

En los instrumentos clínicos oftálmicos actuales es difícil la estimación del MPE puesto que el área iluminada en retina va a depender de diversos factores o de si el instrumento está pensado para hacer imagen del segmento anterior o del posterior. Es por ello que la estimación de la MPE debe hacerse siempre suponiendo el peor caso posible de exposición (Sliney et al., 2005).

Debido a la falta de información específica sobre los umbrales de *fotodaño* de la microscopía multifotónica para el ojo en vivo en condiciones similares a las del presente estudio, no es posible realizar una comparación directa ni de condiciones de registro, ni de valores de MPE, ni de signos de *fotodaño*. En algunos de las escasas publicaciones que usan microscopía SHG en vivo, la potencia empleada se encuentra entre 15 y 85 mW (Latour et al., 2012; Wang et al., 2005). Sin embargo, en ningún caso se muestran en detalle ni las características de registro y ni los parámetros de seguridad mínimos. Si bien es cierto, en los últimos años se ha visto incrementado el uso de láseres IR similares al usado en este trabajo en otras aplicaciones e instrumentos, tales como la OCT (Sharma et al., 2014) o la oftalmoscopia de dos fotones en la retina (Schwarz et al., 2016).

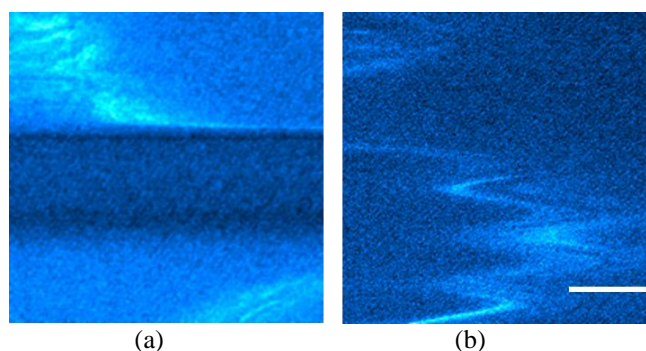
Para la OCT que usa láseres de longitud de onda similar a la empleada en esta Tesis Doctoral sí se han reportado reiteradamente los valores límite de exposición. De esta forma la MPE en retina de la OCT para una  $\lambda$  de 800 nm, está en torno a 0.7 mW (Radhakrishnan et al., 2001; Sharma et al., 2014). En estudios recientes, se han usado 1.5-2.5 mW para OCT del segmento anterior (i.e. córnea) que están por debajo del límite de 8.6 mW según la ANSI (Pantolon et al., 2019).

Por otro lado, Schwarz y colaboradores (Schwarz et al., 2016) han publicado un informe detallado sobre la MPE de un oftalmoscopio multifotónico para visualización de la retina en condiciones en vivo en macacos. En 2019, también para visualización de la retina de ratas albinas y pigmentadas, Jayabalan y colaboradores, desarrollaron el proceso de análisis de la MPE (Jayabalan et al., 2019). Gracias a estos estudios se ha detectado que en algunos casos la MPE según los estándares no es completamente segura, produciendo daños permanentes, por ejemplo, en los conos S de la retina de los macacos (Schwarz et al., 2018). Aunque, de nuevo, en estos casos estamos ante un funcionamiento diferente, ya que el haz está enfocado en retina,

que tiene además límites de exposición por debajo de la córnea, debido a su gran absorción en el rango del IR.

El registro de imágenes multifotónicas se han llevado a cabo en varios sujetos control (voluntarios sanos) y han permitido analizar y caracterizar las estructuras observadas de forma objetiva, así como realizar una comparación cualitativa con resultados previos en condiciones *ex vivo*.

Una vez conocida la MPE, otra de las limitaciones a tener en cuenta a la hora de registrar imágenes son los movimientos oculares, particularmente los involuntarios. En estos resultados se muestra que con un tiempo de exposición hasta 0.5 s, el instrumento, además de ser seguro para el ojo (tanto córnea como retina), proporciona imágenes de buena calidad y repetibilidad (Figura 4.23). A pesar de nuestro sistema proporciona medidas repetibles, es necesario entrenar al sujeto para que mantenga la mirada estable sobre un estímulo de fijación, lo que minimiza movimientos involuntarios o parpadeos que producen imágenes distorsionadas o estructuras irreconocibles como las mostradas en la Figura 4.32. Concretamente, en la Figura 4.32a, debido al parpadeo, en la imagen SHG aparece una franja oscura que cruza la imagen en dirección horizontal. Por su parte, en la Figura 4.32b debido a que el movimiento del ojo del sujeto es más rápido que el tiempo de exposición de la imagen, las estructuras aparecen distorsionadas.



**Figura 4.32.** Imágenes SHG del ojo humano en vivo registradas durante un parpadeo (a) y durante un movimiento involuntario del ojo (b). Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

Este tipo de problemas de fijación no son novedad en sistemas experimentales de tipo oftalmológico. Algunas soluciones que pueden ayudar a mejorar la estabilidad de la imagen podrían estar basadas en la implementación de un “*pupil tracking*” (Mompeán et al., 2018). La implementación de un estímulo de fijación usando el propio brazo de iluminación del sistema podría también redundar en una mayor estabilidad de la imagen y, por tanto, agilizar las sesiones de registro.

Poniendo el foco en los resultados de este capítulo, se ha mostrado que la calidad de las imágenes es suficiente como para detectar, por ejemplo, las estructuras del estroma corneal,

donde se encuentran las fibras de colágeno apiladas en lamelas. Además, es posible también determinar el tamaño y densidad de estas fibras de forma objetiva (Figura 4.12). El tamaño calculado de las fibras de colágeno en las imágenes del estroma corneal es de aproximadamente 19  $\mu\text{m}$ . Este tamaño concuerda con los reportados previamente por varios autores (Bueno et al., 2011; Meek & Fullwood, 2001; Newton & Meek, 1998), donde estiman grosores entre 5 y 35  $\mu\text{m}$ . También se ha observado el entrecruzamiento típico de las fibras de colágeno (Figura 4.11 y Figura 4.13) descrito también por (Meek & Knupp, 2015). La capacidad de este instrumento para dar información precisa sobre la organización y estructura del colágeno en la córnea de forma inmediata, puede ser de gran ayuda para la detección de patologías que, como hemos explicado en repetidas ocasiones, afectan al organización o estructura interna del colágeno, como es el caso del queratocono (Ávila et al., 2019a).

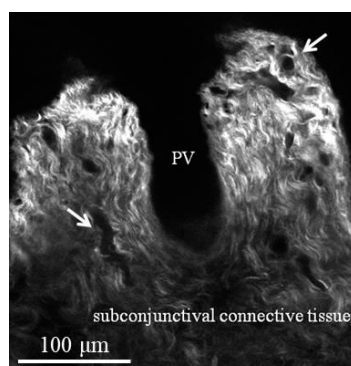
Por otro lado, en la esclera también ha sido posible determinar la organización y estructura de las fibras (Figura 4.17). Éstas tienen similar diámetro a las fibras corneales (unas 20  $\mu\text{m}$ ), aunque varía de unas zonas a otras, siguiendo una organización irregular según nuestros resultados. Esto concuerda también con lo encontrado en la literatura (Boote et al., 2020). Los estudios sobre la esclera han ido aumentando en gran medida en los últimos años. El aumento significativo de la miopía en las últimas décadas y las probabilidades de que siga aumentando de forma dramática en un futuro próximo ha urgido a investigar qué factores influyen en su desarrollo, tejidos que se ven afectados, como es el caso de la esclera (McBrien & Gentle, 2003), o tratamientos que pueden ayudar a frenarla, como el *cross-linking* escleral (Wollensak & Spoerl, 2004). En este sentido, se ha encontrado que en miopes se produce un adelgazamiento de la esclera (Schaeffel & Feldkaemper, 2015; Summers Rada et al., 2006).

Dentro del estroma corneal, entre las lamelas, también podemos encontrar los queratocitos, cuerpos celulares aplanados, alargados e irregulares. La capacidad de observar los queratocitos (Figura 4.26) se debe a su capacidad para emitir señal TPEF, esto nos permite estudiar cómo se distribuyen y su densidad dentro del estroma. En particular, en las imágenes que hemos registrado de sujetos sanos voluntarios la densidad es de  $5194 \pm 638$  células/ $\text{mm}^2$ , esta es comparable a la obtenida en condiciones *ex vivo*.

Entre las estructuras de mayor importancia en el mantenimiento del globo ocular se encuentra el limbo esclerocorneal. Además de ser la zona de transición entre la córnea transparente y la esclera opaca (Figura 4.20 y Figura 4.21), con la consiguiente especificación en la organización del tejido, es importante para soportar las fluctuaciones de la PIO. En esa zona es posible observar la malla trabecular, cuya función es la del drenaje del humor acuoso

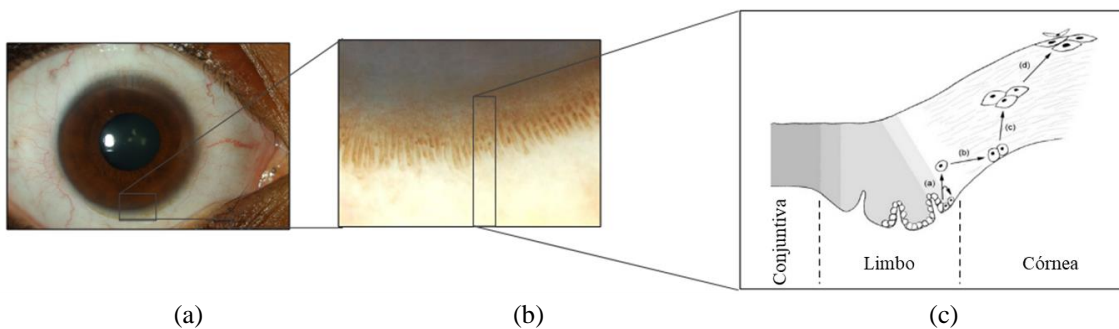
dentro del ojo hacia el canal de Schlemm, regulando dicha PIO. Además, en el epitelio basal de esta estructura se encuentran las células madre que se encargan de regenerar la córnea.

En la zona del limbo esclerocorneal encontramos, como se ha comentado previamente, las llamadas criptas con las células madre limbares en las empalizadas de Vogt (Figura 4.33). Desde la capa basal del epitelio limbar proliferan las células epiteliales y migran hacia la superficie corneal central. Una ilustración de este proceso se puede observar en la Figura 4.34c. La caracterización de las células del epitelio basal del limbo ha sido realizada previamente en condiciones *in vivo* mediante microscopía confocal (Arpitha et al., 2005; Romano et al., 2003; Shortt et al., 2007), tanto en condiciones patológicas (Chan et al., 2015; Deng et al., 2012; Lagali et al., 2013; Miri et al., 2012) como con la edad (Patel et al., 2006; Zheng & Xu, 2008) y, más recientemente, con microscopía multifotónica en condiciones *ex vivo* (Lombardo et al., 2017). En esta zona se han observado que las células basales se caracterizan por su tamaño reducido, del orden de  $10\ \mu\text{m}$  ( $5\text{-}20\ \mu\text{m}$ ) (Romano et al., 2003; Shortt et al., 2007), abarcando una superficie de unas  $221.6 \pm 90.8\ \mu\text{m}^2$  (Arpitha et al., 2005) y tener un gran núcleo, con un NCR de, aproximadamente, 0.76 (0.52-0.98) (Arpitha et al., 2005; Shortt et al., 2007). Chan y coautores, han estudiado también la densidad de células, tanto en córneas sanas como afectadas por LSCD (del inglés, *Limbal Stem Cell Deficiency*). En su trabajo determinaron que la densidad de células del limbo se reduce hasta un 31.7% en condiciones patológicas respecto a córneas sanas ( $7120 \pm 360\ \text{células}/\text{mm}^2$ ) (Chan et al., 2015). Los resultados obtenidos en este capítulo a partir de las imágenes TPEF de las células del limbo coinciden con las características que muestran las registradas con microscopía confocal *in vivo*. Mediante microscopía multifotónica en condiciones *ex vivo*, Lombardo y coautores también mostraron las células del epitelio basal en el limbo en ojos control, además de un modelo de regeneración del epitelio corneal a partir de células madre (Lombardo et al., 2017).



**Figura 4.33.** Imagen SHG de las empalizadas de Vogt en condiciones *ex vivo* en el tejido conectivo subconjuntival (Park et al., 2015b).

Por otro lado, entre las estructuras del limbo esclerocorneal encontramos también la malla trabecular que ha sido posible registrar mediante microscopía multifotónica en vivo, como se muestra en Figura 4.29a, de forma comparable a imágenes observadas previamente en condiciones *ex vivo* (Figura 4.29b). Ésta, como ya se ha indicado anteriormente, es una estructura clave en el proceso de drenaje del humor acuoso dentro de la cámara anterior junto con las células del tejido yuxtacanalicular (Figura 4.30a) adheridas al canal de Schlemm. Un mal funcionamiento de este sistema de drenaje está relacionado con el aumento de la PIO en el glaucoma de ángulo abierto. Cambios en la malla trabecular relacionados con el glaucoma han sido estudiados ampliamente (Abu-Hassan et al., 2014; Tektas & Lütjen-Drecoll, 2009) con una disminución de las células de la malla trabecular, particularmente, en la región yuxtacanalicular (Abu-Hassan et al., 2014).



**Figura 4.34.** Vista frontal del ojo humano (a), imagen ampliada del limbo esclerocorneal (b) y esquema del proceso de proliferación y migración de las células epiteliales en la córnea (c). Adaptada de (Haagdorens et al., 2016).

Las imágenes mostradas en este capítulo son ejemplos del potencial clínico de la microscopía multifotónica aplicada al ojo humano. La resolución y la calidad de imagen proporcionadas por el microscopio compacto son suficientes como para aportar resultados comparables a los microscopios multifotónicos, usados en condiciones *ex vivo*, y a los actuales instrumentos empleados en condiciones en vivo en el ámbito clínico, como son la OCT o la microscopía confocal, con el añadido fundamental de que se puede visualizar el colágeno sin necesidad de procesos de tñido.





# Capítulo 5

## Deconvolución de imágenes multifotónicas

A pesar de las ventajas del uso de la microscopía multifotónica, las imágenes pueden verse degradadas debido al efecto de las aberraciones y el *scattering*, empeorando las condiciones cuando registramos imágenes en vivo, debido a los movimientos involuntarios del ojo. Un procedimiento de mejora de imágenes puede ser vía *hardware* (con óptica adaptativa (Skorsetz et al., 2016), máscaras de fase (Saavedra et al., 2009) y compresión de pulsos (Skorsetz et al., 2018)), durante el proceso de registro, o vía *software* mediante procesos de deconvolución *a posteriori* sobre imágenes ya registradas.

En este capítulo se muestran los resultados del uso del algoritmo de deconvolución ciega marginal para la mejora de las imágenes registradas en condiciones *ex vivo* y en vivo.

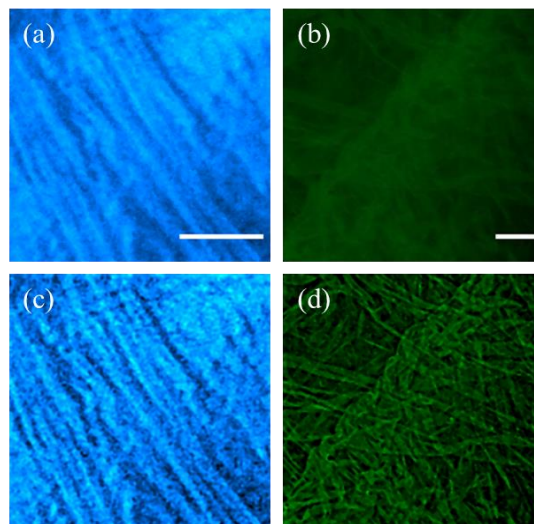


## 5.1. Deconvolución de imágenes multifotónicas de muestras *ex vivo*

En primer lugar, a modo de prueba de concepto, se aplicó el proceso de deconvolución a imágenes tanto de tejido corneal *ex vivo* de diferentes modelos animales (águila (#1), pollo (#2), bovino (#3), conejo (#4), cerdo (#5)), como a muestras humanas (córnea (#6) y membrana epirretiniana (#7)) (véase Tabla 2.2).

Con el fin de evaluar de manera objetiva la mejora en las imágenes tras la deconvolución se calcularon diferentes parámetros asociados directamente con la señal no lineal (intensidad, SNR) y con la detección de detalles (acutancia, contraste local, SDQI y *sharpness* o nitidez). También se aplicaron rutinas de detección y análisis de estructuras. Los resultados se analizaron estadísticamente con el *software* R-Studio.

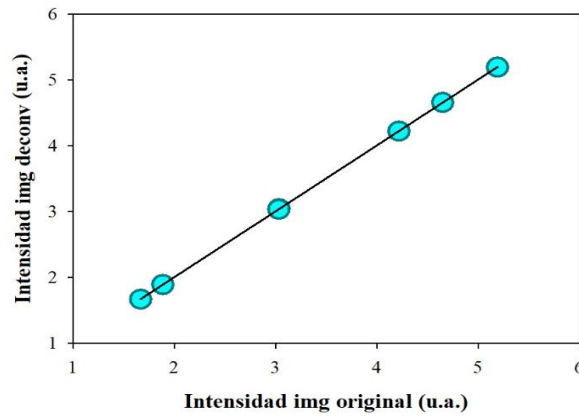
Como ejemplo representativo inicial, en la Figura 5.1 se comparan las imágenes originales y deconvolucionadas en dos de las muestras (córnea humana y membrana epirretiniana). A simple vista se puede apreciar la mejora de las imágenes tras la deconvolución y cómo los detalles (bordes y estructuras) aparecen claramente más definidos.



**Figura 5.1.** Imágenes originales (a, b) y deconvolucionadas (c, d) de la una córnea humana y una membrana epirretiniana, que proporcionan señales SHG y TPEF respectivamente. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

En el caso de la córnea humana (Figura 5.1a y 5.1d), aunque las fibras de colágeno eran ya visibles en la imagen original, tras la deconvolución aparecen más definidas. En el caso de la imagen de la membrana epirretiniana (Figura 5.1.b y 5.1d), sólo es posible ver la estructura en la imagen deconvolucionada.

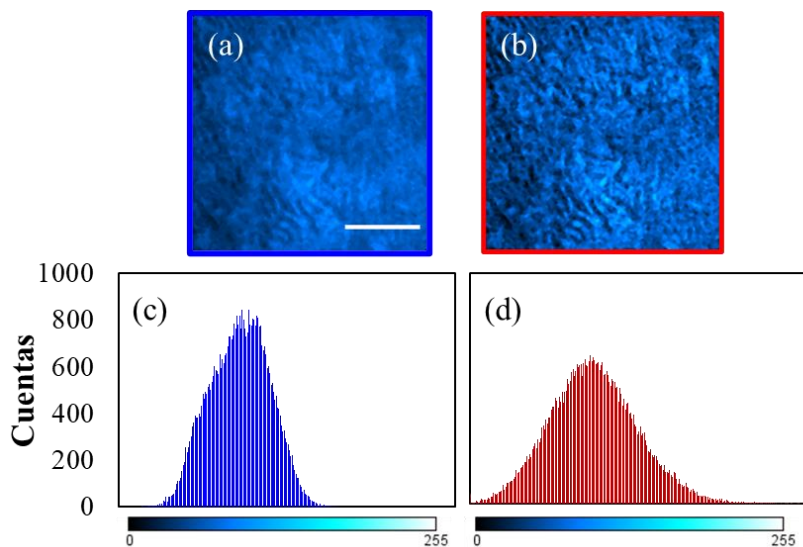
Este procesado no modifica la intensidad total de la imagen, es decir, la energía se conserva como se puede observar en la Figura 5.2, por ello, la pendiente de la recta de ajuste es 1.



**Figura 5.2.** Relación lineal significativa ( $R = 1.00$ ,  $p < 0.0001$ ) entre intensidad no lineal total de las imágenes originales (eje X) y las deconvolucionadas (eje Y).

### 5.1.1. Impacto de la deconvolución en la calidad de imagen

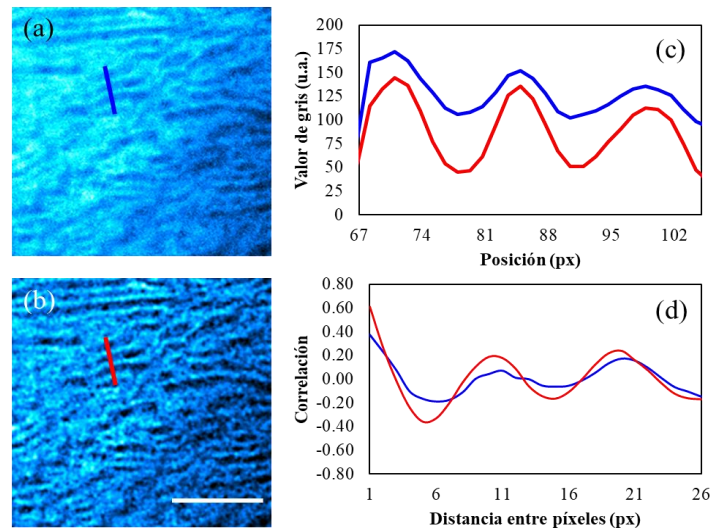
Desde un punto de vista cuantitativo, la mejora en la calidad de imagen tras la deconvolución se puede observar en los histogramas de las imágenes SHG de la Figura 5.3 (córnea de cerdo). El histograma correspondiente a la imagen deconvolucionada se “abre”, y la distribución de los niveles de gris en la imagen redistribuye. Es por ello que aumenta el contraste y las imágenes son de mejor calidad incluso a simple vista. A pesar de estos cambios notables en el histograma, la intensidad total se conserva como se ha mostrado en la figura precedente.



**Figura 5.3.** Imagen original (a) y deconvolucionada (b) de una córnea de cerdo con sus respectivos histogramas (en azul el de la imagen original (c); en rojo el de la deconvolucionada (d)). Longitud de la barra: 50  $\mu\text{m}$ .

Para redundar en este aumento del contraste a un nivel más local, se puede calcular directamente un perfil de intensidad que ponga de manifiesto una mejor visualización de las fibras. A modo de ejemplo, la Figura 5.4 presenta las imágenes SHG original (5.4a) y

deconvolucionada (5.4b) en el caso de una córnea de bovino. De nuevo, los detalles son más pronunciados en la imagen reconstruida.



**Figura 5.4.** Ejemplo de imágenes SHG original (a) y deconvolucionada (b) en una córnea de bovino (profundidad:  $350\mu\text{m}$ ). (c) Perfiles de intensidad a lo largo de los segmentos marcados sobre las imágenes. (d) Gráfica de la correlación para el cálculo de la densidad y tamaño local de las fibras. Barra de escala:  $50\mu\text{m}$ .

Se ha realizado un perfil de intensidad local en ambas imágenes SHG de la Figura 5.4 (segmentos azul y rojo; Figuras 5.4a y 5.4b). El aumento del contraste tras el proceso de deconvolución es visible a simple vista. Cuantitativamente pasa de 0.4 en la imagen original a 0.7 en la imagen deconvolucionada, lo que supone que un aumento de un 80%.

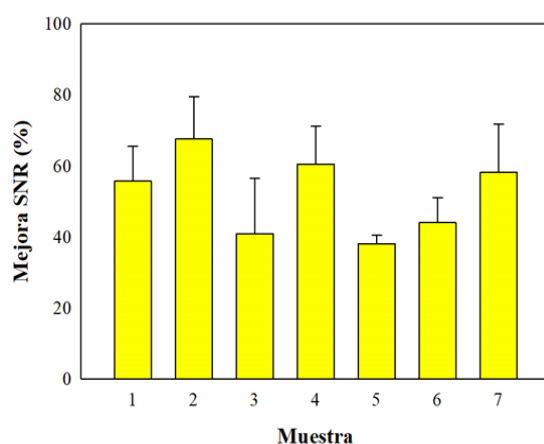
En esa misma zona se ha calculado el tamaño de las fibras de colágeno mediante el procedimiento expuesto en el apartado 2.2.4. La gráfica de la Figura 5.4d muestra el parámetro de autocorrelación en función de la distancia entre píxeles. Así, el tamaño de las fibras resulta ser de  $7.7\pm 1.9\ \mu\text{m}$  para la imagen original y de  $6.8\pm 0.8\ \mu\text{m}$  en el caso de la imagen deconvolucionada. Esta diferencia ( $\sim 12\%$ ) implica la mayor precisión en el cálculo del espesor de las fibras en la imagen que presenta una mejor calidad.

De forma adicional, para cada par de imágenes original-deconvolucionada se obtuvieron los valores de acutancia, SDQI y nitidez como métodos objetivos para evaluar la calidad de imagen. En la Tabla 5.1 se recogen los valores medios de las métricas de acutancia y SDQI para ambos conjuntos de imágenes. Para todas las muestras y métricas, las diferencias entre los valores de las imágenes originales y deconvolucionadas fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ). El aumento en la acutancia fue, como mínimo, x6 veces mayor en las imágenes deconvolucionadas. En el caso de la SDQI se observa una mejora mínima de x3. En el caso de otras métricas como la nitidez y el contraste, el comportamiento fue similar y las diferencias entre ambos grupos de imágenes fueron también significativas.

**Tabla 5.1.** Resumen de los valores de acutancia y SDQI promediados para las muestras estudiadas. Los errores indican la desviación estándar de la media para toda la serie de imágenes de cada muestra.

Muestra	Acutancia			SDQI		
	Original	Deconvolucionada	$p$	Original	Deconvolucionada	$p$
#1	7.3±2.5	39.0±10.4	<0.001	35.2±12.8	89.7±13.4	<0.001
#2	1.3±1.2	31.3±2.7	<0.001	17.8±8.0	118.2±30.1	0.004
#3	2.6±1.5	11.8±8.4	0.008	12.9±3.6	51.9±19.2	<0.001
#4	1.0±0.6	78.7±3.7	<0.001	14.2±3.8	60.6±14.3	<0.001
#5	8.9±0.5	52.0±9.7	0.003	8.9±1.1	32.8±1.2	<0.001
#6	2.3±0.11	16.1±4.8	<0.001	5.2±1.5	21.1±2.3	<0.001
#7	0.4±0.1	18.8±4.2	0.002	5.7±2.9	37.7±16.4	<0.001

Es interesante también mostrar lo que ocurre con la SNR por ser ésta una métrica que mide la relación existente entre la señal de la imagen y el ruido de fondo, de tal forma que habrá tanto más ruido cuanto peor sea la calidad de la imagen (Figura 5.5). Para las muestras que nos ocupan, la mejora en la SNR de las imágenes reconstruidas se encuentra entre un 40% y un 67% en promedio.

