



# Caracterización de blastos en sangre periférica humana por medio de microscopía de fase por difracción

Caori Alejandra Organista Castelblanco

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Física  
Bogotá, Colombia  
2017



# Caracterización de blastos en sangre periférica humana por medio de microscopía de fase por difracción

Caori Alejandra Organista Castelblanco

Tesis de maestría-investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Física**

Director(a):  
Ph.D. Freddy Alberto Monroy Ramírez

Línea de Investigación:  
Cuantificación de Fase  
Grupo de Investigación:  
Grupo de Óptica Aplicada (GOA)

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Física  
Bogotá, Colombia  
2017



*Al único y sabio Dios, sea la gloria mediante  
Jesucristo, para siempre. (Rm 16:27)*



Al Creador y Señor de todo cuanto existe.  
A mi padre, quien me amó primero.  
A mi madre, mi constante en la vida.  
A ellos, a quienes les debo todo.



## Agradecimientos

A Dios gracias siempre por Su revelación a través de la ciencia, por capacitarme para asumir cada reto y revelarme Su verdad en cada parte del proceso. He conocido más de quién es Él y quién soy yo en este camino que quiso trazar para mí.

A mis padres, porque han dado todo sin medida por mi bienestar. Porque no escatiman y abundan en amor, apoyo, consejos, inspiración y fuerza. Sin ellos caminar sería más difícil, con ellos todo tiene sentido. A mis hermanos, quienes me retan, me animan, me soportan, me ven.

Gracias a mi director de tesis, el profesor Freddy Alberto Monroy, quien a través de los años me ha enseñado a amar la investigación, a descubrir mis habilidades científicas, a ver la importancia de trabajar dedicada y esforzadamente para obtener resultados. Quien generosamente ha aportado a este proyecto y ha confiado en mí para desarrollarlo. Gracias por su tiempo, su instrucción, sus consejos, las oportunidades. Gracias por permitirme fallar y enseñarme a través de esos errores. Gracias por las nuevas oportunidades y los muchos intentos hasta concretar ideas, obtener resultados y sacar conclusiones.

Gracias a la Dra. Marcela Camacho, profesora del departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, por su generosa y abundante colaboración en el proceso experimental de esta tesis. Por su aporte en conocimiento y en rigurosidad científica que es inspiración para ser excelentes investigadores y maestros comprometidos.

Al Dr. Leonardo Enciso por sus aportes a la construcción del problema de investigación buscando abordar un problema social de nuestro país. Por disponer de su tiempo para aportar ideas, por proveer las muestras de los pacientes enfermos y discutir el proyecto. Al igual gracias a la Jefe Martha Lucía Díaz por ser parte de este equipo.

Gracias al profesor Gabriel Popescu, director del grupo de investigación de "Quantitative Phase Imaging" del Instituto Beckman en la Universidad de Illinois; por compartir sus conocimientos y abrir las puertas de su laboratorio. Su generosidad y amabilidad ayudaron a darle forma en Colombia a una técnica por él desarrollada. Gracias a él y a sus estudiantes de doctorado Mikhail Kandel, Hassaan Majeed y Chen Fei, quienes dedicaron tiempo valioso para compartir su conocimiento y experiencia investigativa.

Gracias al profesor Yobani Mejía por su instrucción, sus cursos, su paciencia y sus aportes. Gracias al profesor John Sandino por sus curiosas preguntas y sus observaciones acertadas que enriquecieron la discusión de ideas y resultados. Gracias al profesor Ramiro Cardona y German Arenas quienes desde el pregrado han motivado el gusto por la investigación con sus curiosos aportes y

preguntas.

Gracias a la Universidad Nacional de Colombia, la que ha sido mi casa por tantos años. Aquí he formado mi carácter, mi perfil profesional, mi vocación investigativa, y mi pasión por la enseñanza.

Gracias a los colegas, que con los años de formación durante la carrera se han hecho amigos. A los presentes, integrantes del grupo de Óptica Aplicada (GOA), que han estado de cerca en la construcción de las ideas, el desarrollo del proyecto y la consumación del documento: A Esteban Suárez, por su apoyo constante y consejo apropiado, por las discusiones académicas que en muchas oportunidades fueron luz para este proyecto. A Marcela Duarte, quien va adelante, siempre con firmeza y determinación, su constancia y dedicación me animan e inspiran, gracias Marcela por tantos años de esfuerzo y dedicación constante, ha sido un gusto llegar hasta aquí y seguir. A Estefanía Mendoza, gracias por siempre tener una solución pronta a los inconvenientes, por ver más adelante y no detenerse cuando las cosas parecen no funcionar, por cuidar, aconsejar y alentar. Juntos aprendimos que el trabajo en equipo enriquece a las personas y facilita los procesos, que las diferencias nos hacen más fuertes y los resultados son mejores. Además, que viajar a congresos tiene diversión incluida. A Carlos Chacón, gracias por que con su capacidad para solucionar problemas resolvimos varios problemas experimentales. A Jose Alfredo Gómez, el amigo de siempre y por quien llegué al grupo de óptica. A los que vienen detrás nuestro, que con sus experiencia y entusiasmo nos animan en momentos críticos: María González, Sergio Rengifo, Juan Carlos González y Santiago Bermudez. Ellos tienen la fuerza y entereza para hacer las cosas cada vez mejores.

A los colegas que están en la distancia: A Lina Beltrán, Alejandro Durán, William Torres, Aura Ramírez, Wilmar Rodríguez, Diego Castro y Andrea Pacheco. Todos, excelentes físicos y personas valiosas que han aportado para que esta tesis sea posible. Su amistad se forjó en los momentos críticos de nuestra formación profesional y su apoyo y consejo han sido claves para este proceso investigativo. En especial gracias a Silvia Ceballos, quien fue parte fundamental en la construcción de la propuesta y que ha aportado al desarrollo del proyecto. Gracias por confiar en que esto podía ser posible.

A mis amigos no colegas, que son mi fuerza, mi bastón y mi alegría. Gracias por creer que puedo y tengo, por ver en mí lo que no hay o no veo; y por su infinita paciencia para caminar junto a mí en estos años de altos y bajos. Gracias porque sin ustedes no podría disfrutar lo que hago. Sus palabras, consejos y oración llegaron siempre en el momento apropiado.

## Resumen

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un tipo de cáncer generado por el crecimiento desordenado de un grupo de células blancas, conocidas como linfocitos, que se forman en la médula ósea y rápidamente se difunden por el torrente sanguíneo; afectando a otros órganos y finalmente llevando a la muerte. Las pruebas de diagnóstico implementadas en la actualidad requieren análisis citométrico de muestras de médula ósea o marcación de sangre periférica para hacer conteo de células blásticas (células cancerígenas de sangre) presentes en sangre periférica a través de microscopía óptica. Estas técnicas son invasivas, requieren marcación y alteración de las células. Por lo tanto, se busca una técnica alterna implementando un microscopio de fase por difracción (DPM), la cual permite la medición de las variaciones de tamaño y de índice de refracción de las células de una forma no invasiva, para la detección de células blásticas en sangre periférica humana. En una primera fase se requiere distinguir células blásticas de otro tipo de células mononucleares como linfocitos T y B, y monocitos. En el presente trabajo se describe la técnica interferométrica DPM, la cual se llevó a cabo en dos pasos: un registro digital de hologramas plano-imagen usando un interferómetro de Mach-Zehnder (MZ) compacto y, la posterior reconstrucción numérica de dicho campo óptico complejo. Para la parte experimental se iluminaron las muestras con un haz láser de Helio-Neón (HeNe) y su patrón magnificado se hizo incidir sobre el interferómetro MZ, el cual divide el haz que porta la información de las muestras en estudio, en dos haces con el uso de una rejilla de difracción y, luego de filtrar con una microlente las frecuencias debidas al objeto en uno de ellos, los vuelve a reunir enfocando sobre un sensor de estado sólido su patrón de interferencia magnificado nuevamente; la posterior reconstrucción numérica de este campo óptico complejo, permite calcular las variaciones de índice de refracción y tamaño de las muestras bajo estudio, a partir de la amplitud y diferencia de fase recuperadas. De esta forma, se tienen los insumos para establecer parámetros de diferenciación poblacional morfométricos y de índice de refracción de células mononucleares y células blásticas. Para ello se describe el proceso de separación de poblaciones celulares mononucleares de sangre periférica por densidad, y se analizan de forma independiente células mononucleares de dos donantes enfermos y dos donantes sanos. A partir de las diferencias observadas entre los linfocitos, se establece un parámetro de distinción entre un linfocito sano y una célula blástica. Así, se valida la técnica DPM como un parámetro de diferenciación, abriendo camino a la posibilidad de validarla para el diagnóstico de LLA en el análisis de una muestra de sangre periférica humana.