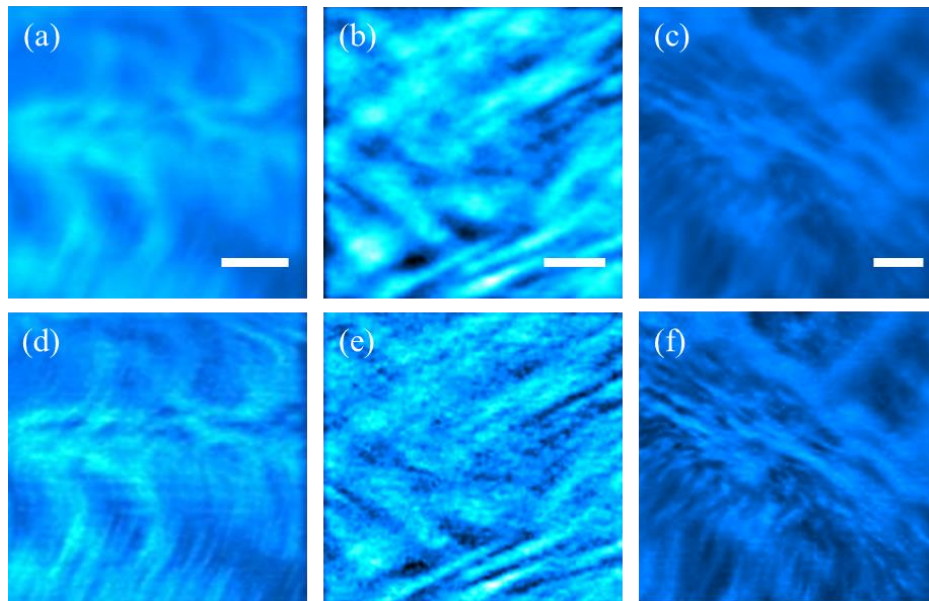


**Figura 5.5.** Incremento (en %) de la SNR de las imágenes deconvolucionadas con respecto a las originales. Cada barra representa el valor medio para cada muestra (junto con la desviación estándar).

## 5.2. Deconvolución de imágenes multifotónicas de muestras en vivo

En la Figura 5.6 se muestran ejemplos de imágenes registradas en vivo (fila superior) y las correspondientes imágenes deconvolucionadas (fila inferior) de diferentes estructuras oculares: esclera, córnea y limbo esclerocorneal. En las imágenes originales, las estructuras, aunque visibles, no están tan definidas como en las imágenes *ex vivo*. Por su parte, en las deconvolucionadas se aprecia un mayor grado de detalle y la morfología de los tejidos se visualiza mejor, lo que permite incluso distinguir fibras individuales que en algunos casos no era posible apreciar. En las imágenes de la córnea (ápex y zona limbar) se puede incluso

observar de forma más evidente el entrecruzamiento de las fibras de colágeno. Como ya ocurría con las imágenes *ex vivo*, la operación de deconvolución mantiene constante la energía.



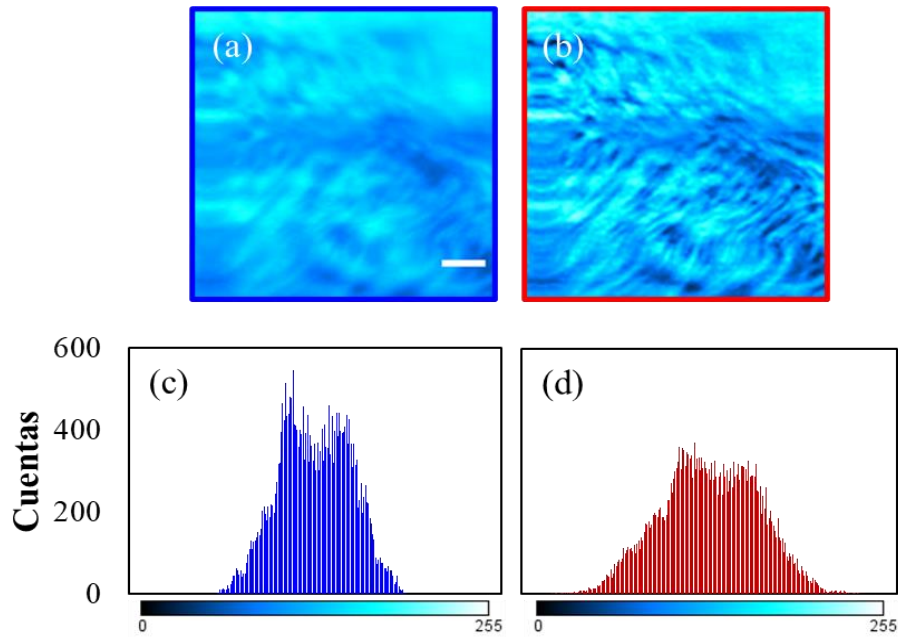
**Figura 5.6.** Imágenes originales (a-c) y deconvolucionadas (d-f) de diferentes estructuras del ojo humano en vivo: esclera (a, d), ápex corneal (b, e) y limbo esclerocorneal (c, f). Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.1. Impacto de la deconvolución en la calidad de imágenes en vivo

En la Figura 5.7 se muestra la mejora objetiva en la calidad de imagen a través de los correspondientes histogramas. Las imágenes corresponden a la zona del limbo esclerocorneal. De nuevo, como ya se apuntaba en los resultados mostrados en la Figura 5.3, el histograma de la imagen deconvolucionada es más ancho, lo cual va asociado a un aumento del contraste en la imagen y la posibilidad de visualizar las fibras de colágeno apenas visibles en la imagen original.

Para las imágenes registradas en vivo también se ha llevado a cabo una evaluación de la calidad de las imágenes mediante diferentes métricas, tales como SDQI, acutancia y SNR. Como era de esperar, se ha encontrado una mejora de las imágenes en vivo tras usar el método de deconvolución. Dicha mejora es, como mínimo, x2 para la acutancia y del 20% la métrica SDQI. La Tabla 5.2 se resumen los datos obtenidos, donde se han promediado todos los valores de ambas métricas de todas las imágenes, tanto originales como reconstruidas. Las diferencias entre ambos grupos de imágenes fueron siempre estadísticamente significativas.



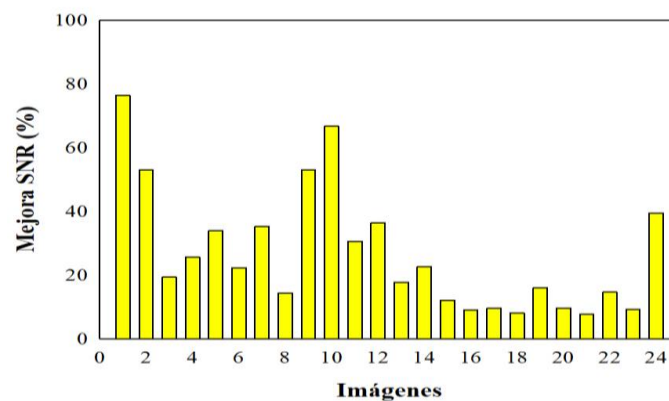


**Figura 5.7.** Imágenes SHG en vivo del limbo esclerocorneal: original (a) y deconvolucionada (b). Los histogramas en azul (c) y rojo (d) corresponden a la imagen original y deconvolucionada respectivamente. Longitud de la barra de escala: 50 $\mu$ m.

**Tabla 5.2.** Resumen de los valores de acutancia y SDQI promediados para las originales y deconvolucionadas. Los errores indican la desviación estándar de la media de la métrica en toda la serie de imágenes.

Métrica	Original	Deconvolucionada	p
Acutancia	3,8 $\pm$ 2,6	30,9 $\pm$ 10,3	<0,001
SDQI	11,3 $\pm$ 6,2	22,4 $\pm$ 7,3	<0,001

Como es de esperar, el análisis de la SNR va en la misma dirección como bien muestra la Figura 5.8. Para esta métrica las mejoras estuvieron en el rango entre un 8% y un 80%, como se puede comprobar esta mejora depende de la imagen particular que se está observando.



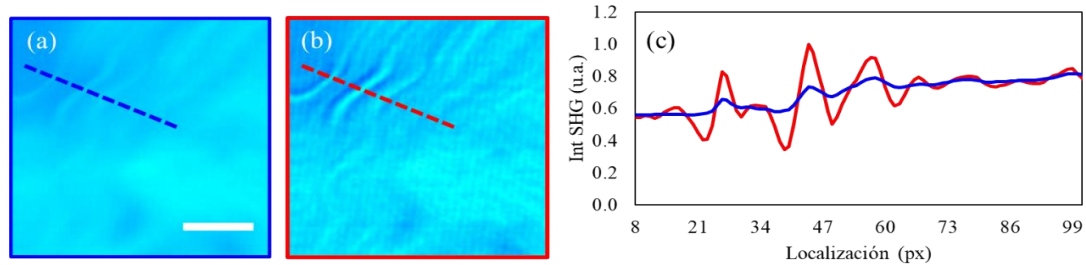
**Figura 5.8.** Mejora en la SNR (en %) de las imágenes multifotónicas del ojo en vivo (deconvolucionadas vs. originales).

### 5.2.2. Análisis de la estructura

La Figura 5.9 muestra un ejemplo de imágenes SHG donde los detalles son sensiblemente más visibles en la imagen deconvolucionada. En los perfiles de intensidad se puede observar

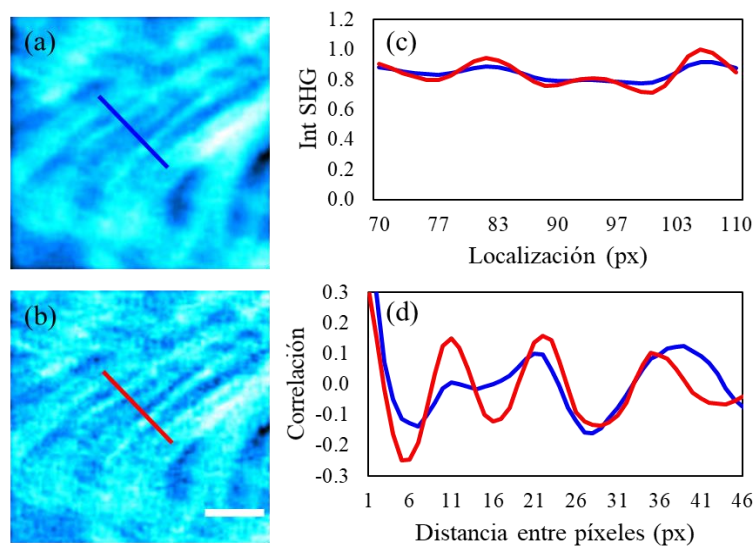


de nuevo un aumento notable del contraste local y por tanto una mejor visualización de las estructuras. En particular, los contrastes locales fueron respectivamente, 0.16 y 0.44, lo que supone una imagen deconvolucionada con un contraste local casi tres veces mayor que el de la original.



**Figura 5.9.** Ejemplo de imágenes SHG original (a) y deconvolucionada (b) de la esclera en vivo. La gráfica (c) presenta los perfiles de intensidad a lo largo de los segmentos marcados sobre las imágenes.

En el ejemplo de la Figura 5.10 se comparan imágenes SHG del estroma corneal en vivo. En los segmentos marcados sobre dichas imágenes se han calculado tanto los perfiles de intensidad como el tamaño de las fibras de colágeno.

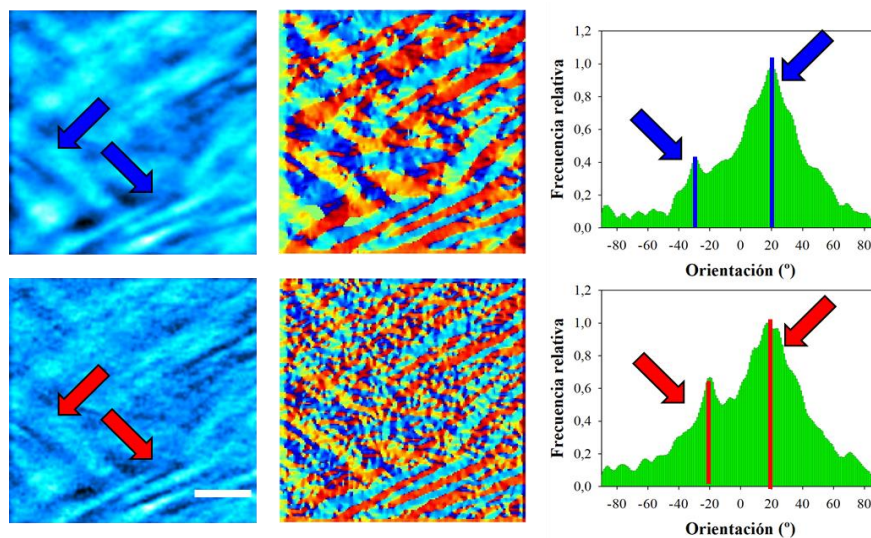


**Figura 5.10.** Imágenes SHG de la córnea en vivo: original (a) y deconvolucionada (b). (c) Perfiles de intensidad a lo largo de los segmentos marcados sobre las imágenes. (d) Correlación para el cálculo de la densidad y tamaño local de las fibras. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

En este caso, aunque las fibras pueden observarse a simple vista en las imágenes originales, la detección cuantitativa mediante el perfil de intensidad mejora en la imagen deconvolucionada. Teniendo en cuenta los datos del perfil de intensidad, el tamaño de las fibras que se detectan en la imagen original es de 23.11  $\mu\text{m}$ , mientras que en las deconvolucionadas es de 18.09  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, a partir de los datos de la correlación, los tamaños de las fibras serían respectivamente  $20.67 \pm 4.19 \mu\text{m}$  y  $17.38 \pm 1.44 \mu\text{m}$ .

Por otra parte, el aumento en la calidad de la imagen multifotónica para una mejora de la visualización de estructuras de interés también puede optimizar el análisis del nivel de organización de la estructura, lo cual como ya se ha comentado puede ir estrechamente ligado a estados patológicos (Ávila et al., 2019).

Para analizar si existen diferencias a la hora de detectar el grado de orden estructural de las imágenes originales y deconvolucionadas se ha usado el TdE. La Figura 5.11 presenta las imágenes SHG de la córnea humana en vivo en la zona del ápex junto con los resultados del TdE. La distribución es organizada, como le corresponde a un tejido corneal humano sano (Bueno et al., 2011). Tanto en la imagen original como en la reconstruida (también en los mapas de OP asociados) se puede observar la estructura entrecruzada con dos OPs. Sin embargo, estas dos direcciones dominantes están más marcadas en el histograma de la imagen deconvolucionada (flechas rojas) que en el de la imagen original (flechas azules). Por su parte, la DS en el caso de la imagen deconvolucionada es  $27\pm 1^\circ$ , frente a los  $22\pm 1^\circ$  de la imagen original. En este caso, la diferencia es pequeña y ambas imágenes tienen un grado de orden similar. Sin embargo, esto podría cambiar si la estructura de la que se ha hecho imagen presenta una mayor desorganización (véase por ejemplo el apartado 6.4.3).

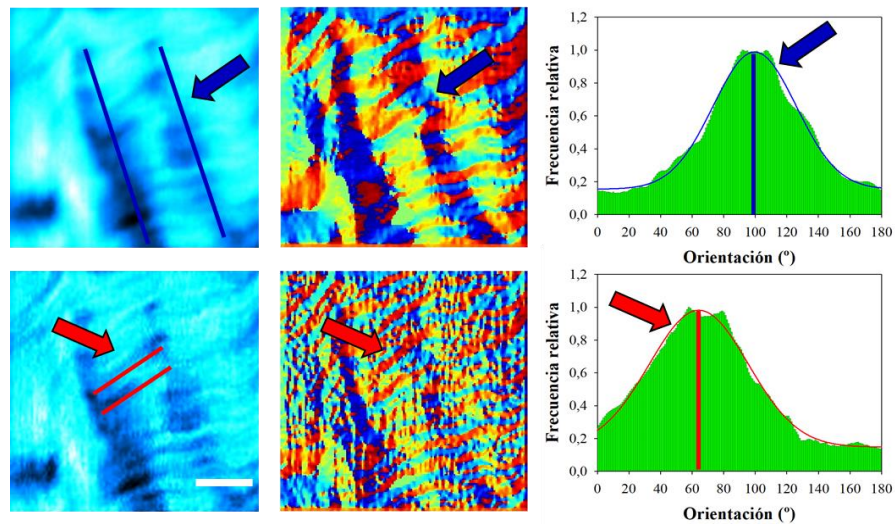


**Figura 5.11.** Imágenes SHG de la córnea humana en vivo: original (superior izquierda) y deconvolucionada (inferior izquierda). Mapas (centro) e histogramas de OP asociados (derecha).

Finalmente, es importante tener en cuenta un factor más. El agrupamiento de las fibras en la córnea y la esclera puede dar lugar a un cambio en el orden aparente si la imagen no cuenta con el suficiente nivel de detalle, como se puede observar en la Figura 5.12.

Este caso es bastante llamativo puesto que el TdE detecta las sombras longitudinales que aparecen en la imagen SHG original (marcadas con dos líneas y la flecha azul) como una OP en torno a  $99^\circ$  (flecha azul), pero básicamente obvia las fibras que cruzan la imagen

transversalmente. Por el contrario, en la imagen deconvolucionada estas fibras de menor tamaño son más visibles y se tornan relevantes, apareciendo una OP alrededor de  $64^\circ$  (flecha roja). Por su parte, la DS pasa de ser  $31\pm 3^\circ$  en la imagen original a  $26\pm 3^\circ$  en la deconvolucionada, lo que implica que las fibras detectadas están más ordenadas.



**Figura 5.12.** Imágenes SHG de la esclera humana en vivo: original (superior izquierda) y deconvolucionada (inferior izquierda). Mapas (centro) e histogramas de OP asociados (derecha).

### 5.3. Discusión

Los resultados aquí expuestos muestran una notable y evidente mejora de la calidad de imagen para ambas condiciones experimentales. Tiene lugar un aumento de los detalles y de la resolución al detectar fibras que en la imagen original no son posibles de visualizar. Independientemente de la métrica utilizada, las diferencias entre las imágenes originales y las reconstruidas fueron estadísticamente significativas (Tablas 5.1 y 5.2).

Es de interés destacar el análisis de las imágenes en vivo, pues en éstas las estructuras no están tan bien definidas originalmente como en el caso de las muestras estáticas. A pesar de ello el algoritmo es capaz de optimizar la visualización de las estructuras de colágeno y que éstas aparezcan mejor definidas, hecho que se ve reflejado en el aumento notable de las métricas de calidad (10x para acutancia y 2x para SDQI, en media).

Uno de los aspectos más importantes del proceso de deconvolución es el principio de conservación de energía, es decir, restaurar la imagen sin modificar la intensidad total de la misma. Este hecho ha sido también destacado por Christou y colaboradores como un elemento clave en la deconvolución de imágenes retinianas en vivo (Christou et al., 2004). Nuestro procedimiento demuestra conservar dicha energía (Figuras 5.2). Esto está corroborado por los histogramas, donde se observa una redistribución de los niveles de gris (ensanchamiento de la distribución), que a su vez lleva a un aumento del contraste (Figuras 5.3 y 5.7).

La mejora de imágenes multifotónicas de estructuras oculares es de importancia, no sólo desde el punto de vista fundamental sino en una posible aplicación en la determinación de ciertas patologías en etapas tempranas (Ávila et al., 2019a; Batista et al., 2018b; Lee et al., 2016; Mercatelli et al., 2017a). Algunas patologías pueden producir cambios en el colágeno afectando fundamentalmente al tamaño de las fibras, a la densidad y al grado de ordenación. Es por ello esencial una calidad de imagen optimizada que minimice errores en la determinación de estos parámetros estructurales con las diferentes métricas, herramientas y algoritmos aquí expuestos.

En ese sentido, la imagen deconvolucionada permite una mejor definición de las fibras que componen el tejido de tal forma que los perfiles de intensidad locales aparecen claramente mejorados, a pesar de que a veces son prácticamente indistinguibles en las imágenes originales (como ejemplo véase la Figura 5.9 para ojos en vivo). Cuando se aplica al estudio el TdE la DS es menor en las imágenes deconvolucionadas, lo que conduce a una determinación más precisa de las OPs detectadas. Aunque esta diferencia no es significativa, los cambios pueden llegar a depender de la organización estructural de la muestra. En los casos aquí presentados, los tejidos son sanos y por tanto la DS es baja. Sin embargo, esto puede cambiar en tejidos patológicos o con daños externos (p.e., córneas con queratocono, queratitis, abrasiones, cicatrices, etc.). Así, en una imagen multifotónica degradada el cálculo del grado de ordenación podría subestimar o sobreestimar la presencia de un proceso patológico.

Una de las ventajas de la deconvolución sobre los métodos de optimización de imagen empleados comúnmente en microscopía, radica en que es un método de procesado, posterior al registro. Por ello, para intentar mejorar la señal de la imagen no es necesario cambiar los parámetros de registro a tiempo real, ni exponer al sujeto a tiempos de exposición mayores de los empleados aquí (aunque se siga estado dentro de los límites de seguridad).

El principal inconveniente de los métodos de deconvolución radica en la cantidad de incógnitas iniciales que hay en el cálculo. Lo ideal sería conocer la PSF del sistema y, a partir de ésta y la imagen original, restaurar el objeto. Sin embargo, en nuestro caso esta PSF no se conoce y se precisa de un algoritmo de deconvolución ciega. Como cabe esperar, este método requiere de un tiempo de procesado mayor, pero tiene la ventaja añadida de que se realiza sin supervisión (Blanco & Mugnier, 2011).

Las técnicas de deconvolución han sido utilizadas en el campo de la Oftalmología (Ávila et al., 2021; Nourrit et al., 2005). En particular, su aplicación en microscopía permite compensar los efectos del ruido y las aberraciones, sobre todo al registrar imágenes de muestras gruesas (Murray, 2011). En microscopía de fluorescencia ha permitido reducir la señal procedente de

planos fuera de foco (Biggs, 2010; McNally et al., 1999) cuya contribución deterioran notablemente la imagen por la reducción del contraste debido a la contribución de la luz de planos fuera del de interés.

Periasamy et al. compararon el efecto de la deconvolución en imágenes a diferentes profundidades del tejido con microscopía de fluorescencia, confocal y TPEF, conocida la PSF para cada instrumento calculada a partir de bolas (beads) fluorescentes de menos de 0.1  $\mu\text{m}$  (Periasamy et al., 1999). Sus resultados muestran que las imágenes TPEF deconvolucionadas resultaban ser mejores que las correspondientes a las de microscopía fluorescencia y confocal. Más recientemente también se ha usado la deconvolución ciega en microscopía SHG (Sivaguru et al., 2017a, 2017b), consiguiendo un aumento de la resolución que permite aumentar la precisión en la evaluación cuantitativa de imágenes.

La posibilidad de usar métodos de deconvolución para mejorar la calidad, visualización y resolución de las imágenes multifotónicas registradas tanto en condiciones ex vivo como in vivo, permitiría una evaluación más precisa de la distribución de las estructuras de colágenos tanto en tejidos sanos como en los afectados por alguna patología. Esta optimización de las imágenes podría ser de gran utilidad en el diagnóstico clínico, puesto que, en sus etapas iniciales, algunas patologías corneales afectan al estroma posterior, donde los efectos de las aberraciones y *scattering* son mayores. También sería de utilidad en la visualización de capas internas de la esclera, en la que, al ser un tejido opaco, la capacidad de registrar imágenes multifotónicas en capas más profundas se notablemente limitada por la reducción de la señal.



# Capítulo 6

## Mejoras de imágenes de segundo armónico usando luz polarizada radial

En microscopía SHG la visualización de estructuras biológicas puede verse afectada por el estado de polarización de la luz incidente (Gusachenko et al., 2012). En particular en los tejidos formados por fibras de colágeno, la señal SHG depende de la orientación relativa entre dicha fibras y el estado de polarización de la luz incidente (Stanciu et al., 2017).

La polarización que se emplea de forma habitual en microscopía SHG se conoce como espacialmente homogénea (linear, circular o elíptica). Sin embargo, estados de polarización espacialmente variable como son los casos de luz radial o azimutal (conocidos por el término en inglés *vector beams*) (Zhan, 2009) están siendo de particular interés en microscopía. Esto se debe a sus propiedades particulares de enfoque (Dorn et al., 2003), ligadas a la aparición de una componente longitudinal no despreciable del campo eléctrico paralela al eje óptico del sistema (Quabis et al., 2000).

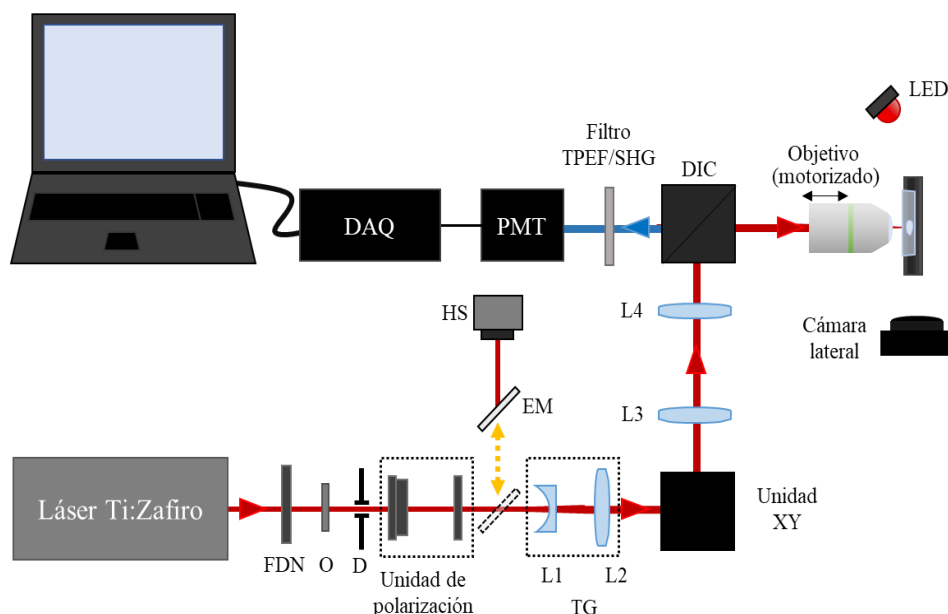
En este capítulo se realiza un análisis detallado del comportamiento de la luz polarizada radialmente en microscopía SHG mediante la caracterización de la calidad de las imágenes registradas. Estas imágenes se comparan con las obtenidas empleando polarización circular que, a diferencia de la luz polarizada linealmente, tiene una distribución simétrica y, por tanto, la intensidad de la señal emitida por la muestra no se vería afectada por la orientación de las fibras de colágeno dentro de la misma (Stanciu et al., 2017).





## 6.1. Sistema experimental y lámina *S-waveplate*

En el Capítulo 2 ya se describió en detalle el sistema experimental utilizado (Figura 2.1). La única salvedad con respecto a esa configuración general es que en el camino de entrada se le ha incorporado una unidad de polarización, como se ha representado en la Figura 6.1.

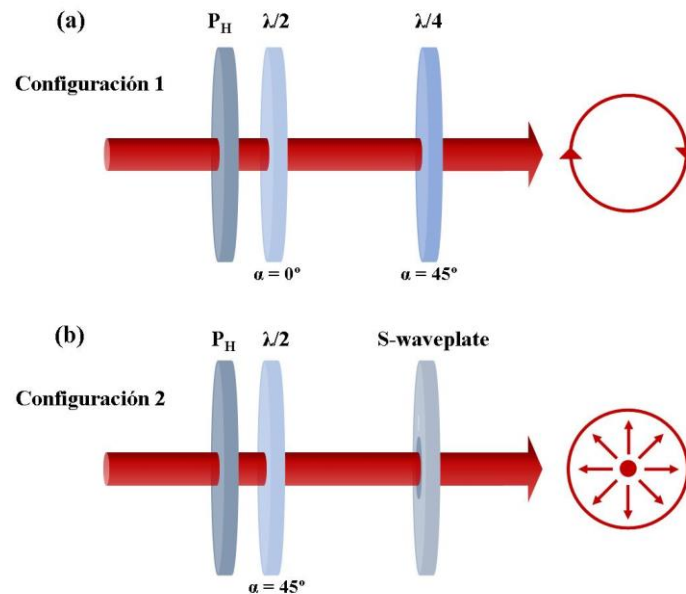


**Figura 6.35.** Microscopio multifotónico compacto que incorpora una unidad de polarización en el brazo de iluminación (ver detalles en el texto). El resto de los componentes están descritos previamente en la Figura 2.1.