**Palabras clave:** *Leucemia Linfocítica Aguda, Blastos, Linfocitos, Métodos de cuantificación de fase, Microscopía de fase por Difracción.*

## Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a type of cancer caused by the disordered growth of white blood cells, known as lymphocytes, which are formed in the bone marrow and rapidly diffuse through the bloodstream; affecting other organs and eventually leading to death. Diagnostic tests currently implemented require a cytometric analysis of bone marrow extraction or peripheral blood marking for counting of blastic cells present in it via light microscopy. These techniques are invasive, requiring labeling and alteration of cells. Therefore, an alternative technique is sought by implementing a diffraction phase microscope (DPM), which allows the measurement of the size and refractive index variations of the cells in a non-invasive way, looking for the detection of blast cells in human peripheral blood. In a first phase it is necessary to distinguish blastic cells from other mononuclear cells such as T and B lymphocytes and monocytes. In the present work it is described the DPM interferometric technique, which was carried out in two steps: a digital record of plane-image holograms using a compact Mach-Zehnder (MZ) interferometer and the subsequent numerical reconstruction of that complex optical field. For the experimental part, the samples were illuminated with a HeNe laser beam and its magnified pattern was placed onto the interferometer MZ, which divides the beam that carries the information of the samples in the study in two beams with the use of a diffraction grating. Then filtered the high frequencies, due to the object in one of them and once again focusing them on a solid state sensor, where a interference pattern magnified is generated; the subsequent numerical reconstruction of this complex optical field allows the calculation of the variations of refractive index and size of the samples under study, based on the amplitude and difference phases recovered. In this way, it is obtained the inputs for the establishment of morphometric parameters of population differentiation and refractive index of mononuclear cells and blast cells. For this purpose it is described the process of separation of peripheral blood mononuclear cell populations by density, and it is independently analyzed mononuclear cells from two diseased methods and two healthy ones. From the observed differences it is established a parameter of distinction between a healthy lymphocyte and a blast cell. Consequently, the DPM technique is validated as a differentiation parameter, opening the way to the possibility of validating it for the diagnosis of ALL in the analysis of a sample of human peripheral blood.

**Key Words:** *Acute lymphoblastic leukemia, blast cells, lymphocyte, quantitative phase imaging, Diffraction Phase Microscopy.*

# Contenido

<b>Resumen</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>XIV</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>XVI</b>
<b>Lista de símbolos</b>	<b>XVIII</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1. Estado del Arte</b>	<b>4</b>
1.1. Técnicas de Cuantificación de Fase . . . . .	4
1.2. Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) . . . . .	6
1.2.1. Clasificación de leucemias . . . . .	6
1.2.2. Pruebas diagnósticas de Leucemia Linfocítica Aguda . . . . .	7
<b>2. Cuantificación de Fase</b>	<b>11</b>
2.1. Técnicas de Cuantificación de fase . . . . .	11
2.1.1. Interferometría fuera de eje . . . . .	12
2.1.2. Métodos por corrimiento de fase . . . . .	12
2.1.3. Métodos de camino común . . . . .	13
2.1.4. Métodos de luz blanca . . . . .	13
2.2. Microscopía de fase por difracción . . . . .	14
2.2.1. Esquema de Funcionamiento de un DPM . . . . .	14
2.2.2. Principio Físico . . . . .	15
2.2.3. Parámetros de Diseño . . . . .	17
<b>3. Implementación de un Microscopio de Fase por Difracción para estudio de Sangre Periférica</b>	<b>25</b>
3.1. Parámetros de Diseño . . . . .	25
3.2. Reconstrucción del campo óptico complejo . . . . .	27
3.3. Cálculo de Índice de Refracción . . . . .	30
3.4. Calibración lateral en fase . . . . .	31
3.5. Preparación de Muestras Biológicas . . . . .	32
<b>4. Resultados y análisis</b>	<b>35</b>
4.1. Caracterización de células mononucleares en sangre periférica de donantes sanos . . . . .	35
4.1.1. Tamaño de células mononucleares sanas . . . . .	35