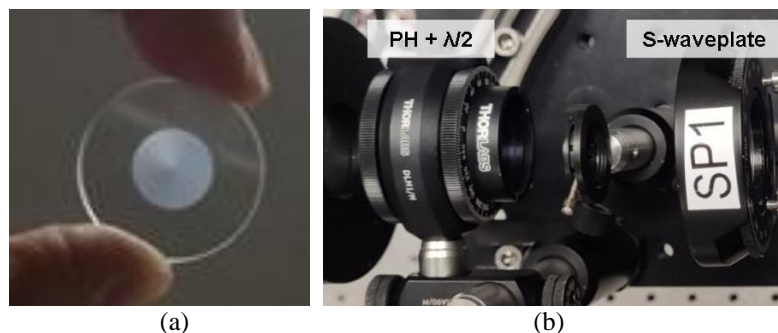
La unidad de polarización tiene una doble configuración que permite obtener dos estados de polarización diferentes, tal y como se muestra de forma esquemática en la Figura 6.2. La configuración 1 (Figura 6.2a) está formada por un polarizador lineal horizontal ( $P_H$ ), una lámina de media onda ( $\lambda/2$ ) con su eje a  $0^\circ$  y una lámina de cuarto de onda ( $\lambda/4$ ) con su eje a  $45^\circ$ . Esta configuración se usó para generar luz polarizada circular. Para la configuración 2 (Figura 6.2b), se retiró la  $\lambda/4$ , se rotó la  $\lambda/2$  para que su eje quedase a  $45^\circ$  y se introdujo una lámina *S-waveplate* (Altechna R&D, Vilnius, Lithuania).

Esta *S-waveplate* (Figura 6.3) es un convertor de polarización nano-estructurado que tiene unas propiedades de birrefringencia capaces de transformar luz polarizada lineal en radial o azimutal (Beresna et al., 2011a; 2011b). También se puede utilizar para generar vórtices ópticos. Sus dimensiones físicas son 1 pulgada de diámetro total (25.3 mm), 3 mm de espesor y una zona activa de 10 mm. Su límite de daño es hasta 100 veces superior al de un modulador espacial de cristal líquido, por lo cual se puede utilizar sin problema alguno con un láser pulsado como el aquí empleado. En este trabajo se ha usado la *S-waveplate* para generar luz polarizada radial, con lo cual, la polarización lineal que incide sobre ella debe ser vertical. Según el fabricante, la eficiencia en la generación de este tipo de polarización es cercana al 100% para

la longitud de onda utilizada. Por otro lado, la transmisión de la lámina depende de la longitud de onda (30-90%) que para el presente caso es del 70%.



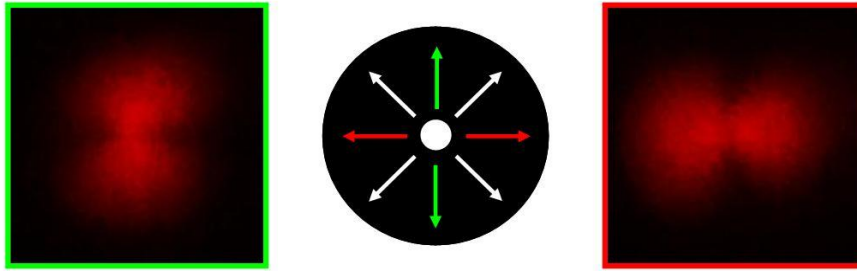
**Figura 6.36.** Descripción esquemática de la unidad de polarización usada para el propósito de este capítulo. (a) Configuración 1 [generación de luz polarizada circular dextrógira]:  $P_H$ ,  $\lambda/2$  a  $0^\circ$  y  $\lambda/4$  a  $45^\circ$ . (b) Configuración 2 [generación de luz polarizada radial]:  $P_H$ ,  $\lambda/2$  a  $45^\circ$  y S-waveplate.



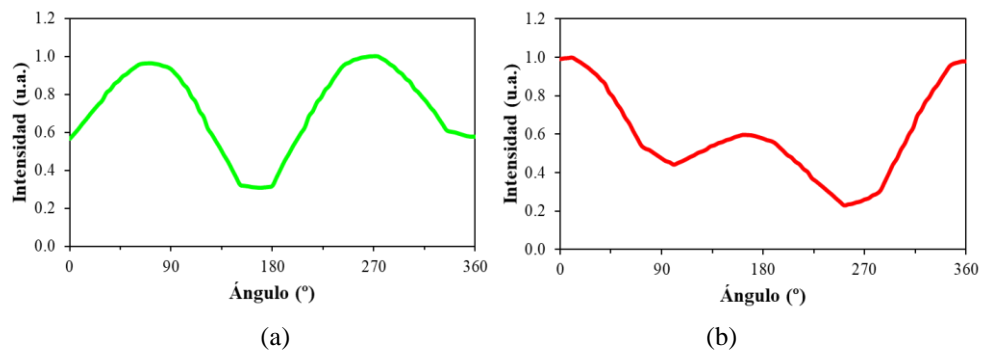
**Figura 6.37.** (a) S-waveplate, donde se puede apreciar claramente la menor transmitancia de la zona activa donde se lleva a cabo la generación del estado de polarización radial. (b) Configuración 2 de la unidad de polarización.

Para el correcto funcionamiento de este elemento óptico es necesario alinear el centro geométrico de la lámina con el haz láser que la atraviesa. Además, hay una marca de alineamiento que ha de ser paralela a la polarización lineal incidente para que se genere luz polarizada radialmente. Para comprobar que se consigue una correcta disposición de la unidad de polarización en la configuración 2 (Figura 6.3.a), en la posición del objetivo del microscopio (retirando éste) se colocó un segundo polarizador lineal como analizador, una pantalla y una cámara CCD. Cuando el sistema está bien alineado, si la luz emergente es radial y el analizador es vertical, sobre la pantalla aparecerá un patrón característico en forma de pajarita vertical (Figura 6.4) (Hernández-García et al., 2017). Al girar el analizador, el patrón ha de girar de

forma simétrica para todos los ángulos. En la Figura 6.5 se incluyen los perfiles de intensidad de los patrones mostrados en la Figura 6.4. Las ventajas de emplear la lámina *S-waveplate* son, por una parte, la facilidad para implementarla en el sistema y, por otra, su calibrado.



**Figura 6.38.** Patrón de intensidad característico de un haz polarizado radialmente cuando se utiliza un analizador vertical (izquierda) y horizontal (derecha).



**Figura 6.39.** Perfil radial del patrón de intensidad al usar un analizador vertical (a) y horizontal (b).

## 6.2. Muestras, registro de imágenes y métricas de calidad

Con el sistema experimental descrito en el apartado anterior se registraron imágenes SHG de tejidos oculares de diferentes modelos animales en condiciones *ex vivo*: córnea de conejo (muestra #1), cornea de bovino (muestra #2), cornea de cerdo (muestra #3) y esclera de pollo (muestra #4).

Para minimizar los efectos del *photobleaching* en la zona del tejido a estudiar, se realizó una comprobación preliminar para determinar la mínima potencia del haz necesaria para conseguir una imagen SHG en condiciones suficientemente buenas para poder procesarse. Una vez hechas estas comprobaciones preliminares se procede al registro de imágenes SHG a diferentes profundidades, primero con la configuración 1 (polarización circular) y después con la configuración 2 (polarización radial).

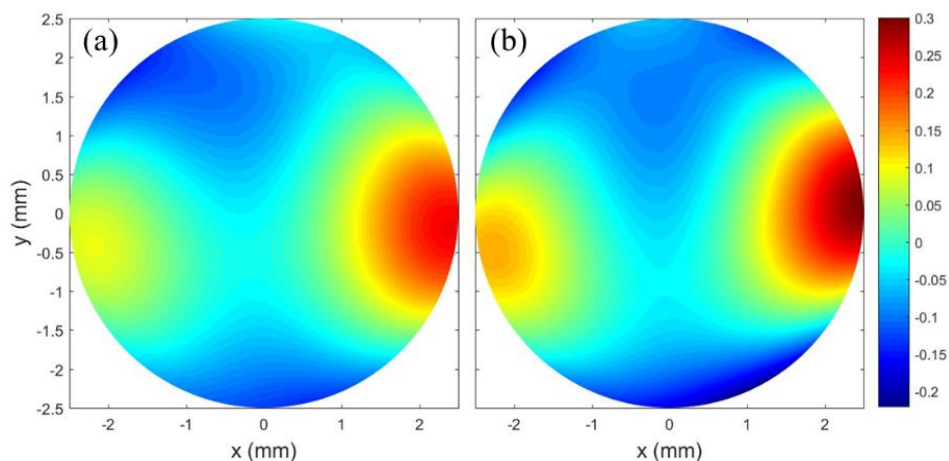
En concreto, para cada localización en profundidad de los tejidos se tomaron series de tres imágenes SHG secuenciales. Con el objeto de reducir ruido, la imagen final utilizada fue el promedio de dichas tres. Los espaciados en la dirección en profundidad fueron 20  $\mu\text{m}$  para la muestra #1, 25  $\mu\text{m}$  en el caso de la muestra #2, en el caso de la muestra #3, 10  $\mu\text{m}$ , y 5  $\mu\text{m}$  para

la #4. El tamaño de todas las imágenes fue de  $180 \times 180 \mu\text{m}^2$ , con una resolución de  $256 \times 256 \text{px}^2$ . Para cada localización las imágenes se tomaron con ambas polarizaciones. Con el objeto de realizar comparaciones directas, las condiciones de registro de pares de imágenes fueron idénticas (salvo el estado de polarización). Así, para compensar la transmitancia de la *S-waveplate* e igualar la potencia de láser en el plano de la muestra con ambos modos de polarización, se usó el FDN (véase Figura 6.1).

Las métricas que se han utilizado para comparar las imágenes registradas con luz polarizada circular y radial han sido: la razón de intensidades, la acutancia y la SDQI. Además, haciendo uso de perfiles de intensidad en las imágenes, se estudió si existe una mejora en el contraste, la resolución y/o en la visualización de detalles. Para el análisis estadístico de las posibles diferencias entre los pares de datos de imágenes se usó R, con t-test.

### 6.3. Aberración de onda y estado de polarización del haz incidente

Una vez realizadas las comprobaciones sobre la unidad generadora de estados de polarización y antes de comenzar con el registro de imágenes, se evaluó si modificaciones en la unidad de polarización cambian la correspondiente aberración de onda. Para ello se introdujo un sensor de frente de onda Hartmann-Shack (WFS150-5C, Thorlabs) en el brazo de iluminación del sistema experimental valiéndonos de un espejo móvil (EM) como se indica en la Figura 6.1. A partir de las imágenes de Hartmann-Shack, se calcularon los frentes de onda expresados en polinomios de Zernike hasta el 4º orden, para una pupila de 5 mm (Bueno et al., 2009). La Figura 6.6 presenta un ejemplo de mapas de aberración de onda para haces polarizados radial y circularmente.



**Figura 6.40.** Mapas de aberración de onda para los haces polarizados radial (a) y circularmente (b).

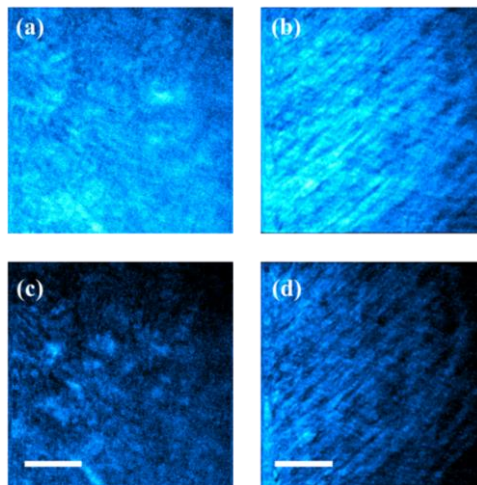
Se observa que los dos mapas son muy parecidos, lo que implica que los términos de aberración de onda apenas cambian al pasar el sistema del modo de polarización 1 al 2. Los valores de RMS total (del inglés *Root-Mean-Square*) para luz radial y circular fueron respectivamente 0.08 y 0.09  $\mu\text{m}$ , con dominancia por parte del término  $Z_2^{-2}$  (astigmatismo). Esto indica que las variaciones en la calidad de las imágenes SHG que se exponen en los apartados posteriores de este capítulo serán exclusivamente debidos a cambios en el estado de polarización incidente (puesto que la aberración se mantiene constante al cambiar de modo de polarización).

## 6.4. Resultados

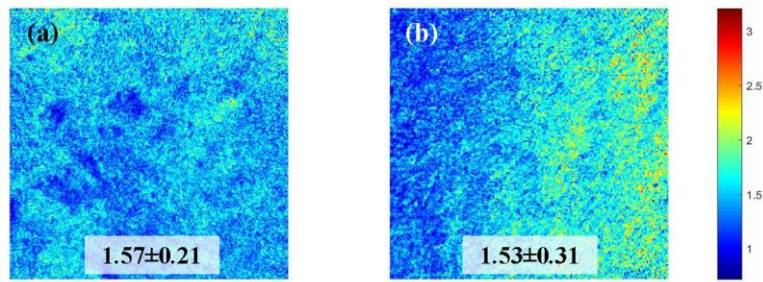
### 6.4.1. Efecto de la polarización de la luz en imágenes SHG

En la Figura 6.7 se muestran dos ejemplos de imágenes SHG registradas con luz polarizada radial (fila superior) y circular (fila inferior). Para poder realizar comparaciones directas, cada pareja de imágenes de la misma muestra está ajustada al máximo de intensidad total. Una visualización directa indica que, a pesar de la diferente organización de ambas muestras, la señal de SHG en las imágenes registradas con polarización radial es mayor que la de las imágenes obtenidas con polarización circular. Este comportamiento fue el mismo para el resto de las muestras involucradas en el experimento y osciló entre un 5% y un 100%, dependiendo tanto de la propia muestra como de la localización dentro de ella.

Para mostrar este hecho, en la Figura 6.8 se representan los mapas espacialmente resueltos del cociente de intensidades SHG (píxel a píxel) entre ambas polarizaciones para las muestras #1 y #4 junto con los valores promedio de dicho parámetro en toda la imagen,  $1.57 \pm 0.21$  y  $1.53 \pm 0.31$ , respectivamente. Estos resultados confirman ese aumento uniforme de la señal en las imágenes registradas con polarización radial.

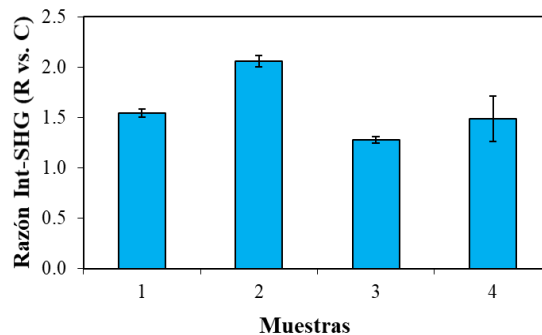


**Figura 6.41.** Imágenes SHG registradas con luz polarizada radial (a, b) y circular (c, d). Las imágenes corresponden a las muestras #1 (a, c) y #4 (b, d). Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6.42.** Mapas espacialmente resueltos del cociente radial/circular de la señal SHG de las imágenes de la figura precedente. Los valores indican la media calculada en toda la imagen junto con la desviación estándar.

Para cada muestra, la Figura 6.9 presenta los valores del cociente de intensidad SHG radial vs. circular promediados para todas las localizaciones (i.e. profundidad). Estos valores siempre fueron claramente mayores de 1 (un mínimo de 1.05 para la muestra #1).

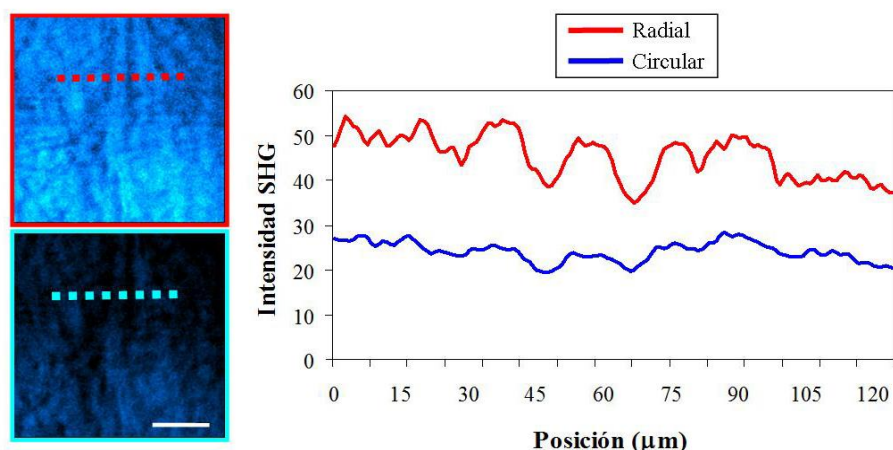


**Figura 6.43.** Razón de intensidades SHG radial (R) vs. circular (C) para las diferentes muestras. Las barras de error representan la desviación estándar del promedio para todas las profundidades.

Sin embargo, aunque es lo más común, los datos de intensidad SHG global no tiene porqué ir siempre asociados a una mejora en la calidad de imagen (Stanciu et al., 2017). Por esta razón se va a realizar un examen más detallado de la ventaja de usar luz polarizada radial. Para ello se han comparado perfiles de intensidad en zonas de interés de las imágenes. Estos perfiles nos darán información no sólo sobre el aumento de señal SHG, sino también sobre la mejora de la visualización local de los detalles y con ello el posible aumento de resolución.

La Figura 6.10c muestra los perfiles de intensidad local de la muestra #2 (un plano de profundidad 75  $\mu\text{m}$ ), de la zona marcadas en las imágenes SHG tomadas con polarización radial (panel superior) y circular (panel inferior). El aumento de la señal SHG local con luz radial es evidente en ambas gráficas (>80%). Sin embargo, el perfil en rojo de la gráfica de la derecha muestra que con dicha polarización se puede apreciar detalles estructurales que no aparecen en el perfil local en azul de la luz circular. Esto es debido a un aumento del contraste (14%) y la resolución debido al uso de dicho estado de polarización. Este hecho es coherente con los valores de acutancia (3.27 y 2.25) y SDQI (1.98 y 0.93).

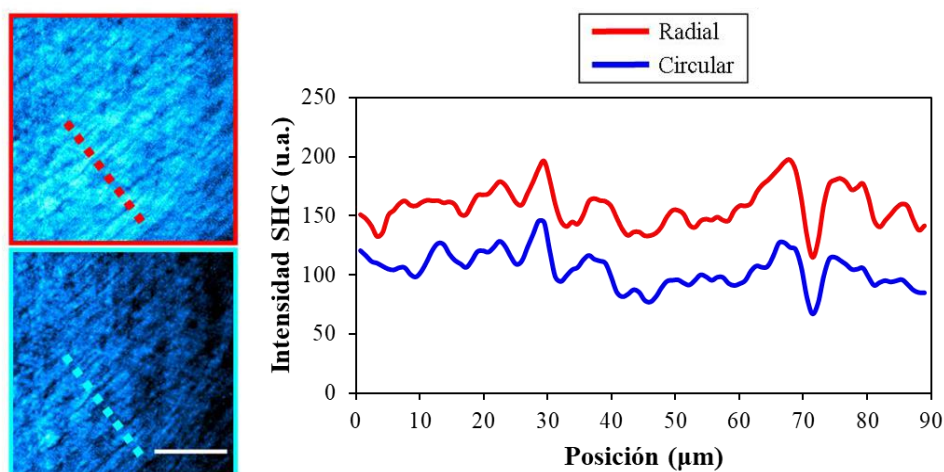




**Figura 6.44.** Perfiles de intensidad local de la muestra #2 para la zona marcada en las imágenes SHG. Las imágenes SHG se registraron con luz polarizada radial (arriba) y circular (abajo). Los datos están representados en rojo para la primera y en azul para la segunda. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

Los resultados de los perfiles locales para las otras dos muestras transparentes (#1 y #3) son similares, aunque las mejoras dependen de la muestra considerada. Concretamente para un plano a 120  $\mu\text{m}$  (60 $\mu\text{m}$ ) de profundidad de la muestra #1 (#3) las mejoras en acutancia y SDQI fueron 61% y 42% (44% y 21%).

Para un tejido opaco, como es la esclera (muestra #4), donde las fibras individuales aparecen más marcadas, la Figura 6.11 muestra las imágenes SHG para ambas polarizaciones junto con los perfiles de intensidad locales indicados. En este caso se puede apreciar que los perfiles tienen formas similares, aunque de nuevo la señal de SHG de la imagen con polarización circular es menor. En este caso la acutancia y la SDQI para luz radial (circular) fue de 41.41 (31.15) y 1.78 (0.69) respectivamente.



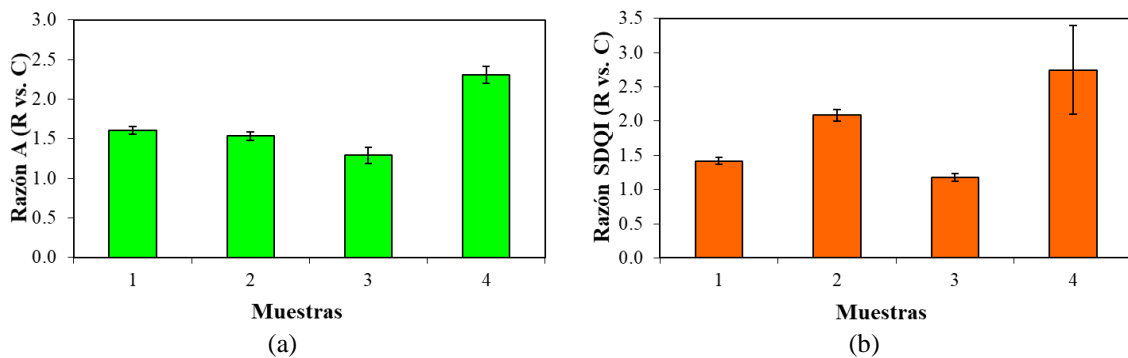
**Figura 6.45.** Perfiles de intensidad local de la muestra #4 en la zona marcada (rojo, luz radial; azul, luz circular). Las imágenes SHG corresponden a luz polarizada radial (a) y circular (b). La profundidad del plano es de 10  $\mu\text{m}$ . Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

En la Tabla 6.1 se pueden encontrar los valores agrupados de acutancia y SDQI para las diferentes muestras. Estos valores son resultado del promediado de todo el *stack* de imágenes obtenidas por cada muestra (para distintas profundidades) y tipo de polarización. Para cada serie de datos se realizó una evaluación mediante t-test de poblaciones pareadas, que evalúa si la media de las diferencias es significativamente diferente. De forma previa se realizó el test de normalidad Shapiro-Wilk y el test de homogeneidad de Bartlet, para determinar si es posible realizar la prueba t-test en los datos estudiados. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) en la mejora de los parámetros de calidad de las imágenes obtenidas con polarización radial con respecto a las de polarización circular.

**Tabla 6.1.** Valores de acutancia y SDQI promediados para las muestras estudiadas con los dos estados de polarización (radial y circular). Los errores indican la desviación estándar de la media de la métrica en toda la serie de imágenes. ‘\*\*\*’  $p < 0,001$ , ‘\*\*’  $p < 0,01$ , ‘\*’  $p < 0,05$ .

Muestra	Acutancia			SDQI		
	Circular	Radial	p	Circular	Radial	p
#1	36,27±8,28	58,13±13,35	< 0,001	9,60±0,95	13,63±1,63	< 0,001
#2	18,89±2,36	28,95±2,15	< 0,001	4,34±0,29	8,96±0,45	< 0,001
#3	21,95±1,16	29,42±2,03	< 0,001	11,62±1,84	13,53±1,70	< 0,036
#4	10,59±2,59	24,19±4,71	< 0,001	10,96±2,80	28,69±2,18	< 0,001

Para un análisis visual directo, en la Figura 6.12 se han representado los “ratios” radial vs. circular de acutancia y SDQI promediados para cada muestra en todas las profundidades. Para todas ellas los valores son mayores que 1, lo cual es representativo de las ventajas de usar luz polarizada radial.



**Figura 6.46.** Valores promedio de las razones radial vs. circular de acutancia (a) y SDQI (b) en las imágenes SHG de las muestras utilizadas en este experimento. Las barras de error representan la desviación estándar.

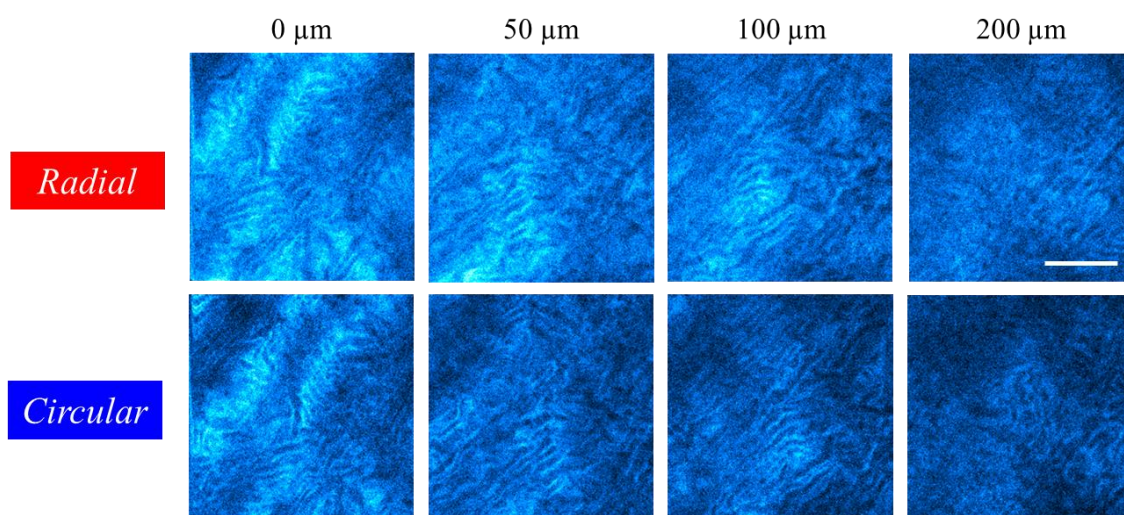
### 6.4.2. Efecto combinado de luz polarizada radial y profundidad

En el apartado anterior se han expuesto los resultados globales comparativos del uso de la polarización radial frente a circular en diferentes tejidos oculares, bien transparentes (córnea), bien opacos (esclera). En general, se observa una mejora tanto en la señal de SHG como en



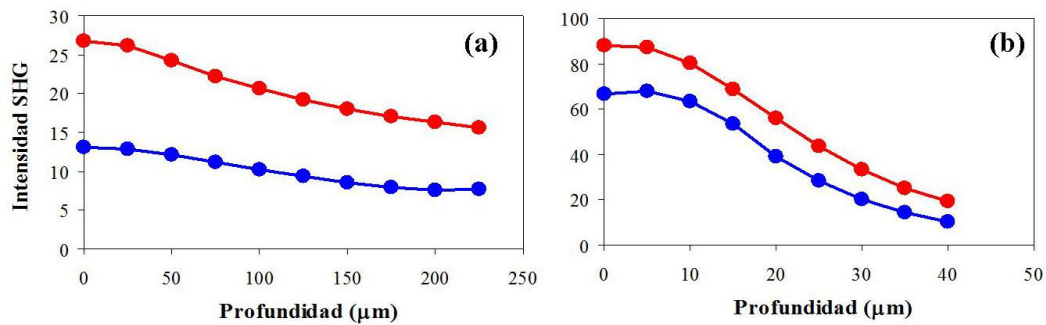
calidad de imagen, independientemente de la organización o características del tejido, aunque en unas muestras, esta mejora es más evidente que en otras. Sin embargo, cuando se trata de visualizar muestras gruesas (como es el caso) cobra más importancia si cabe el estudio de la calidad de imagen en localizaciones profundas, donde los efectos de la presencia de aberraciones y *scattering* es mucho más marcada (Skorsetz et al., 2016). De esto nos ocupamos en la presente sección.

Para diferentes profundidades de la muestra #3, la Figura 6.13 muestra dos series de imágenes, una para cada estado de polarización incidente. Para cada polarización, las imágenes están ajustadas al valor de intensidad máximo (normalización), de forma que la caída de señal con la profundidad se pueda comparar visualmente. Como era de esperar (Bueno et al., 2015) la señal SHG disminuye según nos adentramos en la muestra, pero además se puede apreciar que dicha caída en la señal es similar para ambas polarizaciones.



**Figura 6.47.** Imágenes SHG de la muestra #3 registradas con polarización radial (fila superior) y circular (fila inferior) en función de la profundidad. Barra de escala: 50 μm.

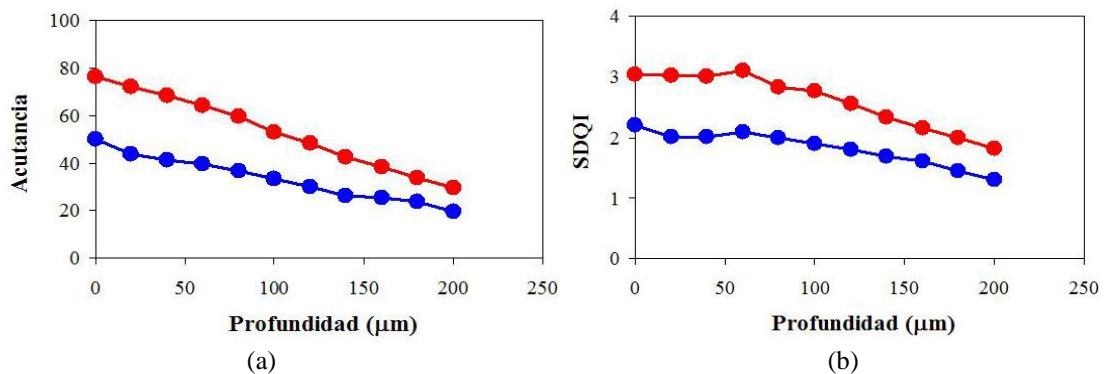
Sin embargo, el efecto de la polarización radial en función de la profundidad se pone de manifiesto cuando se representan los perfiles de intensidad SHG con sus valores sin normalizar (Figura 6.14). De nuevo volvemos a observar que, aunque con las dos polarizaciones la caída sigue el mismo comportamiento, el perfil de la luz radial está siempre por encima del de la circular. Además, se verifica que, independientemente de la localización en profundidad, la razón entre las señales SHG para ambas polarizaciones es prácticamente constante ( $2.06 \pm 0.05$  y  $1.49 \pm 0.23$  para las muestras #2 y #4, respectivamente).



**Figura 6.48.** Intensidad SHG en función de la profundidad para las muestras #3 (a) y #4 (b). Los datos se muestran en rojo para luz radial y en azul para circular.

Este resultado indica que el uso de polarización radial conduce a una mejora de las imágenes SHG en zonas profundas de la muestra, lo cual mejorará la visualización de detalles y beneficiará el análisis de imágenes en esas localizaciones. Esto es de interés tanto en la córnea como en la esclera. En la primera porque las patologías (en su mayor parte) se generan en el estroma posterior y se precisa de imágenes SHG de buena calidad para poder detectar cambios en la organización del colágeno. En caso de la esclera es porque al ser opaca, las estructuras son difíciles de visualizar incluso a pocas micras de la superficie más externa.

Como ejemplo adicional, en la Figura 6.15a se presentan los valores de acutancia para la muestra #1. Los valores se reducen con la profundidad, lo cual es coherente con dicha métrica, pues analiza el contraste local de la imagen y éste va disminuyendo como mostraba la Figura 6.13. A pesar de ello la acutancia siempre es superior en el caso de luz polarizada radial. El comportamiento de la SQDI es parecido, aunque la disminución de la métrica con la profundidad no es tan acusada como con la acutancia (Figura 6.15b). De nuevo, independientemente de la localización del plano, la métrica es mayor para luz radial, los cambios con la profundidad no son tan marcados (caída de un 42%, frente al 60% que se produce con la acutancia).



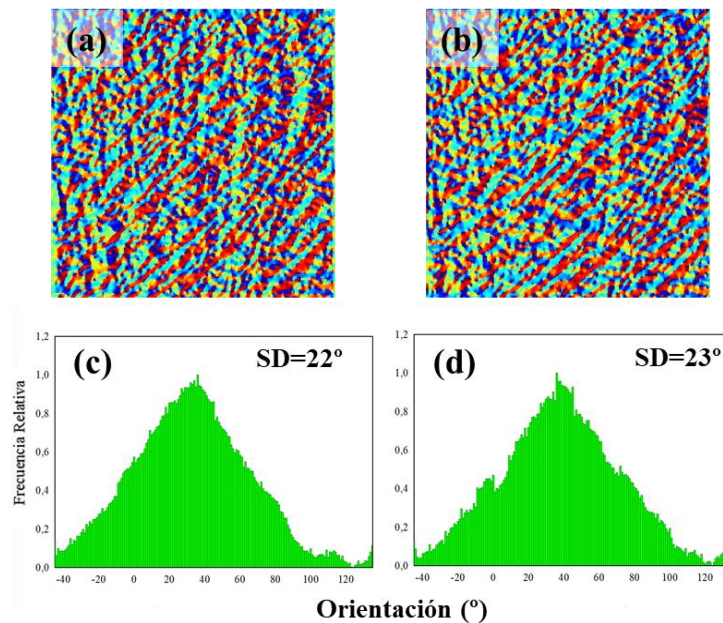
**Figura 6.49.** Relación de la acutancia (a) y el SDQI (b) con la profundidad del plano dentro de la muestra para luz polarizada radial (rojo) y circular (azul). Aunque los valores corresponden a la muestra #1, el resto de las muestras se comporta de forma parecida.

### 6.4.3. Estudio de la organización del tejido

Una vez estudiada la calidad de imagen en función del estado de polarización y la localización en profundidad del plano objeto de interés, se pasa a evaluar la organización estructural microscópica de las muestras y si existen variaciones a la hora de caracterizarla empleando polarización radial o circular.

En la Figura 6.16 se muestran los mapas de OPs y los correspondientes histogramas obtenidos de las imágenes SHG de la muestra #4 obtenidas con ambos tipos de polarización. A partir de ellos, como ya se indicó en el Capítulo 2, se ha determinado la orientación preferencial (PO) y la dispersión estructural (SD).

Esta muestra está formada por fibras paralelas dispuestas a lo largo de una dirección definida, lo cual se refleja tanto en el mapa de OP como en el histograma. Esta OP se encuentra en torno a  $40^\circ$  para ambos estados de polarización. En la DS tampoco se tienen cambios:  $22^\circ$  para radial y  $23^\circ$  para circular, valores que indican que la muestra tiene una estructura moderadamente organizada.

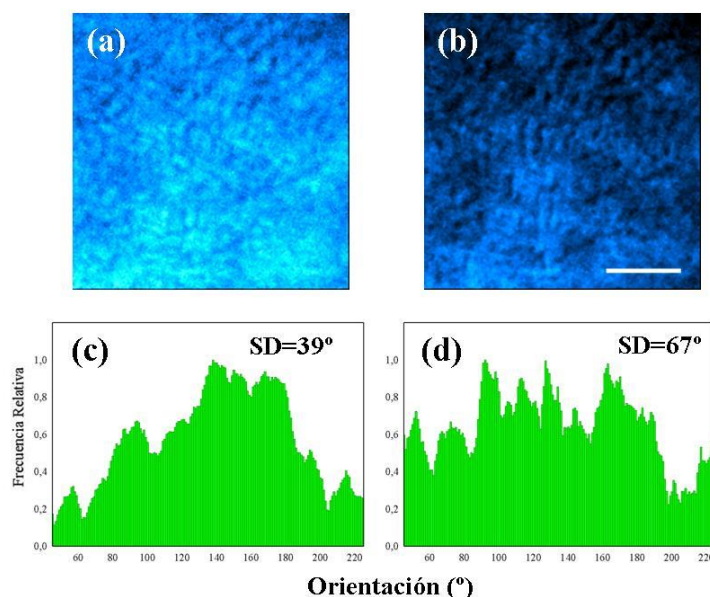


**Figura 6.50.** Mapas (a, b) e histogramas de OP (c, d) obtenidos de las imágenes SHG de la muestra #4 registradas con polarización radial (a, c) y circular (b, d).

Sin embargo, para la muestra #1 (o la muestra #3), donde hay planos en los que las fibras de colágeno no muestran una clara OP, la DS es mayor y el efecto de la polarización radial puede marcar una clara diferencia.

Concretamente, en la Figura 6.17 se muestran las imágenes SHG y los histogramas de OP correspondientes. Mientras que para la imagen adquirida con polarización circular la DS es de

67° (muestra completamente desorganizada), para la polarización radial disminuye un 72% (39°), valor de dentro del grupo de las muestras parcialmente organizadas.



**Figura 6.51.** Imágenes SHG de la muestra #1 con polarización radial (a) y circular (b), con los histogramas de OP correspondientes (c, d). Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

## 6.5. Discusión

La microscopía SHG tiene especial dependencia con el estado de polarización del haz incidente, lo cual puede llegar a limitar la visualización de ciertas estructuras. Esta limitación se debe no sólo al estado de polarización de la luz, sino también a la organización estructural microscópica de la propia muestra (Ávila et al., 2017). De esta forma, en la microscopía SHG con sensibilidad a la polarización se ha podido obtener información adicional de la estructura interna de muestras ricas en colágeno (Ávila et al., 2015; del Barco & Bueno, 2012; Gusachenko et al., 2010; Stoller et al., 2003).

La mayor parte de los experimentos han utilizan estados de polarización que son espacialmente homogéneos: lineal o circular. Sin embargo, hay estudios teóricos que han encontrado que haces con polarización radial (especialmente variable) proporcionan un aumento en la resolución de imágenes SHG (Wang et al., 2019). Por el contrario, los resultados de trabajos experimentales no son siempre coincidentes (Biss & Brown, 2003; Ehmke et al., 2014; E. Yew & Sheppard, 2006; Yoshiki et al., 2005).

En este capítulo, se ha mostrado el efecto de la luz polarizada radial sobre la calidad de las imágenes SHG. Para ello se ha empleado un dispositivo convertidor de polarización (*S-waveplate*) capaz de generar luz polarizada radial a partir de un estado de polarización lineal. Las imágenes SHG de muestras gruesas obtenidas con polarización radial se han comparado

con las mismas imágenes obtenidas con luz polarizada circularmente. El uso de luz circular evitará cualquier posible relación entre la señal SHG y la organización estructural de las fibras dentro de la muestra (Gusachenko et al., 2010), puesto que la visibilidad podría verse afectada por la disposición paralela o perpendicular de éstas con respecto a la luz lineal incidente.

Los resultados aquí presentados muestran que la calidad de la imagen mejora usando luz polarizada radialmente en comparación con la imagen adquirida mediante luz circular. Este efecto se aprecia no sólo en el aumento de señal SHG, sino también en los valores de métricas objetivas tales como la acutancia y la SDQI. En promedio, el aumento de acutancia (SDQI) entre las imágenes con polarización radial y circular está entre un 35% (18%) y un 63% (2.5x). Esta mejora depende de cada una de las muestras, hecho esperable puesto que la estructura de las muestras usadas en este trabajo es muy variada.

Así mismo, los perfiles de intensidad locales permiten mostrar que con luz polarizada radial hay estructuras que se distinguen mejor en las imágenes SHG obtenidas usando polarización radial y que en ciertas ocasiones no es posible observar en las imágenes registradas con luz polarizada circularmente.

Estas diferencias en la calidad de imagen no sólo se han encontrado en planos superficiales, sino también en localizaciones más profundos del tejido, donde la señal SHG es menor. Este hecho va por tanto asociado a un aumento en la profundidad de foco que puede ser crucial tanto en el estroma posterior en el caso de muestras transparentes (córnea), como en muestras opacas (esclera). De esta forma, no sería necesario recurrir a métodos como la óptica adaptativa (Booth, 2014), con el consecuente aumento elementos ópticos que son necesarios para medir y corregir el frente de onda.

Puesto que las muestras analizadas tienen grados de organización diferentes, ha sido de interés estudiar cuál es el efecto de usar imágenes SHG registradas con luz polarizada radialmente en los parámetros aportados por el Tensor de Estructura. Esto nos indicará si la mejora en la calidad de imagen encontrada con luz radial puede conducir a un análisis objetivo más exhaustivo de la distribución de las fibras y a un cálculo más adecuado de la DS (Ávila & Bueno, 2015). Según los resultados obtenidos, cuando la muestra tiene un grado de organización alto, la mejora de la imagen no tiene un efecto significativo. Por el contrario, cuando la muestra presenta un grado de organización parcial los resultados de DS se van a ver influenciados. Este hecho puede ser decisivo cuando se pretende usar la herramienta para distinguir entre muestra sanas y patológicas, o para determinar el grado de patología (Ávila et al., 2019a), cuando éste va asociado a cambios en el orden o a una desnaturalización del colágeno.

Los resultados aquí presentados están en consonancia con estudios previos sobre polarización radial en microscopía SHG (Yew & Sheppard, 2007; Yoshiki et al., 2005). El aumento de la efectividad de la microscopía SHG está asociada con un punto focal más estrecho (Dorn et al., 2003; Quabis et al., 2000), debido principalmente al aumento de la componente longitudinal de la intensidad en el plano focal (Kozawa & Sato, 2015; Wang et al., 2019; Yang & Zhan, 2008).

A pesar de haber sido usada desde hace más de dos décadas, no son muy numerosos los trabajos experimentales que han usado luz polarizada radialmente en microscopía multifotónica de tejidos biológicos. Además, el uso de dicha polarización no ha resultado siempre ventajoso (Yew & Sheppard, 2007). En 2005, Yoshiki y colaboradores sólo encontraron un aumento en la señal SHG (muestra de tendón) con luz radial (comparado con lineal) cuando las fibras de colágeno eran paralelas al eje óptico del sistema (Yoshiki et al., 2005).

Más recientemente, Ehmke et al. (Ehmke et al., 2014) han comparado luz polarizada radial y azimutalmente en muestras de córneas de porcino. Las señales fueron similares cuando las fibras eran perpendiculares al eje óptico (razón=0.99±0.02, posición frontal). Sin embargo, la señal SHG es mayor para luz radial (razón=1.24±0.03) cuando la disposición de la muestra no es frontal sino transversal. Esta dependencia con la disposición de las fibras llevó a los autores a proponer una forma alternativa de determinar la orientación del colágeno respecto al eje óptico. En nuestro caso, no realizamos comparación radial/azimutal, si no radial/circular. Además, en nuestras muestras la disposición de las capas/fibras de colágeno es perpendicular al eje óptico del sistema (lo que Ehmke y colaboradores denominan plano frontal) y siempre la señal con luz radial es mayor.

En resumen, se ha analizado el impacto de usar polarización radial en microscopía SHG y su influencia sobre la calidad de imagen. Los resultados muestran que las imágenes mejoran significativamente, comparadas con las obtenidas con polarización circular. También se muestra un aumento de la profundidad de foco, especialmente útil en planos profundos de muestras biológicas gruesas u opacas donde la penetración está notablemente limitada.



# Capítulo 7

## Efectos de los pulsos de sub-10 fs en microscopía multifotónica

Las propiedades temporales del láser de iluminación son factores que limitan la eficiencia de las técnicas de microscopía multifotónica. Están ligadas a la duración del pulso en el plano de la muestra a estudiar. Los pulsos ultracortos emitidos se ven modificados durante su propagación por la dispersión cromática. Así, la duración del pulso se ve incrementada y, por tanto, si éstos no se comprimen, las señales multifotónicas obtenidas se verán afectadas.

A pesar de esto, existen estudios donde se utilizan láseres de pulsos “muy cortos” (del orden de la decena de fs) en los que no siempre se incorporan compresores de pulso para compensar la posible dispersión producida en el haz en su propagación a través del sistema óptico antes de llegar la muestra. Las imágenes que proporcionan son de suficiente calidad como para ser procesadas y extraer información estructural relevante de ellas (Batista et al., 2018c; Wu et al., 2011).

Sin embargo, no existen estudios donde las imágenes multifotónicas obtenidas con este tipo de fuentes se comparen directamente con las registradas usando el láser Ti:Zafiro que proporciona pulsos nominales de salida de 120-150 fs. Este capítulo aborda este tema y compara ambos tipos de láser con el objetivo final de saber si sería posible una potencial implementación de láseres de pulsos ultracortos en el registro de imágenes multifotónicas del ojo humano en vivo.





## 7.1. Láser sub-10 fs y sistema experimental

El sistema experimental utilizado se describió detalladamente en el Capítulo 2, aunque aquí se ha añadido una fuente de iluminación más al sistema allí descrito. Es por ello que ahora se incluyen detalles de las características tanto de la fuente láser adicional como de las modificaciones realizadas en el microscopio para poder comparar las prestaciones de ambos láseres en lo que a su aplicación en microscopía multifotónica se refiere.

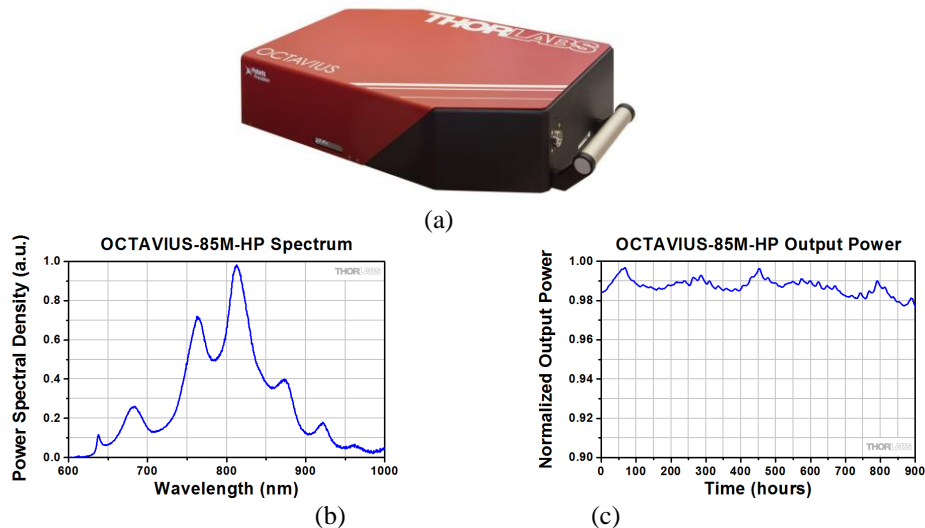
En particular la fuente extra utilizada es un láser pulsado compacto tipo sub-10 fs (Octavius-85M-HP, Thorlabs) al que por comodidad nos referiremos como láser #2. Con el término láser #1 nos referiremos al láser habitual de Ti:Zafiro (Mira 900, Coherent). Aunque las características nominales del láser #1 ya se describieron previamente, aquí se volverán a exponer para facilitar la comparación con las del láser #2. La Tabla 7.1 resume las principales características de ambas fuentes.

**Tabla 7.2.** Características principales de los dos láseres usados en este capítulo (según los fabricantes).

	Láser #1	Láser #2
Potencia de salida (mW)	>500	>500
Frecuencia de repetición (MHz)	76	85
Longitud de onda (nm)	800	800
Cintura del haz (mm)	0.8	0.75
Duración del pulso (fs)	~ 120	< 8
Dimensiones (cm)	110x38x20	57x42x14

Aparte de las dimensiones más pequeñas de láser #2, el resto de los parámetros son similares para ambas fuentes salvo en lo que respecta la duración del pulso, que en lugar de ser nominalmente de 120 fs como en el láser #1, según las especificaciones del fabricante de es < 8 fs.

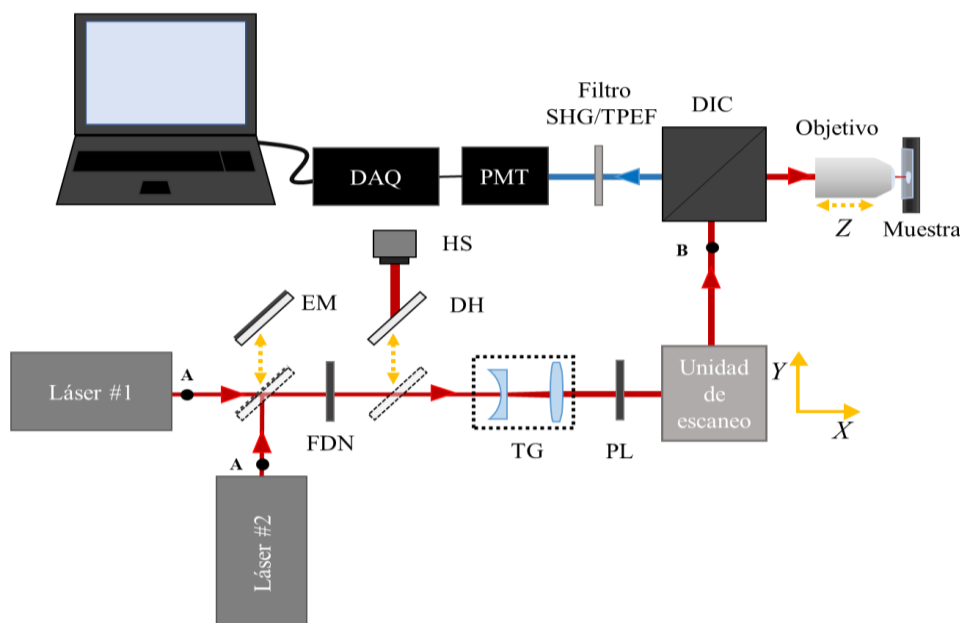
La Figura 7.1 muestra una foto del láser #2, así como las gráficas con las medidas de densidad espectral y estabilidad (en función del tiempo) según las especificaciones aportadas por el fabricante. Hay que tener en cuenta que la compañía proporciona el láser #2 con una  $\lambda$  fija, aunque podría pedirse sintonizado con cualquiera en el rango [700-900] nm y tener una eficiencia razonable.



**Figura 7.1.** Foto del láser #2 (Octavius-85M-HP) (a). Medidas del ancho espectral del haz emitido (b) y de su estabilidad en función del tiempo (c) según la información aportada por el fabricante.

El láser #2 se incorporó al microscopio multifotónico como indica el esquema simplificado de la Figura 7.2. Un espejo móvil (EM) a  $45^\circ$  permite que el láser #2 sirva de iluminación. Cuando éste no está en camino de entrada, es el haz procedente del láser #1 el que ilumina la muestra. Hay que añadir que, en esta configuración experimental, la distancia entre la salida de los láseres y la posición de muestra es la misma para ambos haces. De esta forma se pretende que los caminos ópticos recorridos sean similares y por tanto se minimicen diferencias en la dispersión cromática que sufren los pulsos de sendas fuentes durante su propagación. La potencia media de los dos láseres se controla mediante un filtro de densidad neutra variable (NDF). Además, un polarizador lineal horizontal (PL) asegura que el estado de polarización de ambos haces también sea el mismo. Esto minimizará cualquier posible dependencia entre la señal de la muestra (principalmente en el caso de SHG) y la polarización incidente. A partir de este punto, el sistema es el ya explicado previamente. De forma breve, la unidad de escaneo se encarga de realizar el barrido de la muestra y un espejo dicróico (DIC) separa la luz IR incidente de la visible que vuelve de la muestra. Los filtros espectrales colocados delante del detector (PMT) permiten aislar las señales TPEF y SHG.

Otra modificación adicional ha sido incorporar un sensor tipo Hartmann-Shack en el camino de iluminación para el estudio del frente de onda de los haces de ambos láseres. Un divisor de haz (DH) permite desviar parte de la luz hacia dicho sensor. Para cada imagen de Hartmann-Shack se ha calculado la aberración de onda correspondiente y se ha expresado como expansión en polinomios de Zernike (hasta orden 4) para una pupila de 5 mm (Bueno et al., 2009; Gualda et al., 2010).



**Figura 7.2.** Esquema del sistema empleado para este experimento. EM, espejo móvil; FDN, filtro de densidad neutra; DH, divisor de haz; HS, sensor de Hartmann-Shack; TG, telescopio de Galileo; PL, polarizador lineal; DIC, espejo dicróico; PMT, detector.

Para el registro de imágenes, una vez elegida la zona se procedió a la adquisición secuencial, primero con el láser #1 y luego con el láser #2 (tras incorporar el EM -véase Figura 7.2-). En una 1ª fase, la potencia media de los láseres en el plano de la muestra fue la misma ( $P_{\#1} = P_{\#2A}$ ). Aunque dependiendo de los detalles a mostrar el tamaño de las imágenes registradas fue diferente, las imágenes finales a procesar siempre fueron de 256x256 píxeles.

Tras calcular la intensidad total de cada par de imágenes ( $I_{\#1}$  e  $I_{\#2A}$ ), se pasó a una 2ª fase en la que se modificó la potencia del láser #2 ( $P_{\#2B}$ ) girando el FDN hasta que las imágenes registradas tenían la misma intensidad total que las obtenidas con el láser #1 (es decir,  $I_{\#2B} = I_{\#1}$ ). Para la evaluación de las imágenes finales de ambas fases se emplearon parámetros de calidad de imagen, como la acutancia, la SNR y el contraste.

Las muestras utilizadas para este experimento fueron muestras de celulosa, una malla de seda y un corte histológico de córnea humana (véase Apartado 2.4). Las dos primeras permiten obtener imágenes TPEF (Bueno et al., 2013a). Por su parte, para el registro de imágenes SHG se usó un muestra de córnea humana (Bueno et al., 2011).

## 7.2. Duración del pulso y aberración de onda

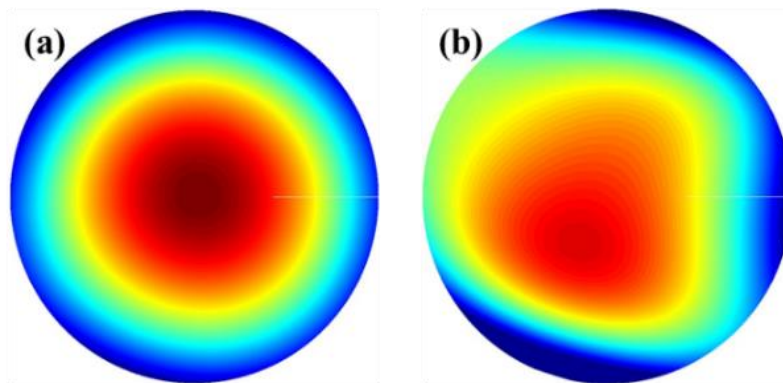
Antes de comenzar con el registro de medidas, se realizó una calibración espacio-temporal de ambos láseres. Es decir, por una parte, se midió la duración de los pulsos y por otra el frente de onda del haz. Para la primera se utilizó un autocorrelador comercial (Mini, APE). El instrumento mide la duración de los pulsos a partir del *full-width half maximum* (FWHM) de la

señal que registra. Para la medida de la aberración de onda se usó mismo sensor de frente de onda comercial tipo Hartmann-Shack (WFS150-5C, Thorlabs) que en el Capítulo 6.

La duración del pulso  $\tau$  se midió en dos puntos diferentes (A y B, véase la Figura 7.2): a la salida del láser ( $\tau_A$ ) y antes de llegar al DIC ( $\tau_B$ ). A partir del valor de  $\tau$  se puede determinar la amplitud espectral ( $\Delta\lambda$ ), de tal forma que cuanto menor sea  $\tau$  mayor será  $\Delta\lambda$ .

Para el láser #1, la duración del pulso medida a la salida fue  $\tau_A = 150$  fs ( $\Delta\lambda = 8$  nm). Para el láser #2, dicho pulso tenía una duración  $\tau_A = 8$  fs ( $\Delta\lambda = 60$  nm). Estos valores indican que el pulso del láser #1 es más largo que el nominal aportado por el fabricante, mientras que el del láser #2 es similar (véase Tabla 7.1). Las medidas en el punto B sólo se pudieron realizar en el láser #1 ( $\tau_B = 400$  fs,  $\Delta\lambda = 3$  nm) pues el rango del autocorrelador no era suficiente. Esto implica que los pulsos del láser #2 a la entrada del microscopio podrían estar en el rango de los picosegundos y no en el de los femtosegundos. Este hecho se discutirá en la sección 7.5, una vez se hayan expuesto los resultados.

Las diferencias espaciales se evaluaron a partir de los frentes de onda. Se registraron imágenes de Hartmann-Shack de ambos haces y a partir de las cuales se calcularon las correspondientes aberraciones. Un ejemplo de los mapas de aberración de onda se muestra en la Figura 7.3. Visualmente los dos mapas son similares. El término dominante fue el desenfoque, poco importante en microscopía pues puede corregirse desplazando el objetivo para cambiar el plano de foco sobre la muestra. Los valores de RMS de alto orden para el láser #1 y #2 fueron respectivamente  $0.043$  y  $0.051$   $\mu\text{m}$ .



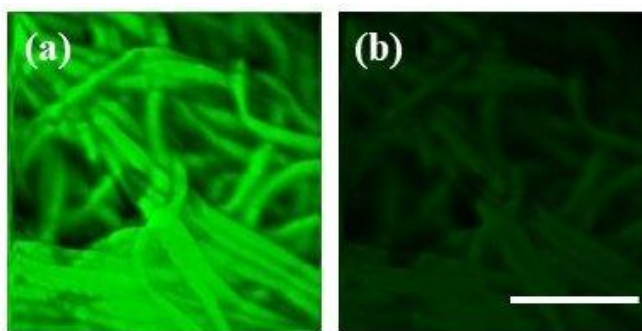
**Figura 7.3.** Mapas de aberración de onda para el láser #1 (a) y #2 (b).

Teniendo en cuenta esto y lo expuesto en el apartado precedente, las condiciones experimentales de ambos láseres son similares salvo por la duración de los pulsos emitidos. Es por ello que las posibles diferencias entre las imágenes multifotónicas registradas serán exclusivamente debidas a la eficiencia en la generación de señales no lineales por el uso de láseres con una duración de pulso con distinta.

### 7.3. Resultados: Imágenes TPEF y SHG

Para cada muestra hay que tener en cuenta el fenómeno no lineal que tiene lugar y el tipo de muestra. Así la para la malla de seda y la celulosa que emiten señal TPEF la potencia del láser incidente inicial ( $P_{\#1} = P_{\#2A}$ ) será mucho menor que la requerida para obtener señal SHG de la córnea (del orden de 1/10). En esta sección se presentarán tanto imágenes TPEF como SHG.

La Figura 7.4 muestra las imágenes TPEF del presente experimento para la malla de seda obtenidas en la 1ª fase siguiendo el procedimiento experimental ya explicado. Para una comparación visual directa las imágenes comparten la misma escala de color. Se puede observar que la señal de la imagen con el láser #2 es mucho menor que la del láser #1:  $I_{\#1} = 37.9 \times 10^6$  e  $I_{\#2A} = 2.1 \times 10^6$  (en unidades arbitrarias).

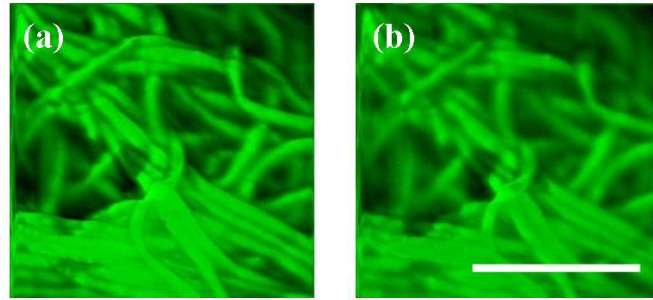


**Figura 7.4.** Imágenes TPEF de la malla de seda obtenidas con el láser #1 (a) y el #2 (b) utilizando la misma potencia incidente. Ambas imágenes se han representado con la misma escala de color. Longitud de la barra: 50  $\mu\text{m}$ .

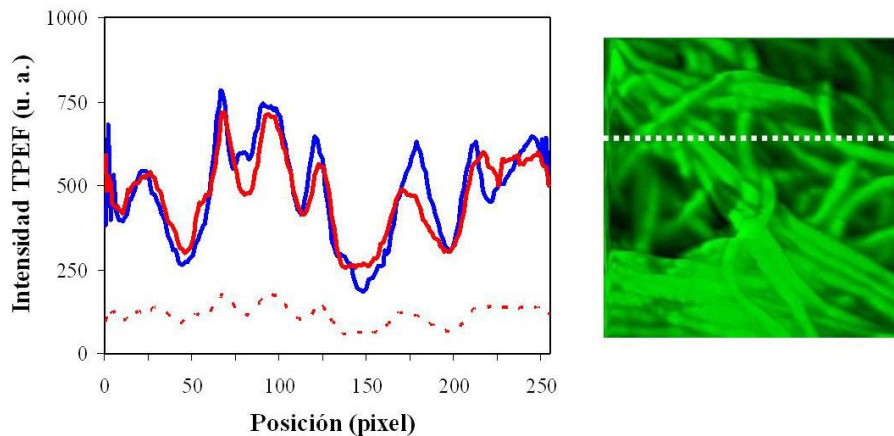
En la 2ª fase se fue aumentado la potencia del láser #2 hasta que la imagen TPEF tuvo un valor de intensidad  $I_{\#2B}$  similar a  $I_{\#1}$ . La imagen resultante se muestra junto con la del láser #1 en la Figura 7.5. La  $I_{\#2B}$  de la imagen de la Figura 7.5b fue  $36.6 \times 10^6$ , valor muy similar a  $I_{\#1}$ . En este caso hubo que utilizar una  $P_{\#2B}$  fue 4 veces superior a la  $P_{\#1}$ .

Los valores de  $I_{\#2A}$  e  $I_{\#2B}$  corroboran la dependencia cuadrática de la señal TPEF con la potencia de láser. En particular, mientras la potencia del láser se ha multiplicado por 4, la señal TPEF ha aumentado 17 veces.

Para comprobar de forma cuantitativa los detalles que aparecen en las imágenes, se han calculado los perfiles de intensidad a lo largo de la línea horizontal punteada marcada en la Figura 7.6. En la gráfica se aprecia cómo el aumento de la potencia del láser #2 hace que los detalles que se aprecian en las imágenes sean similares (líneas continuas), hecho que no ocurre en las imágenes de la 1ª fase (línea continua azul y discontinua roja).

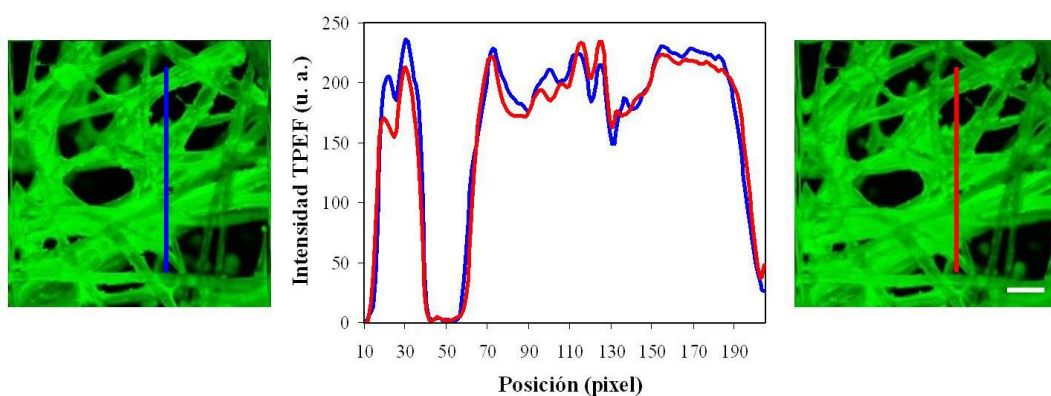


**Figura 7.5.** Imágenes TPEF de la malla de seda obtenidas con ambos láseres, donde la potencia del láser #2 (b) fue 4 veces superior a la del láser #1 (a). La imagen (a) es la misma que la de la figura anterior. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 7.6.** Perfiles de intensidad a lo largo de la línea horizontal marcada en imagen de la derecha. Láser #1, azul; láser #2, rojo.

Los resultados en una muestra de celulosa se presentan en la Figura 7.7. Para este caso también se tuvo que aumentar la potencia del láser #2 hasta 4 veces ( $P_{\#2B} = 4xP_{\#1}$ ) para que las imágenes fueran similares en intensidad TPEF.



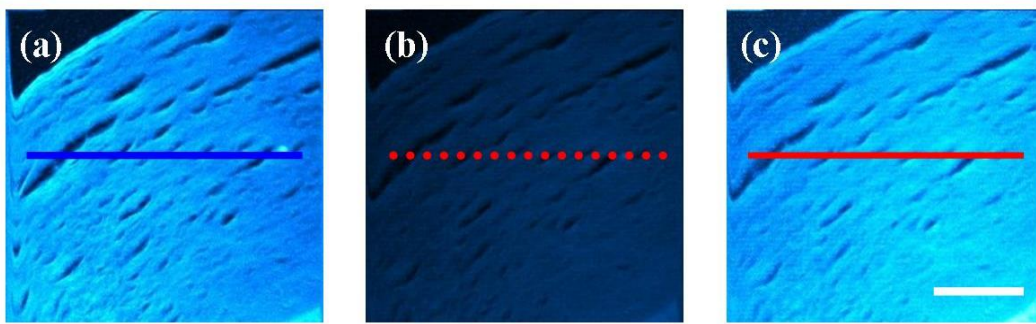
**Figura 7.7.** Imágenes TPEF (muestra de celulosa) registradas en el láser #1 en la 1ª fase y con el láser #2 en la 2ª. Los perfiles de intensidad corresponden a las líneas verticales marcadas sobre las imágenes. Láser #1, azul; láser #2, rojo. Barra: 50  $\mu\text{m}$ .

Por otra parte, también se han obtenido imágenes SHG utilizando el mismo procedimiento experimental. Las muestras ahora tienen un alto contenido en colágeno, siendo necesario cambiar el filtro espectral paso alta por uno paso banda de 400 nm para aislar la señal SHG que



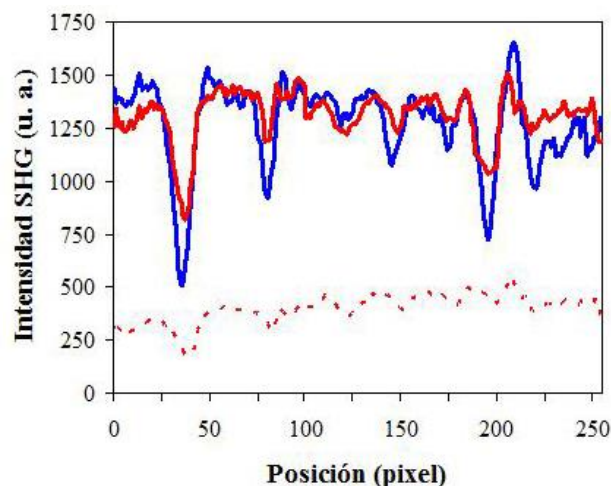
viene de la muestra. Hay que añadir también que la potencia empleada para obtener señal SHG ha de ser más alta que la usada para las muestras que proporcionan señal TPEF.

De igual forma que se ha hecho para las imágenes TPEF, ahora también el procedimiento experimental está dividido en dos fases. Las Figuras 7.8a y 7.8b corresponden a las imágenes SHG de una muestra histológica de córnea humana registradas en la 1ª fase donde la potencia de ambos láseres fue la misma ( $P_{\#1}=P_{\#2A}=100\text{mW}$ ). En la 2ª fase, dicha potencia se fue aumentando de forma gradual hasta que imagen SHG registrada con el láser #2 tuvo unos valores de intensidad similares (Figura 7.8c). En este caso particular, la potencia  $P_{\#2B}$  tuvo que subirse 5 veces para igualar la señal SHG de la imagen registrada con el láser #1. Es interesante destacar de nuevo la dependencia cuadrática: mientras que  $P_{\#2B} = 5 \cdot P_{\#2A}$ , las correspondientes señales SHG verifican que  $I_{\#2B} = 25.3 \cdot I_{\#2A}$ .



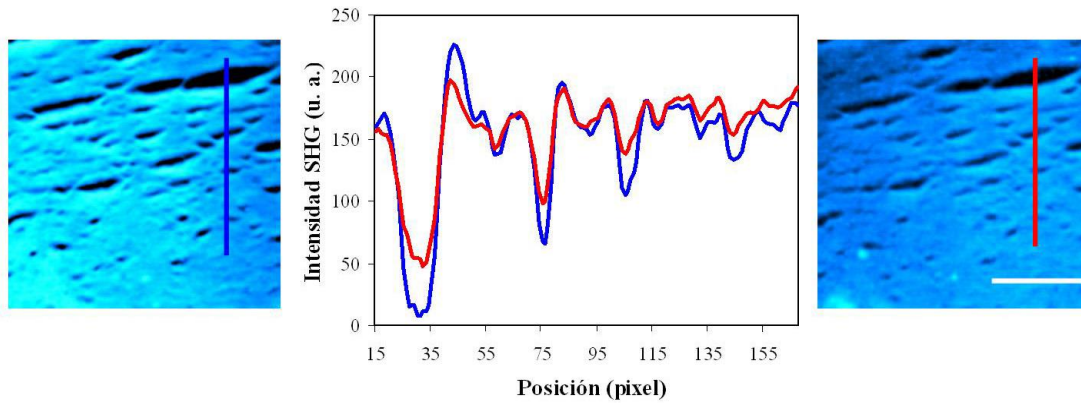
**Figura 7.8.** Imágenes SHG de una córnea humana obtenidas con el láser #1 (a) y con el láser #2 (b, c) en las fases 1ª (a, b) y 2ª (c). Para una comparación visual directa se han representado con la misma escala de colores, es decir todas las imágenes están ajustadas al valor de color máximo y mínimo total. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

Los perfiles de intensidad a lo largo de las líneas marcadas en las imágenes anteriores se muestran en la Figura 7.9. De forma similar a lo comentado para las imágenes TPEF, ahora también se aprecia cómo el aumento de la potencia del láser #2 hace que los detalles que se aprecian en las imágenes sean similares (líneas continuas).



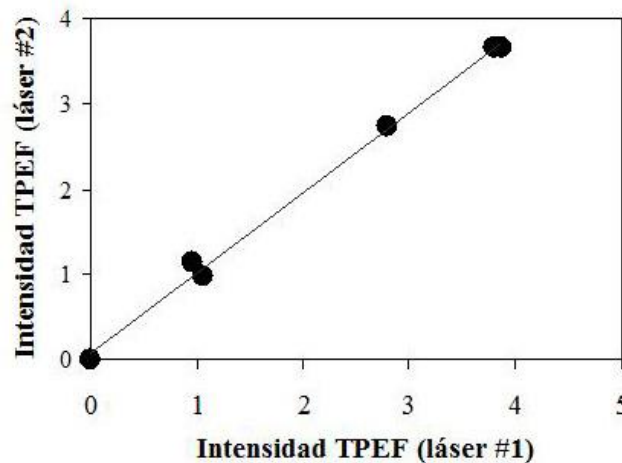
**Figura 7.9.** Perfiles de intensidad de las imágenes SHG de la figura precedente a lo largo de las líneas marcadas. Láser #1, azul; láser #2, rojo.

En la Figura 7.10, para otra muestra de córnea humana, se comparan imágenes SHG de las dos fases y se muestra un ejemplo de perfiles de intensidad. De nuevo se pueden observar las similitudes entre imágenes SHG y perfiles cuando se aumenta 5 veces la potencia del láser #2 en la 2ª fase.



**Figura 7.10.** Muestra de córnea humana: Imágenes SHG registradas en el láser #1 en la 1ª fase (izquierda) y con el láser #2 en la 2ª fase (derecha). Los perfiles de intensidad corresponden a las líneas verticales marcadas sobre las imágenes. Láser #1, azul; láser #2, rojo. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

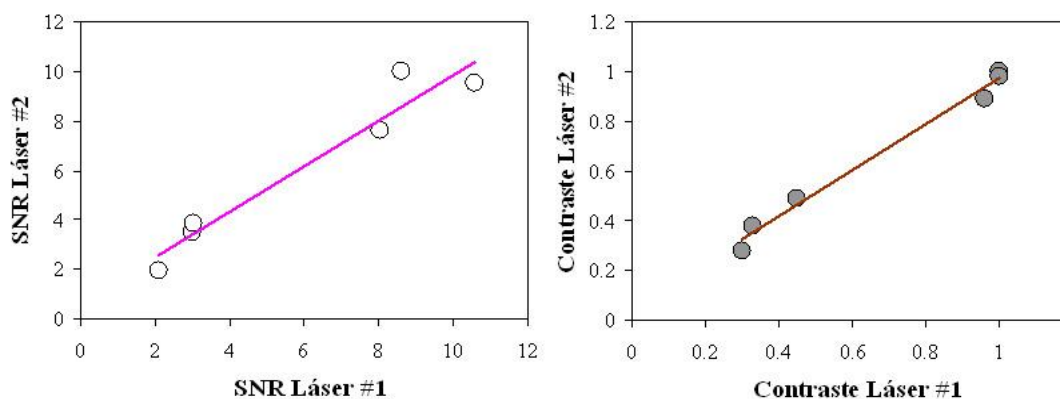
La Figura 7.11 compara la intensidad total de todas las imágenes tomadas con el láser #1 y #2. Para este último, la potencia media tuvo que ser aumentada (x4 o x5, dependiendo de la muestra) con respecto a la del láser #1 para que las intensidades fueran iguales, de esta forma, fue posible realizar una comparación directa de las imágenes registradas con ambos láseres.



**Figura 7.11.** Señal TPEF en todas las imágenes registradas con ambos láseres tras la 2ª fase. La recta gris representa el mejor ajuste lineal a los datos ( $R=0.99$ ).

Además de la intensidad total de las imágenes, para evaluar si los detalles que se visualizan en las registradas con las dos fuentes son también similares, se han calculado otras métricas de calidad. En particular la Figura 7.12 muestra la SNR y el contraste. Los ajustes lineales muestran que las relaciones entre pares de imágenes son significativas ( $R = 0.98$  y  $0.99$ , respectivamente). Para el resto de las métricas (entropía, acutancia) el comportamiento fue similar.





**Figura 7.12.** Comparación de SNR y contraste en pares de imágenes TPEF registradas con ambos láseres tras la 2ª fase. Las líneas de las gráficas representan el mejor ajuste.

## 7.4. Discusión

En este capítulo se han evaluado las prestaciones de un láser sub-10 fs a través de la calidad de las imágenes TPEF y SHG registradas con nuestro sistema experimental. Para ello, dichas imágenes se han comparado con las registradas con el láser de Ti:Zafiro cuyos pulsos sobrepasan los 100 fs.

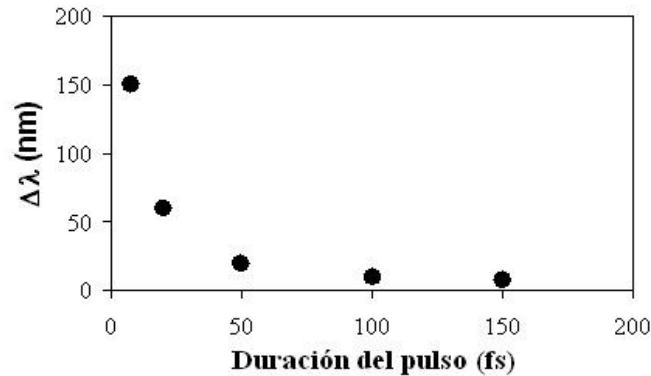
Los resultados de este capítulo han mostrado que para que las imágenes sean similares, el láser sub-10 fs (láser #2) necesita aumentar su potencia media entre 3 y 5 veces, dependiendo de la muestra analizada. La pregunta en este punto es: ¿Cómo es posible que con esas condiciones de duración de pulso las imágenes obtenidas con el láser #2 necesiten esos niveles de potencia? La respuesta a esta pregunta combina 3 elementos asociados a un haz láser pulsado:

- (1) La dependencia entre la duración del pulso  $\tau$  y su ancho espectral  $\Delta\lambda$ .
- (2) Las condiciones de propagación de un pulso ultracorto.
- (3) La relación entre la eficiencia en la generación de señal multifotónica y la duración del pulso.

Pasamos a discutir estos aspectos. Para ello, la Figura 7.13 muestra la relación experimental que existe entre  $\tau$  y  $\Delta\lambda$ . A menor duración del pulso, mayor es el ancho espectral, aunque la función que los liga no es lineal, sino que va con el inverso, es decir,  $\tau \sim (\Delta\lambda)^{-1}$  ( $R=0.99$ ).

Un aumento en  $\Delta\lambda$  trae consigo una caída en la eficiencia de los procesos no lineales, tanto de señal TPEF como de SHG. La primera por excitación de múltiples fluoróforos o por tener un rango espectral que puede exceder al de absorción de los fluoróforos de la muestra (Zipfel et al., 2003) y la segunda por una reducción en la SHG que, como ya se apuntó en el Capítulo 1, se genera a partir de una  $\lambda$  muy definida (Xu et al., 2007). Por tanto, de forma cualitativa cabe esperar que la eficiencia en la generación de señal multifotónica sería menor con el láser

#2 ( $\Delta\lambda = 150$  nm) que con el láser #1 ( $\Delta\lambda = 8$  nm). Para compensar este hecho habría que aumentar la potencia media del láser #2 con el consiguiente riesgo de fotodaño que puede sufrir la propia muestra.



**Figura 7.13.** Relación experimental entre la duración del pulso y su ancho espectral. La línea gris es el mejor ajuste a los datos ( $R=0.99$ ,  $\tau=1268 \cdot (\Delta\lambda)^{-1.03}$ ). Los datos son cortesía del Dr. Íñigo Sola (Universidad de Salamanca).

Por otra parte, un haz láser tiene asociados una amplitud espectral  $A(\omega)$  (estrechamente relacionada con el ancho espectral) y una fase espectral  $\Phi(\omega)$ . Si los materiales que la luz atraviesa en su propagación hasta llegar al microscopio son transparentes,  $A(\omega)$  se mantiene (es decir,  $A(\omega) = \text{cte}$ ).

Si la fase espectral  $\Phi(\omega)$  es plana, la emisión estaría en el denominado límite de Fourier, lo que implicaría que todas las  $\lambda$ s (o frecuencias  $\omega$ ) viajarían a la misma velocidad durante la propagación del haz láser. Sin embargo, esta situación es ideal, porque realmente el haz durante su propagación sufre dispersión cromática. Este fenómeno hace que las  $\lambda$ s más largas se propaguen más rápido que las cortas (es decir, los “rojos” van más rápidos que los “azules”). Esta no constancia en  $\Phi(\omega)$  debido a la dispersión (i.e.  $n(\omega)$  o  $n(\lambda)$ ) hace que la duración del pulso aumente con la propagación.

El valor de la dispersión ( $D$ ) entre la salida del láser y la muestra producida por la óptica del propio microscopio y la propagación en aire viene dada por (Squier & Müller, 2001):

$$D = \frac{\tau_{IN}^2}{4 \ln 2} \left[ \left( \frac{\tau_{OUT}}{\tau_{IN}} \right)^2 - 1 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (7.1)$$

donde  $\tau_{in}$  es la duración del pulso a la salida del láser (punto A, Figura 7.2) y  $\tau_{out}$  la que corresponde al punto B.

Puesto que para el láser #1  $\tau_{in} = 150$  fs y  $\tau_{out} = 400$  fs (medidos de forma experimental con un autocorrelador) la dispersión será  $D = 20025$  fs<sup>2</sup>. Este valor es coherente con la literatura que indica que para este tipo de microscopios está en el rango 3000-20000 fs<sup>2</sup> (Zipfel et al.,

2003). El rango del autocorrelador utilizado sólo nos permite medir los pulsos a la salida del láser #2. Sin embargo, conocido el valor de  $D$ , podremos calcular el valor  $\tau_{out}$  para dicho láser. Puesto que el  $\tau_{in}$  experimental es de 8 fs, el valor de  $\tau_{out}$  será de 6,94 ps. Este valor indica que, para un mismo camino óptico, la dispersión afectará tanto más cuanto “más cortos” sean los pulsos de salida del láser.

La señal multifotónica ( $I_{MP}$ ) se relaciona con la duración del pulso  $\tau_P$  a través de la expresión:

$$I_{MP} \propto \frac{\overline{P_0}^2}{f_R \cdot \tau_P} \quad (7.2)$$

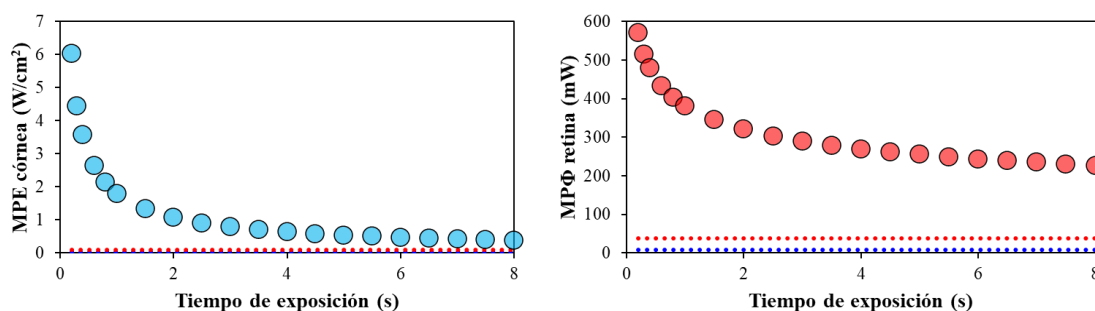
donde  $P_0$  es la potencia media del láser en el plano de la muestra y  $f_R$  es la frecuencia de repetición (Oheim et al., 2006).

Conocidos los valores de  $\tau_{out}$  para ambos láseres, podremos estimar teóricamente la relación entre las potencias medias utilizadas ( $P_{\#1}$  y  $P_{\#2}$ ) para que se cumpla la condición  $I_{MP\#1} = I_{MP\#2}$ . Así con los valores ya expuestos se verifica que para que se cumpla dicha condición, la relación entre potencia medias debe ser de 4.4 veces.

Esta cantidad es, por supuesto, una estimación, aunque experimentalmente hemos obtenido factores entre 3 y 5. El razonamiento se puede tomar como válido en este punto, pues concuerda, además, con lo supuesto por Bewersdorf y Hell que proponían que una extensión de un pulso en un factor  $\beta$ , podría ser compensado aumentando la  $P_0$  un factor  $\beta^{1/2}$  (en este caso,  $\beta^{1/2} = (17.35)^{1/2} = 4.2$ , suponiendo igual  $f_R$ ) (Bewersdorf & Hell, 1998). Así pues, la pérdida de eficiencia en la generación de señal no lineal al utilizar el láser #2 es debido fundamentalmente a que los pulsos ultracortos de salida sufren mucha dispersión cromática en su propagación antes de llegar a la muestra. Así, dicha dispersión hace que a la muestra bajo análisis lleguen pulsos con una duración del orden de los “ps” y no de los “fs”, con la consiguiente caída en la eficiencia mostrada en la ecuación (7.2).

La pregunta más importante que debemos hacernos llegados a este punto es: ¿Es posible emplear este tipo de láseres para el registro de imágenes multifotónicas del ojo en vivo? La respuesta es sí, aunque con matices. La potencia en el plano de la muestra que solemos emplear con el láser #1 para estudiar la córnea en vivo está en torno a los 20 mW/cm<sup>2</sup>, con tiempos de exposición del orden de 0.5 s. En este contexto, al registrar imágenes con el láser #2 sería necesario, en el peor de los casos una densidad de potencia 5 veces mayor, en torno a 100 mW/cm<sup>2</sup>, con tiempos de exposición similares a los comentados anteriormente. Así, su uso sería perfectamente seguro sin necesidad de una pre-compensación de la dispersión, como se puede observar en la Figura 7.14. Sin embargo, a pesar de seguir estando muy por debajo del

umbral de daño incluso hasta 8 s, el paciente podría notar pequeñas molestias debido al propio efecto térmico de la radiación IR.



**Figura 7.14.** MPE para córnea y retina mostrados junto con los valores de potencia experimental para registrar imágenes con el láser #1 (línea de puntos azul) y el láser #2 (línea de puntos roja).

Además del preciso análisis del MPE necesario para emplear láseres de características como las explicadas en este capítulo (véase Capítulo 4), otros de los motivos de la ralentización del desarrollo de instrumentos como el descrito en esta Tesis Doctoral son: el alto coste de los elementos que componen el sistema y las grandes dimensiones de las típicas fuentes de iluminación empleadas en microscopía MP, como es el caso del láser #1. En este sentido el láser #2 presenta ciertas ventajas respecto al láser #1: en primer lugar, las dimensiones, mientras que la fuente de iluminación típica del sistema (láser #1) ocupa un volumen efectivo de  $83.6 \cdot 10^3 \text{ cm}^3$  (sin elementos complementarios, véase Apartado 2.1.1), el láser #2, en cambio ocupa, aproximadamente, un 60% menos de espacio ( $33.5 \cdot 10^3 \text{ cm}^3$ ). Por lo que el uso de láseres similares al láser #2 puede facilitar la instalación e implementación de un microscopio MP más compacto en un espacio de mayor limitación. Todo esto sin contar, como se ha indicado previamente, con que el láser #1 requiere de un sistema de refrigeración, lo cual encarece más el precio de la fuente de iluminación, así como los cuidados y necesidades de mantenimiento (Bueno et al., 2019).

En conclusión, a nivel experimental es el láser #1 tiene las cualidades ideales para la labor investigadora ya que, por ejemplo, permite ajustar la longitud de onda y, como se ha descrito, permite registrar imágenes de alta calidad con niveles por debajo de la MPE. Por otro lado, el láser #2, además de ser seguro y tener un precio competitivo (teniendo en cuenta sus cualidades) para las aplicaciones estudiadas en esta Tesis Doctoral, tiene la ventaja de ser compacto y de fácil implementación, por lo que permitiría una mejor adaptación de un microscopio MP prototipo de uso clínico.

# *Capítulo 8*

## **Conclusiones, contribuciones y perspectivas**

**A**quí se presenta el capítulo final donde se recogen las principales conclusiones derivadas de los resultados mostrados a lo largo de este trabajo. Además, se han incluido las contribuciones y publicaciones a las que durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han dado fruto los experimentos y resultados descritos, tanto directa como indirectamente. Finalmente, se comentan futuras perspectivas y aspectos abiertos para poder continuar con la investigación sobre este tema.



## 8.1. Conclusiones

Las principales conclusiones de esta Tesis Doctoral son consecuentes a los objetivos propuestos, por un lado, el desarrollo y puesta a punto de un microscopio multifotónico compacto clínicamente adaptado y por el otro, la aplicación de métodos de mejora de la calidad de imagen mediante deconvolución, polarización radial y fuentes láseres de pulsos ultracortos. Estas conclusiones se enumeran a continuación:

1. Se ha diseñado y puesto a punto un microscopio multifotónico de dimensiones reducidas. El instrumento está distribuido en dos niveles. En el nivel superior se sitúan todos los elementos ópticos, optomecánicos y de detección. El inferior incluye toda la electrónica, además de las fuentes de alimentación y la tarjeta de adquisición de datos. El dispositivo construido está adaptado para la adquisición de imágenes del ojo humano en vivo permitiendo al paciente mantenerse en una posición ergonómica y cómoda mientras se realiza el registro.
2. Se ha llevado a cabo un estudio detallado de los parámetros de óptimos de registro orientado a la adquisición de imágenes del ojo humano, llegando a la conclusión de que es posible registrar imágenes de buena calidad en menos de 0.5 s, con resolución suficiente para la visualización y posterior análisis de las fibras de colágeno de la córnea y la esclera.
3. Siguiendo la normativa ANSI Z136.1 y de la INCRP, se ha realizado un estudio cuantitativo de los umbrales de fotodaño para la córnea y la retina a partir del diseño en Zemax del microscopio y un modelo de ojo estándar. Se ha demostrado que la potencia mínima requerida para registrar imágenes multifotónicas óptimas de la córnea y la esclera están varios órdenes de magnitud por debajo del umbral de daño tanto de la córnea como de la retina.
4. Una vez determinados los parámetros de registro (principalmente tiempo de exposición, resolución y potencia), se ha procedido a la adquisición de imágenes multifotónicas de estructuras del segmento anterior del ojo humano (córnea, esclera y limbo esclerocorneal) en condiciones en vivo. Estas imágenes cuentan con la resolución y calidad suficiente como para analizar, entre otros, la orientación, densidad y tamaño de las fibras de colágeno en la córnea y la esclera, el tamaño de las células en el limbo esclerocorneal o el calibre de los vasos sanguíneos que discurren por el tejido escleral.
5. Se ha usado un algoritmo de deconvolución ciega para aumentar la calidad de las imágenes SHG, tanto de muestras oculares *ex vivo* como de estructuras del ojo humano en vivo. Dicho método demuestra que es posible mejorar la calidad de las imágenes SHG de forma significativa y manteniendo constante la intensidad total. La técnica ha permitido optimizar

la visualización de las estructuras de los tejidos, mejorando a su vez la capacidad de detección y el análisis de las fibras.

6. Se han estudiado las ventajas del uso de la luz polarizada radialmente comparando las imágenes SHG registradas con este tipo de polarización espacialmente no homogénea y las obtenidas con luz polarizada circularmente. Se ha mostrado que la polarización radial proporciona una mejor calidad de imagen no sólo en el plano de máxima proyección de la muestra, sino también con la profundidad. Este hecho trae consigo una mejora en la generación de señal SHG y un aumento en la profundidad de foco, lo que podría resultar especialmente útil en aplicaciones oculares en vivo.
7. Se ha analizado la eficiencia en el registro de imágenes multifotónicas de un láser compacto que proporciona pulsos por debajo de los 10 fs, comparándolo con el láser “típico” de Ti:Zafiro. Se ha observado que los pulsos emitidos por el primero sufren mayor dispersión al atravesar el sistema experimental, lo que requiere de un aumento de la potencia del láser de entre 3 y 5 veces, dependiendo de la naturaleza de la muestra. A pesar de ello y de acuerdo con los cálculos de seguridad realizados en este trabajo, este láser compacto sigue siendo seguro para el estudio del ojo en vivo. Además, teniendo en cuenta que el instrumento aquí desarrollado no incluye la fuente de luz, las reducidas dimensiones de este láser pueden ser apropiadas para incluirlo en el diseño del sistema experimental.

## 8.2. Contribuciones científicas y publicaciones

Los resultados derivados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a diferentes contribuciones y publicaciones científicas, tanto a nivel nacional como internacional:

- R. M. Martínez-Ojeda, C. Hernández-García, P. Artal & J. M. Bueno. “Enhancement of Second Harmonic Microscopy Images Using Radially Polarized Beams”. *Focus on Microscopy: FOM 2019*. Londres, Reino Unido (2019).
- J. M. Bueno, R. M. Martínez-Ojeda, F. J. Ávila, L. M. Mugnier & P. Artal. “High-Resolution Second Harmonic Generation Images of the Living Human Eye”. En: *Arvo Annual Meeting*. Vancouver, Canadá (2019).
- R. M. Martínez-Ojeda, P. Artal & J. M. Bueno. “Análisis de la Mejora de Imágenes de Microscopía de Segundo Armónico Usando Luz Polarizada Radialmente”. En: *Jornadas de Doctorado de la Universidad de Murcia 2019*. Escuela Internacional de Doctorado, Murcia, España (2019).



- R. M. Martínez-Ojeda, P. Artal & J. M. Bueno. “Comparing the Performance of a Sub-10fs Laser and a Ti: Sapphire in Multiphoton Imaging Microscopy”. En: *IONS BCN 2019*. Barcelona, España (2019).
- J. M. Bueno, R. M. Martínez-Ojeda, L. M. Mugnier & P. Artal, “Deconvolution Method for Multiphoton Microscopy: An Application to Thick Ocular Tissues,” En: *2019 21st International Conference on Transparent Optical Networks (ICTON)*, Angers, Francia (2019), pg. 1-4. [doi: 10.1109/ICTON.2019.8840328]
- R. M. Martínez-Ojeda, J. M. Bueno & P. Artal. “Two-photon Imaging with Sub-10-fs Laser Systems: Theory vs. Experiment”. En: *Siegman School of Lasers*. Rochester, Estados Unidos (2019).
- R. M. Martínez-Ojeda, L. M. Mugnier, P. Artal & J. M. Bueno. “Improvement of Multiphoton Microscopy Images of the Living Human Eye through Deconvolution”. En: *I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers*. Murcia, España (virtual) (2020).
- R. M. Martínez-Ojeda, J. M. Bueno & P. Artal. “Performance and Limitations of Multiphoton Microscopy for In Vivo Optimal Imaging Ocular Tissues”. En: *Focus on Microscopy: FOM 2021*. Amsterdam, Países Bajos (virtual) (2021).
- R. M. Martínez-Ojeda, J. M. Bueno, & P. Artal “In Vivo Multiphoton Imaging of the Human Ocular Anterior Segment”, En: *Proc. SPIE 11922, Advances in Microscopic Imaging III*, 1192215 (2021). [doi:10.1117/12.2615787]
- R. M. Martínez-Ojeda, P. Artal & J. M. Bueno. “Microscopía Multifotónica con un Láser Sub-10-fs para Aplicaciones en Vivo”. En: *Jornadas de Doctorado de la Universidad de Murcia 2021*. Escuela Internacional de Doctorado. Murcia, España (virtual) (2021).
- R. M. Martínez-Ojeda, C. Hernández-García & J. M. Bueno, “Enhancement of Second Harmonic Microscopy Images in Collagen-Based Thick Samples Using Radially Polarized Laser Beams”, *Optics Communications*, 499:127273 (2021). [doi: 10.1016/j.optcom.2021.127273]
- R. M. Martínez-Ojeda, C. Hernández-García & J. M. Bueno. “Efectos de la Luz Polarizada Radialmente sobre Imágenes de Microscopía de Segundo Armónico en Tejidos Formados por Colágeno”. En: *Reunión Nacional de Óptica (RNO) 2021*, (virtual).
- R. M. Martínez-Ojeda, L. M. Mugnier, P. Artal & J. M. Bueno “Enhanced second harmonic imaging of the living human eye using deconvolution”. En: *XXXVIII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Física*. Murcia, España (2022).

- R. M. Martínez-Ojeda, L. M. Mugnier, P. Artal & J. M. Bueno “Deconvolution Procedure to Improve Second Harmonic Generation Images of the Living Human Eye”. En: *Imaging and Applied Optics Congress*. Vancouver, Canadá (2022).

- R. M. Martínez-Ojeda, L. M. Mugnier, P. Artal & J. M. Bueno. “Blind Deconvolution of Second Harmonic Microscopy Images of the Living Human Eye”. *Biomedical Optics Express* (submitido, 2022).

Tanto el sistema experimental como las herramientas desarrolladas e implementadas en esta Tesis Doctoral han sido también usadas en diferentes proyectos paralelos. Unos han sido del propio Laboratorio de Óptica y otros en colaboración con departamentos, clínicas y universidades tanto nacionales como internacionales. De ellos se han derivado las contribuciones y publicaciones:

- J. M. Bueno, R. M. Martínez-Ojeda, F. J. Ávila, A. C. Fernández-Escudero, M. López-Nicolás & M. D. Pérez-Cárceles. “Multiphoton Imaging Microscopy of Dental Pieces as a Tool in Forensic Sciences”. En: *Focus on Microscopy: FOM 2019*. Londres, Reino Unido (2019).

- R. M. Martínez-Ojeda, M. D. Pérez-Cárceles, L. C. Ardelean, S. G. Stanciu & J. M. Bueno. “Multiphoton Microscopy of Oral Tissues: Review”. *Frontiers in Physics*, 8: 128 (2020). [doi:10.3389/fphy.2020.00128]

- I. Rivilla, B. Aparicio, J.M. Bueno, D. Casanova, C Tonnelé, Z. Freixa, P. Herrero, C. Rogero, J. I. Miranda, R. M. Martínez-Ojeda, F. Monrabal, B. Olave, T. Schäfer, P. Artal, D. Nygren, F. P. Cossío & J. J. Gómez-Cadenas. “Fluorescent Bicolour Sensor for Low-Background Neutrinoless Double  $\beta$  Decay Experiments”. *Nature*, 583(7814):4854 (2020). [doi: 10.1038/s41586-020-2431-5]

- J. M. Bueno, F. J. Ávila, R. M. Martínez-Ojeda & P. Artal. “Adaptive-Optics Polarization-Sensitive Second Harmonic Generation Microscopy,” En: *2020 22nd International Conference on Transparent Optical Networks (ICTON)*, Bari, Italy, (virtual) (2020), pg. 1-4. [doi: 10.1109/ICTON51198.2020.9203107]

- R M. Martínez-Ojeda, G. Prieto-Bonete, M. D. Pérez-Cárceles, P. Artal & J. M. Bueno. “Quantitative Analysis of the Changes in the Post-Mortem Crystalline Lens Using Multiphoton Microscopy” En: *Spanish & Portuguese Advanced Optical Microscopy Meeting 2020 (SPAOM)*. Valencia, España (virtual) (2020).

- J. M. Bueno, R. M. Martínez-Ojeda, G. Hernández, G. Saavedra, M. Martínez-Corral & P. Artal "Multiphoton image enhancement with variable squared cubic phase masks", En: *Proc. SPIE 11922, Advances in Microscopic Imaging III*, 1192202 (2021). [doi:10.1117/12.2611868]

- R. M. Martínez-Ojeda, M. Lopez-Nicolás, M. D. Pérez-Cárceles & J. M. Bueno. “Análisis Multifotónico de la Dentina Humana y su Relación con la Edad”. En: *III Congreso Interdisciplinar de Jóvenes Investigadores*. Murcia, España (virtual) (2021).
- A. Peñin-Franch, J. A. García-Vidal, C. M. Martínez, P. Escolar-Reina, R. M. Martínez-Ojeda, A. I. Gómez, J. M. Bueno, F. Minaya-Muñoz, F. Valera-Garrido F. Medina-Mirapeix & P. Pelegrín, “Galvanic current activates the NLRP3 inflammasome to promote type I collagen production in tendon”. *eLife*, 11, e73675 (2022) [doi: 10.7554/eLife.73675]
- R. M. Martínez-Ojeda, G. Prieto-Bonete, M. D. Perez-Cárceles, P. Artal, J. M. Bueno. “Assessment of the Crystalline Lens Structure as a Function of Postmortem Time Using Multiphoton Microscopy”. En: *II Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers*. Murcia, España (2022).
- R. M. Martinez-Ojeda, A.C. Fernandez-Escudero, F.J. Avila, M. Lopez-Nicolas, M.D. Perez-Carceles, J. M. Bueno. “Age Estimation in Human Dentine Using Multiphoton Imaging Microscopy”. En: *Focus on Microscopy: FOM 2022* (virtual) (2022).
- J. M. Bueno, R. M. Martinez-Ojeda, L. Ordonez, F. J. Avila. “Structural Organization, Polarization Sensitivity and Image Quality in Collagen-based Tissues Measured with Second Harmonic Microscopy”. En: *Focus on Microscopy: FOM 2022* (virtual) (2022).
- J. M. Bueno, R. Martínez-Ojeda, E. J. Fernández, M. Feldkaemper, P. Artal. “Structural Organization of the Sclera in Chicks after Deprivation Myopia Measured Using Second Harmonic Generation Microscopy” En: *ARVO Annual Meeting*. Denver, Estados Unidos (2022).
- J. M. Bueno, R. M. Martínez-Ojeda, A. C. Fernández-Escudero, F. J. Ávila, M. López-Nicolás, M. D. Pérez-Cárceles. “Dental Age Estimation using Multiphoton Microscopy: A Potential Tool for Forensic Science”. *BioMed Research International*, 2022,3328818 (2022) [doi: 10.1155/2022/3328818]
- J. M. Bueno, R. M. Martínez-Ojeda, I. Yago & F. J. Ávila. “Collagen Organization, Polarization Sensitivity and Image Quality in Human Corneas using Second Harmonic Generation Microscopy”. *Photonics* (submitido, 2022).

Durante este periodo de doctorado, la autora de este trabajo también ha tenido la oportunidad de ser codirectora con el Prof. Juan M. Bueno de algunos Trabajos de Fin de Grado (TFG) y Master (TFM), relacionados también con la microscopía multifotónica:

- L. J. Ordóñez Angamarca, “Análisis de la Organización Estromal en Modelos Animales con Microscopía de Segundo Armónico”, (TFG), Grado en Óptica y Optometría, Universidad de Murcia, Murcia, España (2019).
- M<sup>a</sup> Carmen Moreno Herrero, “Microscopía multifotónica aplicada al análisis de piezas dentales” (TFG), Grado en Óptica y Optometría, Universidad de Murcia, Murcia, España (2019).
- M<sup>a</sup> Carmen Asensio Ruipérez, “Organización Estromal de la Córnea Humana Visualizada con Microscopía de Segundo Armónico” (TFG), Grado en Óptica y Optometría, Universidad de Murcia, Murcia, España (2020).
- L. J. Ordóñez Angamarca, “Dispersión Estructural, Calidad de Imagen y Sensibilidad a la Polarización en Imágenes de Microscopía de Segundo Armónico de Tejidos Oculares” (TFM), Master en Investigación en Ciencias de la Visión, Universidad de Murcia, Murcia, España (2020).
- M<sup>a</sup> Carmen Asensio Ruipérez, “Microscopía multifotónica para la evaluación de la fibrosis del ventrículo izquierdo asociada al envejecimiento del corazón” (TFM), Master en Investigación en Ciencias de la Visión, Universidad de Murcia, Murcia, España (2022).

### 8.3. Perspectivas futuras

Estudios preliminares llevados a cabo también durante estos años en diferentes modelos animales apuntan a que existen cambios en la organización del colágeno corneal como consecuencia de diferentes patologías, lo cual lleva también asociada una reducción en la calidad de la imagen SHG registrada. Por otra parte, la estructura de la esclera se puede ver potencialmente afectada por los diferentes grados de miopía.

En ese sentido, uno de los experimentos planeados al acabar este trabajo es continuar con el estudio de la organización, estructura y las propiedades polarimétricas del colágeno corneal *ex vivo* bajo diferentes condiciones patológicas.

Además, se ha establecido contacto con la Universidad de Tubinga (Alemania) donde se estudian modelos animales de miopía. El objetivo es analizar los cambios en la esclera relacionados con el aumento de la miopía en estos modelos (especialmente el pollo).

Una vez estudiados experimentalmente casos controles y patológicos/miopes en condiciones *ex vivo*, se procederá a realizar medidas en condiciones en vivo en sujetos sanos, con patologías oculares y con distintos grados de miopía. Las herramientas desarrolladas en

esta Tesis Doctoral serán de gran utilidad para analizar posibles diferencias en las imágenes registradas en vivo en distintas condiciones experimentales.

En referencia al sistema experimental, se pretende incluir optimizaciones con la intención de aumentar la estabilidad y mejorar el proceso de registro. Estas optimizaciones tienen como base incluir un método de “pupil tracking” que ayude a compensar los movimientos oculares involuntarios y determinar de forma más precisa la posición del foco. La implementación de un láser compacto en el nivel inferior del instrumento permitiría no depender de la fuente externa.



# *Bibliografía*





- Abu-Hassan, D. W., Acott, T. S., & Kelley, M. J. (2014). The trabecular meshwork: a basic review of form and function. *Journal of Ocular Biology*, 2(1), 1-22.
- Adur, J., Pelegati, V. B., de Thomaz, A. A., D'Souza-Li, L., Assunção, M. do C., Bottcher-Luiz, F., Andrade, L. A. L. A., & Cesar, C. L. (2012). Quantitative changes in human epithelial cancers and osteogenesis imperfecta disease detected using nonlinear multicontrast microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 17(8), 081407.
- Alonso-Fernández, B., Borrego-Varilla, R., Hernández-García, C., Pérez-García, J. A., & Romero-Vázquez, C. (Eds.) (2010). *El láser, la luz de nuestro tiempo*. Ediciones Universidad de Salamanca.
- Ammar, D. A., Lei, T. C., Gibson, E. A., & Kahook, M. Y. (2010). Two-photon imaging of the trabecular meshwork. *Molecular Vision*, 16(April), 935-944.
- Aptel, F., Olivier, N., Deniset-Besseau, A., Legeais, J. M., Plamann, K., Schanne-Klein, M. C., & Beaurepaire, E. (2010). Multimodal nonlinear imaging of the human cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(5), 2459-2465.
- Arpitha, P., Prajna, N. V., Srinivasan, M., & Muthukkaruppan, V. (2005). High expression of p63 combined with a large N/C Ratio defines a subset of human limbal epithelial cells: Implications on epithelial stem cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46(10), 3631-3636.
- Auksorius, E., Borycki, D., Stremplewski, P., Liżewski, K., Tomczewski, S., Niedźwiedziuk, P., Sikorski, B. L., & Wojtkowski, M. (2020). In vivo imaging of the human cornea with high-speed and high-resolution fourier-domain full-field optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 11(5), 2849.
- Aumann, S., Donner, S., Fischer, J., & Müller, F. (2019). Optical Coherence Tomography (OCT): Principle and technical realization. In J. F. Bille (Ed.), *High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology* (pp. 59-85). Springer International Publishing.
- Ávila, F. J., & Bueno, J. M. (2015). Analysis and quantification of collagen organization with the structure tensor in second harmonic microscopy images of ocular tissues. *Applied Optics*, 54(33), 9848-9854.
- Ávila, F. J., del Barco, O., & Bueno, J. M. (2015). Polarization dependence of aligned collagen tissues imaged with second harmonic generation microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 20(8), 1-9.
- Ávila, F. J., del Barco, O., & Bueno, J. M. (2016). Polarization response of second-harmonic images for different collagen spatial distributions. *Journal of Biomedical Optics*, 21(6), 066015.
- Ávila, F. J., del Barco, O., & Bueno, J. M. (2017). Quantifying external and internal collagen organization from Stokes-vector-based second harmonic generation imaging polarimetry. *Journal of Optics*, 19(10), 105301.
- Ávila, F. J., Artal, P., & Bueno, J. M. (2019a). Quantitative discrimination of healthy and diseased corneas with second harmonic generation microscopy. *Translational Vision Science & Technology*, 8(3), 51.
- Ávila, F. J., Gambín, A., Artal, P., & Bueno, J. M. (2019b). In vivo two-photon microscopy of the human eye. *Scientific Reports*, 9(1), 10121.

- Ávila, F. J., Ares, J., Marcellán, M. C., Collados, M. V., & Remón, L. (2021). Iterative-trained semi-blind deconvolution algorithm to compensate straylight in retinal images. *Journal of Imaging*, 7(4), 73.
- Ayers, G. R., & Dainty, J. C. (1988). Iterative blind deconvolution method and its applications. *Optics Letters*, 13(7), 547-549.
- Bakaraju, R. C., Ehrmann, K., Falk, D., Ho, A., & Papas, E. (2010). Physical human model eye and methods of its use to analyse optical performance of soft contact lenses. *Optics Express*, 18(16), 16868.
- Balu, M., Zachary, C. B., Harris, R. M., Krasieva, T. B., König, K., Tromberg, B. J., & Kelly, K. M. (2015). In vivo multiphoton microscopy of basal cell carcinoma. *JAMA Dermatology*, 151(10), 1068.
- del Barco, O., & Bueno, J. M. (2012). Second harmonic generation signal in collagen fibers: Role of polarization, numerical aperture, and wavelength. *Journal of Biomedical Optics*, 17(4), 045005.
- Bautista, G., Kakko, J.-P., Dhaka, V., Zang, X., Karvonen, L., Jiang, H., Kauppinen, E., Lipsanen, H., & Kauranen, M. (2017). Nonlinear microscopy using cylindrical vector beams: Applications to three-dimensional imaging of nanostructures. *Optics Express*, 25(11), 12463.
- Batista, A., Breunig, H. G., Donitzky, C., & König, K. (2018a). Two-photon microscopy and fluorescence lifetime imaging of the cornea. *Multiphoton Microscopy and Fluorescence Lifetime Imaging: Applications in Biology and Medicine*, 301-320.
- Batista, A., Breunig, H. G., König, A., Schindele, A., Hager, T., Seitz, B., & König, K. (2018b). High-resolution, label-free two-photon imaging of diseased human corneas. *Journal of Biomedical Optics*, 23(03), 1-8.
- Batista, A., Breunig, H. G., König, A., Schindele, A., Hager, T., Seitz, B., Morgado, A. M., & König, K. (2018b). Assessment of human corneas prior to transplantation using high-resolution two-photon imaging. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 59(1), 176-184.
- Beresna, M., Gecevičius, M., & Kazansky, P. G. (2011a). Polarization sensitive elements fabricated by femtosecond laser nanostructuring of glass [Invited]. *Optical Materials Express*, 1(4), 783.
- Beresna, M., Gecevičius, M., Kazansky, P. G., & Gertus, T. (2011b). Radially polarized optical vortex converter created by femtosecond laser nanostructuring of glass. *Applied Physics Letters*, 98(20), 2-4.
- Bewersdorf, J., & Hell, S. W. (1998). Picosecond pulsed two-photon imaging with repetition rates of 200 and 400 MHz. *Journal of Microscopy*, 191(1), 28-38.
- Biggs, D. S. C. (2010). 3D deconvolution microscopy. *Current Protocols in Cytometry*, 52(1), 1-20.
- Bikbova, G., Oshitari, T., Baba, T., Bikbov, M., & Yamamoto, S. (2018). Diabetic corneal neuropathy: Clinical perspectives. *Clinical Ophthalmology*, 12, 981-987.
- Biss, D. P., & Brown, T. G. (2003). Polarization-vortex-driven second-harmonic generation. *Optics Letters*, 28(11), 923.

- Blanco, L., & Mugnier, L. M. (2011). Marginal blind deconvolution of adaptive optics retinal images. *Optics Express*, *19*(23), 23227-23239.
- Bloembergen, N., & Pershan, P. S. (1962). Light waves at the boundary of nonlinear media. *Physical Review*, *128*(2), 606-622.
- Boote, C., Sigal, I. A., Grytz, R., Hua, Y., Nguyen, T. D., & Girard, M. J. A. (2020). Scleral structure and biomechanics. *Progress in Retinal and Eye Research*, *74*(August 2019), 100773.
- Booth, M. J. (2014). Adaptive optical microscopy: The ongoing quest for a perfect image. *Light: Science and Applications*, *3*, e165.
- Bourne, W. M., & McLaren, J. W. (2004). Clinical responses of the corneal endothelium. *Experimental Eye Research*, *78*(3), 561-572.
- Bueno, J. M., & Campbell, M. C. W. (2002). Confocal scanning laser ophthalmoscopy improvement by use of mueller-matrix polarimetry. *Optics Letters*, *27*(10), 830.
- Bueno, J. M., Vohnsen, B., Roso, L., & Artal, P. (2009). Temporal wavefront stability of an ultrafast high-power laser beam. *Applied Optics*, *48*(4), 770-777.
- Bueno, J. M., Gualda, E. J., & Artal, P. (2010). Adaptive optics multiphoton microscopy to study ex vivo ocular tissues. *Journal of Biomedical Optics*, *15*(6), 066004.
- Bueno, J. M., Gualda, E. J., & Artal, P. (2011). Analysis of corneal stroma organization with wavefront optimized nonlinear microscopy. *Cornea*, *30*(6), 692-701.
- Bueno, J. M., Skorsetz, M., Palacios, R., Gualda, E. J., & Artal, P. (2013a). Multiphoton imaging microscopy at deeper layers with adaptive optics control of spherical aberration. *Journal of Biomedical Optics*, *19*(1), 011007.
- Bueno, J. M., Palacios, R., Chessey, M. K., & Ginis, H. (2013b). Analysis of spatial lamellar distribution from adaptive-optics second harmonic generation corneal images. *Biomedical Optics Express*, *4*(7), 1006.
- Bueno, J. M. (2014). Adaptive optics multiphoton microscopy: Probing the eye more deeply. *Optics & Photonics News*, *25*(1), 48-55.
- Bueno, J. M., Palacios, R., Pennos, A., & Artal, P. (2015). Second-harmonic generation microscopy of photocurable polymer intrastromal implants in ex-vivo corneas. *Biomed. Opt. Express*, *6*(6), 2211-2219.
- Bueno, J. M., Ávila, F. J., & Artal, P. (2019a). Comparing the performance of a femto fiber-based laser and a Ti:sapphire used for multiphoton microscopy applications. *Applied Optics*, *58*(14), 3830.
- Bueno, J. M., Ávila, F. J., & Martínez-García, M. C. (2019b). Quantitative analysis of the corneal collagen distribution after *in vivo* cross-linking with second harmonic microscopy. *BioMed Research International*, *2019*, 3860498.
- Bueno, J. M., Ávila, F. J., Hristu, R., Stanciu, S. G., Eftimie, L., & Stanciu, G. A. (2020). Objective analysis of collagen organization in thyroid nodule capsules using second harmonic generation microscopy images and the Hough transform. *Applied Optics*, *59*(23), 6925.
- Burke, K., Tang, P., & Brown, E. (2012). Second harmonic generation reveals matrix alterations during breast tumor progression. *Journal of Biomedical Optics*, *18*(3), 031106.

- Campagnola, P. J., Millard, A. C., Terasaki, M., Hoppe, P. E., Malone, C. J., & Mohler, W. A. (2002). Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophysical Journal*, 82(1), 493-508.
- Canny, J. (1986). A Computational Approach to Edge Detection. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, PAMI-8(6), 679-698.
- Chai, D., Juhasz, T., Brown, D. J., & Jester, J. V. (2013). Nonlinear optical collagen cross-linking and mechanical stiffening: a possible photodynamic therapeutic approach to treating corneal ectasia. *Journal of Biomedical Optics*, 18(3), 038003.
- Chan, E. H., Chen, L., Rao, J. Y., Yu, F., & Deng, S. X. (2015). Limbal basal cell density decreases in limbal stem cell deficiency. *American Journal of Ophthalmology*, 160(4), 678-684.e4.
- Chen, X., Nadiarynkh, O., Plotnikov, S., & Campagnola, P. J. (2012a). Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nature Protocols*, 7(4), 654-669.
- Cheng, L.-C., Horton, N. G., Wang, K., Chen, S.-J., & Xu, C. (2014). Measurements of multiphoton action cross sections for multiphoton microscopy. *Biomedical Optics Express*, 5(10), 3427.
- Chiou, A. G., Kaufman, S. C., Kaufman, H. E., & Beuerman, R. W. (2006). Clinical corneal confocal microscopy. *Survey of Ophthalmology*, 51(5), 482-500.
- Christou, J. C., Roorda, A., & Williams, D. R. (2004). Deconvolution of adaptive optics retinal images. *Journal of the Optical Society of America A*, 21(8), 1393.
- Cicchi, R., Kapsokalyvas, D., De Giorgi, V., Maio, V., Van Wiechen, A., Massi, D., Lotti, T., & Pavone, F. S. (2009). Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *Journal of Biophotonics*, 3(1-2), 34-43.
- Conan, J., Mugnier, L. M., Fusco, T., Michau, V., & Rousset, G. (1998). Myopic deconvolution of adaptive optics images by use of object and point-spread function power spectra. *Applied Optics*, 37(21), 4614-4622.
- Daniels, J. T., Dart, J. K. G., Tuft, S. J., & Khaw, P. T. (2001). Corneal stem cells in review. *Wound Repair and Regeneration*, 9(6), 483-494.
- Dawson, D. G., Ubels, J. L., & Edelhauser, H. F. (2011). Cornea and sclera. In L. A. Levin, S. F. E. Nilsson, J. Ver Hoeve, S. M. Wu, P. Kaufman, & A. Alm (Eds.), *Adler's physiology of the eye* (11th ed., pp. 71-130). Elsevier.
- De, K., & Masilamani, V. (2013). Image sharpness measure for blurred images in frequency domain. *Procedia Engineering*, 64, 149-158.
- De Paepe, A., & Malfait, F. (2012). The Ehlers – Danlos syndrome , a disorder with many faces. *Clinical Genetics*, 82(1), 1-11.
- Delmonte, D. W., & Kim, T. (2011). Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 37(3), 588-598.
- Delori, F. C., Webb, R. H., & Sliney, D. H. (2007). Maximum permissible exposures for ocular safety (ANSI 2000), with emphasis on ophthalmic devices. *Journal of the Optical Society of America A*, 24(5), 1250.

- Deng, S. X., Sejpal, K. D., Tang, Q., Aldave, A. J., Lee, O. L., & Yu, F. (2012). Characterization of limbal stem cell deficiency by in vivo laser scanning confocal microscopy a microstructural approach. *Archives of Ophthalmology*, *130*(4), 440-445.
- Denk, W., Strickler, J. H., & Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, *248*(4951), 73-76.
- Dorn, R., Quabis, S., & Leuchs, G. (2003). Sharper focus for a radially polarized light beam. *Physical Review Letters*, *91*(23), 1-4.
- Dua, H. S., & Azuara-Blanco, A. (2000). Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Survey of Ophthalmology*, *44*(5), 415-425.
- Duma, V.-F. (2010). Optimal scanning function of a galvanometer scanner for an increased duty cycle. *Optical Engineering*, *49*(10), 103001.
- Duma, V.-F., Tankam, P., Huang, J., Won, J., & Rolland, J. P. (2015). Optimization of galvanometer scanning for optical coherence tomography. *Applied Optics*, *54*(17), 5495.
- Ehlers, N., & Hjortdal, J. (2005). The cornea: Epithelium and stroma. In J. Fischberg (Ed.), *Advances in Organ Biology* (1st Ed, Vol. 10, Issue 05, pp. 83-111). Elsevier.
- Ehmke, T., Nitzsche, T. H., Knebl, A., & Heisterkamp, A. (2014). Molecular orientation sensitive second harmonic microscopy by radially and azimuthally polarized light. *Biomedical Optics Express*, *5*(7), 2231.
- Ehmke, T., Leckelt, J., Reichard, M., Weiss, H., Hovakimyan, M., Heisterkamp, A., Stachs, O., & Baltrusch, S. (2016). In vivo nonlinear imaging of corneal structures with special focus on BALB/c and streptozotocin-diabetic Thy1-YFP mice. *Experimental Eye Research*, *146*, 137-144.
- Fernández, E. J., Iglesias, I., & Artal, P. (2001). Closed-loop adaptive optics in the human eye. *Optics Letters*, *26*(10), 746.
- Fine, S., & Hansen, W. P. (1971). Optical second harmonic generation in biological systems. *Applied Optics*, *10*(10), 2350.
- Fischberg, J. (2006). The corneal endothelium. *Advances in Organ Biology*, *10*(05), 113-125.
- Franken, P. A., Hill, A. E., Peters, C. W., & Weinreich, G. (1961). Generation of optical harmonics. *Physical Review Letters*, *7*(4), 118-120.
- Fratzl, P. (2008). *Collagen* (P. Fratzl (ed.); 1st ed.). Springer US.
- Gartner, L. P. (2021). Matriz extracelular. In *Texto de histología. Atlas a color* (5ta ed., pp. 65-78). Elsevier.
- Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens — structure, function and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *55*(12), 1531-1546.
- Germann, J. A., Martínez-Enríquez, E., Carmen Martínez-García, M., Kochevar, I. E., & Marcos, S. (2020). Corneal collagen ordering after in vivo Rose Bengal and riboflavin cross-linking. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *61*(3), 28.
- Gonzalez, R. C., & Woods, R. E. (2018). *Digital Image Processing* (4 Ed). Pearson.

- Gonzalez, J. M., Ko, M. K., Pouw, A., & Tan, J. C. H. (2016). Tissue-based multiphoton analysis of actomyosin and structural responses in human trabecular meshwork. *Scientific Reports*, *6*, 21315.
- Göppert-Mayer, M. (1931). Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen Der Physik*, *401*(3), 273–294.
- Gualda, E. J., Bueno, J. M., & Artal, P. (2010). Wavefront optimized nonlinear microscopy of ex vivo human retinas. *Journal of Biomedical Optics*, *15*(2), 026007.
- Guo, Y., Ho, P. P., Savage, H., Harris, D., Sacks, P., Schantz, S., Liu, F., Zhadin, N., & Alfano, R. R. (1997). Second-harmonic tomography of tissues. *Optics Letters*, *22*(17), 1323.
- Gusachenko, I., Latour, G., & Schanne-Klein, M.-C. (2010). Polarization-resolved Second Harmonic microscopy in anisotropic thick tissues. *Optics Express*, *18*(18), 19339.
- Gusachenko, I., Tran, V., Houssen, Y. G., Allain, J. M., & Schanne-Klein, M. C. (2012). Polarization-resolved second-harmonic generation in tendon upon mechanical stretching. *Biophysical Journal*, *102*(9), 2220-2229.
- Guthoff, R. F., Zhivov, A., & Stachs, O. (2009). Review in vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea – a major review. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, *37*, 100-117.
- Haagdorens, M., Van Acker, S. I., Van Gerwen, V., Ní Dhubhghaill, S., Koppen, C., Tassignon, M.-J., & Zakaria, N. (2016). Limbal stem cell deficiency: Current treatment options and emerging therapies. *Stem Cells International*, *2016*, 1-22.
- Han, M., Giese, G., & Bille, J. (2005). Second harmonic generation imaging of collagen fibrils in cornea and sclera. *Optics Express*, *13*(15), 5791-5797.
- Hao, M., Flynn, K., Nien-Shy, C., Jester, B. E., Winkler, M., Brown, D. J., La Schiazza, O., Bille, J., & Jester, J. V. (2010). In vivo non-linear optical (NLO) imaging in live rabbit eyes using the Heidelberg Two-Photon Laser Ophthalmoscope. *Experimental Eye Research*, *91*(2), 308-314.
- Haralick, R. M., Shanmugam, K., & Dinstein, I. (1973). Textural features for image classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, *SMC-3*(6), 610-621.
- Hasegawa, S. (1998). Multi-photon fluorescence microscopy. *Acta Histochemica et Cytochemica*, *31*(4), 293-296.
- Helmchen, F., & Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*, *2*(12), 932-940.
- Hernández-García, C., Turpin, A., Román, J. S., Picón, A., Drevinskas, R., Cerkauskaite, A., Kazansky, P., Durfee, C., & Sola, L. (2017). Extreme ultraviolet vector beams driven by multicycle infrared laser pulses. *Conference on Lasers and Electro-Optics*, OSA Technical Digest (online), paper Stu1I.1.
- Hickson, P. (2014). Atmospheric and adaptive optics. *The Astronomy and Astrophysics Review*, *22*(1), 76.
- Hough, P. V. C. (1962). *Method and means for recognizing complex patterns* (Patent No. 3,069,654).

- Hristu, R., Eftimie, L. G., Stanciu, S. G., Tranca, D. E., Paun, B., Sajin, M., & Stanciu, G. A. (2018). Quantitative second harmonic generation microscopy for the structural characterization of capsular collagen in thyroid neoplasms. *Biomedical Optics Express*, 9(8), 3923.
- Hsueh, C.-M., Hu, P.-S., Lo, W., Chen, S.-J., Tan, H.-Y., & Dong, C.-Y. (2016). SHG and multiphoton fluorescence imaging of the eye. In F. S. Pavone & P. J. Campagnola (Eds.), *Second Harmonic Generation Imaging* (pp. 271-288). CRC Press.
- Hunter, J. J., Cookson, C. J., Kisilak, M. L., Bueno, J. M., & Campbell, M. C. W. (2007). Characterizing image quality in a scanning laser ophthalmoscope with differing pinholes and induced scattered light. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision*, 24(5), 1284-1295.
- Illingworth, J., & Kittler, J. (1988). A survey of the hough transform. *Computer Vision, Graphics and Image Processing*, 44(1), 87-116.
- Iracheta Lizarbe, M. A. (2001). El colágeno, ¿un cemento biológico que mantiene la arquitectura y plasticidad tisular? In Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales (Ed.), *Horizontes culturales: las fronteras de la ciencia : 2000* (pp. 119-137). Espasa Calpe.
- Jalbert, I., Wales, N. S., & Sydney, U. (2003). In vivo confocal microscopy of the human cornea. *British Journal of Ophthalmology*, 87, 225-236.
- Jayabalan, G. S., Bille, J. F., Mao, X. W., Gimbel, H. V., Rauser, M. E., Wenz, F., & Fan, J. T. (2019). Retinal safety evaluation of two-photon laser scanning in rats. *Biomedical Optics Express*, 10(7), 3217.
- Jester, J. V., Winkler, M., Jester, B. E., Nien, C., Chai, D., & Brown, D. J. (2010). Evaluating corneal collagen organization using high-resolution nonlinear optical macroscopy. *Eye and Contact Lens*, 36(5), 260-264.
- Jigang, H., Qin, Q., Jie, W., & Hui, F. (2018). Two-dimensional laser galvanometer scanning technology for additive manufacturing. *International Journal of Materials, Mechanics and Manufacturing*, 6(5), 332-336.
- Kadler, K. E., Baldock, C., Bella, J., & Boot-Handford, R. P. (2007). Collagens at a glance. *Journal of Cell Science*, 120(12), 1955-1958.
- Kaiser, W., & Garrett, C. G. B. (1961). Two-photon excitation in CaF<sub>2</sub>: Eu<sup>2+</sup>. *Physical Review Letters*, 7(6), 229-231.
- Kim, J., Kim, D. C., & Back, S. H. (2009). Demonstration of high lateral resolution in laser confocal microscopy using annular and radially polarized light. *Microscopy Research and Technique*, 72(6), 441-446.
- Kistenev, Y. V., Nikolaev, V. V., Kurochkina, O. S., Borisov, A. V., Vrazhnov, D. A., & Sandykova, E. A. (2019). Application of multiphoton imaging and machine learning to lymphedema tissue analysis. *Biomedical Optics Express*, 10(7), 3353.
- Kobashi, H., & Rong, S. S. (2017). Corneal collagen cross-linking for keratoconus: Systematic review. *BioMed Research International*, 2017, 8145651.
- Koehler, M. J., König, K., Elsner, P., Bückle, R., & Kaatz, M. (2006). In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. *Optics Letters*, 31(19), 2879.

- Kolenc, O. I., & Quinn, K. P. (2019). Evaluating cell metabolism through autofluorescence imaging of NAD(P)H and FAD. *Antioxidants & Redox Signaling*, *30*(6), 875-889.
- Kozawa, Y., Hibi, T., Sato, A., Horanai, H., Kurihara, M., Hashimoto, N., Yokoyama, H., Nemoto, T., & Sato, S. (2011). Lateral resolution enhancement of laser scanning microscopy by a higher-order radially polarized mode beam. *Optics Express*, *19*(17), 15947.
- Kozawa, Y., & Sato, S. (2015). Numerical analysis of resolution enhancement in laser scanning microscopy using a radially polarized beam. *Optics Express*, *23*(3), 2076.
- Kruse, F.E. (1994). Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye*, *8*(2), 170-183.
- Kundur, D., & Hatzinakos, D. (1996). Blind image deconvolution. *IEEE Signal Processing Magazine*, *13*(3), 43-64.
- Lagali, N., Edén, U., Utheim, T. P., Chen, X., Riise, R., Dellby, A., & Fagerholm, P. (2013). In vivo morphology of the limbal palisades of vogt correlates with progressive stem cell deficiency in aniridia-related keratopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *54*(8), 5333-5342.
- Latour, G., Gusachenko, I., Kowalczyk, L., Lamarre, I., & Schanne-Klein, M.-C. (2012). In vivo structural imaging of the cornea by polarization-resolved second harmonic microscopy. *Biomedical Optics Express*, *3*(1), 1-15.
- Lee, C. H., Singla, A., & Lee, Y. (2001). Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, *221*(1-2), 1-22.
- Lee, H., Huttunen, M. J., Hsu, K.-J., Partanen, M., Zhuo, G.-Y., Kauranen, M., & Chu, S.-W. (2013). Chiral imaging of collagen by second-harmonic generation circular dichroism. *Biomedical Optics Express*, *4*(6), 909.
- Lee, J. H., Lee, S., Ghoo, Y. S., Song, I. S., Tchah, H., Kim, M. J., & Kim, K. H. (2015). Comparison of confocal microscopy and two-photon microscopy in mouse cornea in vivo. *Experimental Eye Research*, *132*, 101-108.
- Lee, J. H., Lee, S., Yoon, C. J., Park, J. H., Tchah, H., Kim, M. J., & Kim, K. H. (2016). Comparison of reflectance confocal microscopy and two-photon second harmonic generation microscopy in fungal keratitis rabbit model ex vivo. *Biomedical Optics Express*, *7*(2), 677.
- Lee, S.-L., Chen, Y.-F., & Dong, C.-Y. (2019). Second harmonic generation imaging reveals asymmetry in the rotational helicity of collagen lamellae in chicken corneas. *Biomedical Optics Express*, *10*(10), 5223.
- Lin, S., & Hao, S. (2020). Multiphoton microscopy imaging analysis: non-destructive inspection for the cornea. *Laser Physics*, *30*(12), 123001.
- Lin, S.-J., Wu, R.-J., Tan, H.-Y., Lo, W., Lin, W.-C., Young, T.-H., Hsu, C.-J., Chen, J.-S., Jee, S.-H., & Dong, C.-Y. (2005). Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy. *Optics Letters*, *30*(17), 2275.
- Liu, S., Li, S., Wang, B., Lin, X., Wu, Y., Liu, H., Qu, X., Dai, J., Zhou, X., & Zhou, H. (2016). Scleral cross-linking using riboflavin UVA irradiation for the prevention of myopia progression in a guinea pig model: Blocked axial extension and altered scleral microstructure. *PLoS ONE*, *11*(11), 1-16.



- Lo, W., Sun, Y., Lin, S.-J., Jee, S.-H., & Dong, C.-Y. (2005). Spherical aberration correction in multiphoton fluorescence imaging using objective correction collar. *Journal of Biomedical Optics*, *10*(3), 034006.
- Lo, W., Wang, T.-J., Chen, W.-L., Hsueh, C.-M., Chen, S.-J., Chen, Y.-F., Chou, H.-C., Lin, P.-J., Hu, F.-R., & Dong, C.-Y. (2010). Label-free structural characterization of mitomycin C–modulated wound healing after photorefractive keratectomy by the use of multiphoton microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, *15*(3), 036005.
- Lo, W., Chen, W. L., Hsueh, C. M., Ghazaryan, A. A., Chen, S. J., Hui-Kang Ma, D., Dong, C. Y., & Tan, H. Y. (2012). Fast fourier transform-based analysis of second-harmonic generation image in keratoconic cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *53*(7), 3501-3507.
- Lombardo, M., Serrao, S., Barbaro, V., Di Iorio, E., & Lombardo, G. (2017). Multimodal imaging quality control of epithelia regenerated with cultured human donor corneal limbal epithelial stem cells. *Scientific Reports*, *7*(1), 5154.
- Ma, J., Wang, Y., & Wei, P. (2018). ScienceDirect Biomechanics and structure of the cornea: implications and association with corneal disorders. *Survey of Ophthalmology*, *63*(6), 851-861.
- Magalhaes, O. A., Rohenkohl, H. C., Todeschini DeSouza, L., Schuler-faccini, L., & Félix, T. M. (2018). Collagen I defect corneal profiles in osteogenesis imperfecta. *Cornea*, *37*(12), 1561-1565.
- Marshall, G. E., Konstas, A. G. P., & Lee, W. R. (1993). Collagens in ocular tissues. *British Journal of Ophthalmology*, *77*(8), 515-524.
- Martin, R. (2018). Cornea and anterior eye assessment with slit lamp biomicroscopy, specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound microscopy. *Indian Journal of Ophthalmology*, *66*(2), 195-201.
- Martínez-Abad, A., & Piñero, D. P. (2019). Pellucid marginal degeneration: Detection, discrimination from other corneal ectatic disorders and progression. *Contact Lens and Anterior Eye*, *42*(4), 341-349.
- Martínez-Ojeda, R. M., Pérez-Cárceles, M. D., Ardelean, L. C., Stanciu, S. G., & Bueno, J. M. (2020). Multiphoton microscopy of oral tissues: Review. *Frontiers in Physics*, *8*, 128.
- MATLAB. (2017). *MATLAB version 9.2.0.538062 (R2017a)*. The MathWorks Inc.
- Matteini, P., Ratto, F., Rossi, F., Cicchi, R., Stringari, C., Kapsokalyvas, D., Pavone, F. S., & Pini, R. (2009). Photothermally-induced disordered patterns of corneal collagen revealed by SHG imaging. *Optics Express*, *17*(6), 4868.
- McBrien, N. A., & Gentle, A. (2003). Role of the sclera in the development and pathological complications of myopia. *Progress in Retinal and Eye Research*, *22*(3), 307-338.
- McNally, J. G., Karpova, T., Cooper, J., & Conchello, J. A. (1999). Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, *19*(3), 373-385.
- Meek, K., & Fullwood, N. (2001). Corneal and scleral collagens—a microscopist's perspective. *Micron*, *32*(3), 261-272.

- Meek, K. M., & Knupp, C. (2015). Progress in retinal and eye research corneal structure and transparency. *Progress in Retinal and Eye Research*, 49, 1-16.
- Mega, Y., Robitaille, M., Zareian, R., McLean, J., Ruberti, J., & DiMarzio, C. (2012). Quantification of lamellar orientation in corneal collagen using second harmonic generation images. *Optics Letters*, 37(16), 3312.
- Meller, D., Peters, K., & Meller, K. (1997). Human cornea and sclera studied by atomic force microscopy. *Cell and Tissue Research*, 288, 111-118.
- Mendel, J. M. (1983). *Optimal Seismic Deconvolution*. Elsevier.
- Meng, P., Pereira, S., & Urbach, P. (2018). Confocal microscopy with a radially polarized focused beam. *Optics Express*, 26(23), 29600.
- Mercatelli, R., Ratto, F., Rossi, F., Tatini, F., Menabuoni, L., Malandrini, A., Nicoletti, R., Pini, R., Pavone, F. S., & Cicchi, R. (2017a). Three-dimensional mapping of the orientation of collagen corneal lamellae in healthy and keratoconic human corneas using SHG microscopy. *Journal of Biophotonics*, 10(1), 75-83.
- Mercatelli, R., Ratto, F., Rossi, F., Menabuoni, L., Malandrini, A., Tatini, F., Nicoletti, R., Pini, R., Pavone, F. S., & Cicchi, R. (2017b). Three-dimensional mapping of corneal lamellar orientation by means of backward-scattered SHG microscopy. In E. Beaufrepaire, F. S. Pavone, & P. T. C. So (Eds.), *Advances in Microscopic Imaging* (Vol. 10414, p. 1041407).
- Miri, A., Alomar, T., Nubile, M., Al-aqaba, M., Lanzini, M., Fares, U., Said, D. G., Lowe, J., & Dua, H. S. (2012). In vivo confocal microscopic findings in patients with limbal stem cell deficiency. *British Journal of Ophthalmology*, 96(4), 523-529.
- Mompeán, J., Aragón, J. L., Prieto, P. M., & Artal, P. (2018). Design of an accurate and high-speed binocular pupil tracking system based on GPGPUs. *Journal of Supercomputing*, 74(5), 1836-1862.
- Morishige, N., Petroll, M. W., Nishida, T., Kenney, C. M., & Jester, J. V. (2006). Noninvasive corneal stromal collagen imaging using two-photon-generated second-harmonic signals. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 32(11), 1784-1791.
- Morishige, N., Wahlert, A. J., Kenney, M. C., Brown, D. J., Kawamoto, K., Chikama, T. I., Nishida, T., & Jester, J. V. (2007). Second-harmonic imaging microscopy of normal human and keratoconus cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(3), 1087-1094.
- Morishige, N., Yamada, N., Teranishi, S., Chikama, T. ichiro, Nishida, T., & Takahara, A. (2009). Detection of subepithelial fibrosis associated with corneal stromal edema by second harmonic generation imaging microscopy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 50(7), 3145-3150.
- Morishige, N., Takagi, Y., Chikama, T., Takahara, A., & Nishida, T. (2011). Three-dimensional analysis of collagen lamellae in the anterior stroma of the human cornea visualized by second harmonic generation imaging microscopy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(2), 911.
- Morishige, N., Shin-Gyou-Uchi, R., Azumi, H., Ohta, H., Morita, Y., Yamada, N., Kimura, K., Takahara, A., & Sonoda, K. H. (2014). Quantitative analysis of collagen lamellae in the normal and keratoconic human cornea by second harmonic generation imaging microscopy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(12), 8377-8385.

- Moshirfar, M., Edmonds, J. N., Behunin, N. L., & Christiansen, S. M. (2014). Current options in the management of pellucid marginal degeneration. *Journal of Refractive Surgery*, 30(7), 474-485.
- Murray, J. M. (2011). Methods for imaging thick specimens: Confocal microscopy, deconvolution, and structured illumination. *Cold Spring Harbor Protocols*, 6(12), 1399-1437.
- Newton, R. H., & Meek, K. M. (1998). Circumcorneal annulus of collagen fibrils in the human limbus. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 39(7), 1125-1134.
- Nishida, T., & Saika, S. (2011). Cornea and sclera: Anatomy and physiology. In J. H. Krachmer, M. J. Mannis, & E. J. Holland (Eds.), *Cornea* (3rd ed., pp. 3-24). Elsevier.
- Nishida, T., Saika, S., & Morishige, N. (2021). Cornea and sclera: anatomy and physiology. In M. J. Mannis & E. J. Holland (Eds.), *Cornea* (Fifth Edit, pp. 1-22). Elsevier Health Sciences.
- Norman, R. E., Flanagan, J. G., Rausch, S. M. K., Sigal, I. A., Tertinegg, I., Eilaghi, A., Portnoy, S., Sled, J. G., & Ethier, C. R. (2010). Dimensions of the human sclera: Thickness measurement and regional changes with axial length. *Experimental Eye Research*, 90(2), 277-284.
- Nourrit, V., Vohnsen, B., & Artal, P. (2005). Blind deconvolution for high-resolution confocal scanning laser ophthalmoscopy. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 7(10), 585-592.
- Oheim, M., Michael, D. J., Geisbauer, M., Madsen, D., & Chow, R. H. (2006). Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(7), 788-808.
- Oliveira-Soto, L., & Efron, N. (2001). Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea*, 20(4), 374-384.
- Oron, R., Blit, S., Davidson, N., Friesem, A. A., Bomzon, Z., & Hasman, E. (2000). The formation of laser beams with pure azimuthal or radial polarization. *Applied Physics Letters*, 77(21), 3322-3324.
- Pang, S., Yeh, A. T., Wang, C., & Meissner, K. E. (2009). Beyond the  $1/T$ [sub p] limit: two-photon-excited fluorescence using pulses as short as sub-10-fs. *Journal of Biomedical Optics*, 14(5), 054041.
- Pantalon, A., Pfister, M., Aranha dos Santos, V., Sapeta, S., Unterhuber, A., Pircher, N., Schmidinger, G., Garhöfer, G., Schmidl, D., Schmetterer, L., & Werkmeister, R. M. (2019). Ultrahigh-resolution anterior segment optical coherence tomography for analysis of corneal microarchitecture during wound healing. *Acta Ophthalmologica*, 97(5), e761-e771.
- Paoli, J., Smedh, M., Wennberg, A. M., & Ericson, M. B. (2008). Multiphoton laser scanning microscopy on non-melanoma skin cancer: Morphologic features for future non-invasive diagnostics. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(5), 1248-1255.
- Park, C. Y., Lee, J. K., & Chuck, R. S. (2015a). Second harmonic generation imaging analysis of collagen arrangement in human cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56(9), 5622-5629.

- Park, C. Y., Lee, J. K., Zhang, C., & Chuck, R. S. (2015b). New details of the human corneal limbus revealed with second harmonic generation imaging. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *56*(10), 6058-6066.
- Patel, D. V., Sherwin, T., & McGhee, C. N. J. (2006). Laser scanning in vivo confocal microscopy of the normal human corneoscleral limbus. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *47*(7), 2823-2827.
- Pawłowska, M., Goetz, S., Dreher, C., Wurdack, M., Krauss, E., Razinskas, G., Geisler, P., Hecht, B., & Brixner, T. (2014). Shaping and spatiotemporal characterization of sub-10-fs pulses focused by a high-NA objective. *Optics Express*, *22*(25), 31496.
- Periasamy, A., Skoglund, P., Noakes, C., & Keller, R. (1999). An evaluation of two-photon excitation versus confocal and digital deconvolution fluorescence microscopy imaging in *Xenopus* morphogenesis. *Microscopy Research and Technique*, *47*(3), 172-181.
- Quabis, S., Dorn, R., Eberler, M., Glockl, O., & Leuchs, G. (2000). Focusing light to a tighter spot. *Optics Communications*, *179*(1-6), 1-7.
- Radhakrishnan, S., Rollins, A. M., Roth, J. E., Yazdanfar, S., Westphal, V., Bardenstein, D. S., & Izatt, J. A. (2001). Real-time optical coherence tomography of the anterior segment at 1310 nm. *Archives of Ophthalmology*, *119*(8), 1179-1185.
- Rakhshanfar, M., & Amer, M. A. (2018). Sparsity-based no-reference image quality assessment for automatic denoising. *Signal, Image and Video Processing*, *12*(4), 739-747.
- Rathi, V. M., Dumpati, S., Mandathara, P. S., Taneja, M. M., & Sangwan, V. S. (2016). Contact lens and anterior eye scleral contact lenses in the management of pellucid marginal degeneration. *Contact Lens and Anterior Eye*, *39*(3), 217-220.
- Ricard-Blum, S., & Ruggiero, F. (2005). The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathologie Biologie*, *53*(7), 430-442.
- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(1), a004978.
- Robertson, D. M., Rogers, N. A., Petroll, W. M., & Zhu, M. (2017). Second harmonic generation imaging of corneal stroma after infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, *7*, 4611.
- Robles Arias, R. (2003). *Deconvolución de imágenes bajo multirresolución*. [Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla].
- Romano, A. C., Espana, E. M., Yoo, S. H., Budak, M. T., Wolosin, J. M., & Tseng, S. C. G. (2003). Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *44*(12), 5125-5129.
- Romero-Jiménez, M., Santodomingo-Rubido, J., & Wolffsohn, J. S. (2010). Keratoconus: A review. *Contact Lens and Anterior Eye*, *33*(4), 157-166.
- Roth, S., & Freund, I. (1979). Second harmonic generation in collagen. *The Journal of Chemical Physics*, *70*(4), 1637-1643.
- Saavedra, G., Escobar, I., Martínez-Cuenca, R., Sánchez-Ortiga, E., & Martínez-Corral, M. (2009). Reduction of spherical-aberration impact in microscopy by wavefront coding. *Optics Express*, *17*(16), 13810.

- Salomão, M. Q., Hofling-Lima, A. L., Esporcatte, L. P. G., Correa, F. F., Lopes, B., Sena Jr., N., Dawson, D. G., & Ambrósio Jr., R. (2021). Ectatic diseases. *Experimental Eye Research*, 202(2021), 108347.
- Sanderson, M. J. (2004). Acquisition of multiple real-time images for laser scanning microscopy. *Microscopy and Analysis*, 18(4), 17-23.
- Sanz-Marco, E., García Delpech, S., López-Prats, M. J., & Díaz-Llopis, M. (2011). El cross-linking, un nuevo abordaje de la queratopatía bullosa. *Archivos de La Sociedad Española de Oftalmología*, 86(12), 419-420.
- Schaeffel, F., & Feldkaemper, M. (2015). Animal models in myopia research. *Clinical and Experimental Optometry*, 98(6), 507-517.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676682.
- Schmitt, J. M. (1999). Optical Coherence Tomography (OCT): A review. *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*, 5(4), 1205-1215.
- Schwarz, C., Sharma, R., Fischer, W. S., Chung, M., Palczewska, G., Palczewski, K., Williams, D. R., & Hunter, J. J. (2016). Safety assessment in macaques of light exposures for functional two-photon ophthalmoscopy in humans. *Biomedical Optics Express*, 7(12), 5148.
- Schwarz, C., Sharma, R., Cheong, S. K., Keller, M., Williams, D. R., & Hunter, J. J. (2018). Selective S cone damage and retinal remodelling following intense ultrashort pulse laser exposures in the near-infrared. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 59(15), 5973-5984.
- Segawa, S., Kozawa, Y., & Sato, S. (2014a). Demonstration of subtraction imaging in confocal microscopy with vector beams. *Optics Letters*, 39(15), 4529.
- Segawa, S., Kozawa, Y., & Sato, S. (2014b). Resolution enhancement of confocal microscopy by subtraction method with vector beams. *Optics Letters*, 39(11), 3118.
- Shabayek, M. H., & Alió, J. L. (2006). Intrastromal corneal ring segment implantation by femtosecond laser for keratoconus correction. *Ophthalmology*, 114(9), 1643-1652.
- Sharma, R., Sharma, A., Arora, T., Sharma, S., Sobti, A., Jha, B., Chaturvedi, N., & Dada, T. (2014). Application of anterior segment optical coherence tomography in glaucoma. *Survey of Ophthalmology*, 59(3), 311-327.
- Sherman, L., Ye, J. Y., Albert, O., & Norris, T. B. (2002). Adaptive correction of depth-induced aberrations in multiphoton scanning microscopy using a deformable mirror. *Journal of Microscopy*, 206(1), 65-71.
- Shortt, A. J., Secker, G. A., Munro, P. M., Khaw, P. T., Tuft, S. J., & Daniels, J. T. (2007). Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: Novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells. *Stem Cells*, 25(6), 1402-1409.
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 929-958.

- Sibarita, J. B. (2005). Deconvolution microscopy. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 95, 201-243.
- Sivaguru, M., Kabir, M. M., Gartia, M. R., Biggs, D. S. C., Sivaguru, B. S., Sivaguru, V. A., Berent, Z. T., Wagoner Johnson, A. J., Fried, G. A., Liu, G. L., Sadayappan, S., & Toussaint, K. C. (2017a). Enhancing resolution and contrast in second-harmonic generation microscopy using an advanced maximum likelihood estimation restoration method. *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XVII*, 10069, 1006908.
- Sivaguru, M., Kabir, M. M., Gartia, M. R., Biggs, D. S. C., Sivaguru, B. S., Sivaguru, V. A., Fried, G. A., Liu, G. L., Sadayappan, S., & Toussaint, K. C. (2017b). Application of an advanced maximum likelihood estimation restoration method for enhanced-resolution and contrast in second-harmonic generation microscopy. *Journal of Microscopy*, 267(3), 397-408.
- Skala, M. C., Salaun, M., Veresezan, L., Sesboüé, R., Bohn, P., Boland, F.-X., & Thiberville, L. (2005). Multiphoton microscopy of endogenous fluorescence differentiates normal, precancerous, and cancerous squamous epithelial tissues. *Cancer Research*, 65(4), 1180-1186.
- Skorsetz, M., Artal, P., & Bueno, J. M. (2016). Performance evaluation of a sensorless adaptive optics multiphoton microscope. *Journal of Microscopy*, 261(3), 249-258.
- Skorsetz, M., Artal, P., & Bueno, J. M. (2018). Improved multiphoton imaging in biological samples by using variable pulse compression and wavefront assessment. *Optics Communications*, 422(May 2017), 44-51.
- Sliney, D., Aron-Rosa, D., Delori, F., Fankhauser, F., Landry, R., Mainster, M., Marshall, J., Rassow, B., Stuck, B., Trokel, S., West, T. M., & Wolffe, M. (2005). Adjustment of guidelines for exposure of the eye to optical radiation from ocular instruments: Statement from a task group of the International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP). *Applied Optics*, 44(11), 2162-2176.
- Smalley, P. J. (2011). Laser safety: risk, hazards, and control measures. *Laser Therapy*, 20(2), 95-106.
- Squier, J., & Müller, M. (2001). High resolution nonlinear microscopy: A review of sources and methods for achieving optimal imaging. *Review of Scientific Instruments*, 72(7), 2855-2867.
- Sridhar, M. S. (2004). Pellucid marginal corneal degeneration\*1. *Ophthalmology*, 111(6), 1102-1107.
- Sridhar, M. S. (2018). Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian Journal of Ophthalmology*, 66(2), 190-194.
- Stachs, O., Guthoff, R. F., & Aumann, S. (2019). In vivo confocal scanning laser microscopy. In J. F. Bille (Ed.), *High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology* (pp. 263-284). Springer Nature Switzerland.
- Stanciu, S. G., Ávila, F. J., Hristu, R., & Bueno, J. M. (2017). A study on image quality in polarization-resolved second harmonic generation microscopy. *Scientific Reports*, 7(1), 1-12.
- Starck, J. L., Pantin, E., & Murtagh, F. (2002). Deconvolution in astronomy: A review. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, 114(800), 1051-1069.

- Stoller, P., Reiser, K. M., Celliers, P. M., & Rubenchik, A. M. (2002). Polarization-modulated second harmonic generation in collagen. *Biophysical Journal*, 82(6), 3330-3342.
- Stoller, P., Celliers, P. M., Reiser, K. M., & Rubenchik, A. M. (2003). Quantitative second-harmonic generation microscopy in collagen. *Applied Optics*, 42(25), 5209.
- Summers Rada, J. A., Shelton, S., & Norton, T. T. (2006). The sclera and myopia. *Experimental Eye Research*, 82(2), 185-200.
- Tan, H. Y., Sun, Y., Lo, W., Lin, S. J., Hsiao, C. H., Chen, Y. F., Huang, S. C. M., Lin, W. C., Jee, S. H., Yu, H. S., & Dong, C. Y. (2006). Multiphoton fluorescence and second harmonic generation imaging of the structural alterations in keratoconus ex vivo. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47(12), 5251-5259.
- Tan, H.-Y., Sun, Y., Jee, S.-H., Lin, W.-C., Hsiao, C.-H., Lin, S.-J., Dong, C.-Y., Lin, H.-C., Lo, W., Teng, S.-W., Chen, Y.-F., Ma, D. H.-K., Wu, R.-J., & Huang, S. C.-M. (2007). Multiphoton fluorescence and second harmonic generation microscopy for imaging infectious keratitis. *Journal of Biomedical Optics*, 12(2), 024013-024018.
- Tan, H. Y., Chang, Y. L., Lo, W., Hsueh, C. M., Chen, W. L., Ghazaryan, A. A., Hu, P. S., Young, T. H., Chen, S. J., & Dong, C. Y. (2013). Characterizing the morphologic changes in collagen crosslinked-treated corneas by Fourier transform-second harmonic generation imaging. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 39(5), 779-788.
- Tang, S., Krasieva, T. B., Chen, Z., Tempea, G., & Tromberg, B. J. (2006). Effect of pulse duration on two-photon excited fluorescence and second harmonic generation in nonlinear optical microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 11(2), 020501.
- Teh, S. K., Zheng, W., Li, S., Li, D., Zeng, Y., Yang, Y., & Qu, J. Y. (2013). Multimodal nonlinear optical microscopy improves the accuracy of early diagnosis of squamous intraepithelial neoplasia the accuracy of early diagnosis of squamous. *Journal of Biomedical Optics*, 18(3), 036001.
- Tektas, O. Y., & Lütjen-Drecoll, E. (2009). Structural changes of the trabecular meshwork in different kinds of glaucoma. *Experimental Eye Research*, 88(4), 769-775.
- Teng, S. W., Tan, H. Y., Peng, J. L., Lin, H. H., Ki, H. K., Lo, W., Sun, Y., Lin, W. C., Lin, S. J., Jee, S. H., So, P. T. C., & Dong, C. Y. (2006). Multiphoton autofluorescence and second-harmonic generation imaging of the ex vivo porcine eye. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47(3), 1216-1224.
- Theodossiou, T., Georgiou, E., Hovhannisyan, V., & Yova, D. (2001). Visual observation of infrared laser speckle patterns at half their fundamental wavelength. *Lasers in Medical Science*, 16(1), 34-39.
- Tilbury, K., & Campagnola, P. J. (2015). Applications of second-harmonic generation imaging microscopy in ovarian and breast cancer. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 7, 21-32.
- Umbaugh, S. E. (2010). *Digital image processing and analysis* (2 Ed). CRC Press.
- Wang, B. G., Halbhuber, K. J., Riemann, I., & Koenig, K. (2005). In-vivo corneal nonlinear optical tomography based on second harmonic and multiphoton autofluorescence imaging induced by near-infrared femtosecond lasers with rabbits. *Detectors and Associated Signal Processing II*, 5964(ii), 59640O.

- Wang, T.-J., Lo, W., Hsueh, C. M., Hsieh, M. S., Dong, C. Y., & Hu, F. R. (2008). Ex vivo multiphoton analysis of rabbit corneal wound healing following conductive keratoplasty. *Journal of Biomedical Optics*, *13*(3), 034019.
- Wang, W., Wu, Z., & Zeng, H. (2015). Image distortion and its correction in linear galvanometric mirrors–based laser-scanning microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, *20*(5), 056001.
- Wang, C., Fomovsky, M., Miao, G., Zyablitskaya, M., & Vukelic, S. (2018). Femtosecond laser crosslinking of the cornea for non-invasive vision correction. *Nature Photonics*, *12*(7), 416-422.
- Wang, W., Wu, B., Liu, P., Liu, J., & Tan, J. (2019). Calculations of second harmonic generation with radially polarized excitations by elliptical mirror focusing. *Journal of Microscopy*, *273*(1), 36-45.
- Watson, P. G., & Young, R. D. (2004). Scleral structure, organisation and disease. A review. *Experimental Eye Research*, *78*(3), 609-623.
- Winkler, M., Shoa, G., Xie, Y., Petsche, S. J., Pinsky, P. M., Juhasz, T., Brown, D. J., & Jester, J. V. (2013). Three-dimensional distribution of transverse collagen fibers in the anterior human corneal stroma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *54*(12), 7293-7301.
- Winkler, M., Shoa, G., Tran, S. T., Xie, Y., Thomasy, S., Raghunathan, V. K., Murphy, C., Brown, D. J., & Jester, J. V. (2015). A comparative study of vertebrate corneal structure: The evolution of a refractive lens. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *56*(4), 2764.
- Wollensak, G., & Spoerl, E. (2004). Collagen crosslinking of human and porcine sclera. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, *30*(3), 689-695.
- Wu, Q., Applegate, B. E., & Yeh, A. T. (2011). Cornea microstructure and mechanical responses measured with nonlinear optical and optical coherence microscopy using sub-10-fs pulses. *Biomedical Optics Express*, *2*(5), 1135.
- Wu, X., Chen, G., Lu, J., Zhu, W., Qiu, J., Chen, J., Xie, S., Zhuo, S., & Yan, J. (2013). Label-free detection of breast masses using multiphoton microscopy. *PLoS ONE*, *8*(6), e65933.
- Wu, Y. F., Wang, C. Y., Yang, T. L., Tsao, P. N., Lin, S. J., & Tan, H. Y. (2019). Intravital multiphoton microscopic imaging platform for ocular surface imaging. *Experimental Eye Research*, *182*(November 2018), 194-201.
- Xi, P., Andegeko, Y., Weisel, L. R., Lozovoy, V. V., & Dantus, M. (2008). Greater signal, increased depth, and less photobleaching in two-photon microscopy with 10 fs pulses. *Optics Communications*, *281*(7), 1841-1849.
- Xie, J., Huang, S., Duan, Z., Shi, Y., & Wen, S. (2005). Correction of the image distortion for laser galvanometric scanning system. *Optics & Laser Technology*, *37*(4), 305-311.
- Xu, B., Coello, Y., Lozovoy, V. V., Ahmasi Harris, D., & Dantus, M. (2007). Pulse shaping of octave spanning femtosecond laser pulses. *Optics InfoBase Conference Papers*, *14*(22), 10882-10887.
- Yang, S., & Zhan, Q. (2008). Third-harmonic generation microscopy with tightly focused radial polarization. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, *10*(12), 1-6.



- Yeh, A. T., Nassif, N., Zoumi, A., & Tromberg, B. J. (2002). Selective corneal imaging using combined second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Optics Letters*, 27(23), 2082.
- Yew, E., & Sheppard, C. (2006). Effects of axial field components on second harmonic generation microscopy. *Optics Express*, 14(3), 1167.
- Yew, E., & Sheppard, C. (2007). Second harmonic generation polarization microscopy with tightly focused linearly and radially polarized beams. *Optics Communications*, 275(2), 453-457.
- Yoshida, M., Kozawa, Y., & Sato, S. (2019). Subtraction imaging by the combination of higher-order vector beams for enhanced spatial resolution. *Optics Letters*, 44(4), 883.
- Yoshiki, K., Hashtmoto, M., & Araki, T. (2005). Second-harmonic-generation microscopy using excitation beam with controlled polarization pattern to determine three-dimensional molecular orientation. *Japanese Journal of Applied Physics, Part 2: Letters*, 44(33-36), 1-4.
- Yüksel, N., Emre, E., & Pirhan, D. (2016). Evaluation of corneal microstructure in pseudoexfoliation syndrome and glaucoma: In vivo scanning laser confocal microscopic study. *Current Eye Research*, 41(1), 34-40.
- Zhan, Q. (2009). Cylindrical vector beams: from mathematical concepts to applications. *Advances in Optics and Photonics*, 1(1), 1.
- Zheng, T., & Xu, J. (2008). Age-related changes of human limbus on in vivo confocal microscopy. *Cornea*, 27(7), 782-786.
- Zipfel, W. R., Williams, R. M., & Webb, W. W. (2003). Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, 21(11), 1369-1377.
- Zyablitskaya, M., Munteanu, E. L., Nagasaki, T., & Paik, D. C. (2018). Second harmonic generation signals in rabbit sclera as a tool for evaluation of therapeutic tissue cross-linking (TXL) for myopia. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(131), 1-11.



# *Agradecimientos*

En este discreto espacio me gustaría agradecer de forma sincera la ayuda y asistencia de muchas personas a lo largo del desarrollo de esta Tesis Doctoral. Así como hacer una mención a la Agencia Estatal de Investigación, que ha financiado mi contrato durante desarrollo de este proyecto dentro del marco de Ayudas Predoctorales para la Formación de Doctores en la convocatoria de 2017 (referencia FPI: BES-2017-081691) del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Una de mis aficiones desde pequeña ha sido la lectura y, entre mis sueños, siempre estuvo escribir un libro. Reconozco que no creí que fuera a ser tan denso, Ken Follett estaría orgulloso.

Por eso, en primer lugar, quiero agradecer a la persona que ha dado lugar a que pudiera escribir este libro: Pablo Artal, investigador principal del Laboratorio de Óptica de la Universidad de Murcia (LO·UM) y codirector de esta Tesis Doctoral. Gracias por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto en el lugar donde descubrí que quería dedicarme a la ciencia, mientras realizaba mis prácticas curriculares y mi Trabajo de Fin de Grado en el LO·UM. También quiero agradecer su orientación y consejo en aquellos momentos en los que los pasos a seguir no estaban tan claros, así como por las ideas y sugerencias que han ayudado a que el hilo conductor de esta historia no tenga agujeros.

Es difícil escribir ciencia, mucho más de forma inteligible. Esto lo sabe bien Juanma Bueno, codirector y tutor de esta Tesis Doctoral, que se ha encargado de darle sentido a los resultados y párrafos de estas páginas. También es quien, ya en 2016, hizo que despertara mi interés por la microscopía multifotónica. Unos años más tarde, decidió que merecía la pena volver a confiar en mí para llevar a cabo este trabajo. Es por ello que no puedo dejar pasar la oportunidad de agradecerle por su paciencia, ideas, orientación, explicaciones y correcciones, así como también por las horas de experimentos, hablando de ciencia, música y libros. Queda en mi baúl de los recuerdos aquella rotura de codo en Londres durante el FOM 2019 (lejano año pre-pandémico) de la que fui testigo y la larga espera en la *Emergency Room* del St. Thomas' Hospital (tampoco se me va a olvidar que *elbow* significa codo). Eso sí, después de dar su charla (*The show must go on*). Pero, ¿qué sería de un congreso científico si no hubiera “imprevistos” fuera de programa y eventos sociales para comentarlos?

Durante estos años he tenido la oportunidad de trabajar con muchas personas de las que he podido aprender y que también me han ayudado a desarrollar esta historia, y a las que estoy muy agradecida: a Fran Ávila y Adrián Gambín por echarme muchas manos con el sistema experimental; a Laurent Mugnier de ONERA en Francia, por su ayuda a la hora de desarrollar

el método de deconvolución; de igual forma, a Carlos Hernández de la Universidad de Salamanca por prestarnos la lámina *S-waveplate* y ser crítico con los resultados.

El escenario principal de esta historia se ha localizado en el LO·UM, con compañeros a los que debo agradecer, no sólo su ayuda siempre que he requerido, sino también más de una cerveza y más de unas risas: a Carmen Martínez, Juan Mompeán, Vahid Pourreza, Zhenghua Lin, Raúl Duarte, Santi Sager, Consu Robles porque su iniciativa, su motivación y su visión (*chiste malo*, lo siento) de la ciencia y de la vida me hacen querer ser mejor profesional y persona. Especial mención a Alba Paniagua por su ayuda, consejos, soportar mis constantes quejas y *empujarme* (figuradamente) a escalar. Además, ha sido una oportunidad increíble trabajar con personas a las que conocí como estudiante y que me inculcaron las ganas de aprender más sobre óptica, como son Esther Berrio, Josua Fernández, Pedro Prieto, Eloy Villegas y Antonio Benito. Debo agradecerles, también, el permitirme ver la universidad desde su lado del aula.

A mis amigas, quiero pedirles perdón por todo lo que han tenido que aguantar entre mis constantes quejas, desvaríos y chistes malos. Por otro lado, debo agradecerles que me hayan sacado de casa y de mi zona de confort, así como su compañía en conciertos y festivales.

De mi familia, los que están cerca y los más retirados, estoy agradecida por su amor incondicional y alegrarse de mis logros.

A mis hermanos, Jose y Jorge, por estar siempre. A mi padre, Jose, y mi madre, Rosa, porque fundaron los cimientos de esta historia y, no solo han tenido palabras de aliento, sino que también han sido un apoyo indispensable en mi vida: no me alcanzan las palabras ni los actos para agradecerlos por todo.