---

4.1.2. Cálculo del Índice de Refracción de células sanas . . . . .	38
4.2. Caracterización de Células Mononucleares en sangre periférica de pacientes con LLA	42
4.2.1. Tamaño de células mononucleares enfermas . . . . .	42
4.2.2. Cálculo del Índice de Refracción de células enfermas . . . . .	45
<b>5. Conclusiones y recomendaciones</b>	<b>48</b>
5.1. Conclusiones . . . . .	48
5.2. Recomendaciones y Trabajo a Futuro . . . . .	50
5.3. Productos . . . . .	50
<b>Apéndices</b>	<b>52</b>
<b>A. Anexo A: Protocolo Separación Linfocitos</b>	<b>53</b>
<b>B. Anexo B: Concepto Comité de Ética</b>	<b>56</b>
<b>C. Anexo C: Certificado Pasantía</b>	<b>58</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>60</b>

# Lista de figuras

1-1.	Desarrollo de las células sanguíneas en la médula ósea. Adaptado de la página del Instituto Nacional de Cáncer de EEUU.[1] . . . . .	7
1-2.	A la izquierda un linfocito y a la derecha un linfoblasto observados con un microscopio óptico y marcados para su visualización. Tomado de [2] . . . . .	8
2-1.	(a) Esquema del sistema óptico de un Microscopio de Fase por Difracción (DPM). Compuesto por una rejilla de difracción a la salida de un microscopio óptico y un sistema 4f. (b) Pinhole utilizado para realizar un filtrado de Fourier de primer orden de difracción. Imagen adaptada de[3]. . . . .	14
2-2.	Difracción de la luz por una rejilla de fase . . . . .	20
2-3.	Espectro de Fourier del campo óptico complejo censado por la CCD para un patrón de interferencia tomado por un DPM [3]. . . . .	21
2-4.	Esquema de la distribución espacial de los órdenes de difracción en el espacio de Fourier donde se describe el ancho del periodo para muestrear la señal sin que haya superposición de frecuencias. . . . .	22
2-5.	Relación entre la distancia entre máximos de intensidad y la diferencia de camino óptico, para un patrón de difracción registrado en una pantalla que se encuentra a una distancia $f_1$ de una rejilla de difracción. . . . .	23
3-1.	(a) Dimensiones del filtro de Fourier (b) Filtro con microlente incorporada . . . . .	26
3-2.	Esquema del Microscopio de fase por Difracción como esta dispuesto en el laboratorio. . . . .	27
3-3.	Planos presentes en la holografía digital. . . . .	28
3-4.	(a) Registro, (b) reconstrucción de amplitud y (c) reconstrucción del mapa de fase de los grupos 8 y 9 de la USAF . . . . .	31
3-5.	(a) Preparación y (b) bandas de separación de sangre de pacientes con LLA, obtenidas por el protocolo de separación con Ficoll . . . . .	33
4-1.	Imágenes de los linfocitos de las muestras (a) $S_1$ y (b) $S_2$ vistas por un microscopio óptico con un objetivo de microscopio de 40x . . . . .	36
4-2.	Histogramas de los diámetros de células mononucleares de la muestra $S_1$ en (a) escala lineal y (b) en escala logarítmica. . . . .	36
4-3.	Histogramas de los diámetros de células mononucleares de la muestra $S_2$ en (a) escala lineal y (b) en escala logarítmica. . . . .	37
4-4.	(a) Es la reconstrucción de amplitud de una célula de la muestra $S_2$ y (b) es el mapa de fase envuelto (c) el mapa de índice de refracción y (d) un perfil sobre el eje central de la célula superior . . . . .	39

<b>4-5.</b> (a), (c) y (e) son mapas de índice de refracción de células sanas para las tres clases de células presentes en las muestras $S_1$ y $S_2$ . (b) (d) (f) son sus respectivos perfiles sobre la línea indicada . . . . .	41
<b>4-6.</b> Imágenes de los linfocitos de las muestras (a) $E_1$ y (b) $E_2$ vistas por un microscopio óptico con un objetivo de microscopio de 40x . . . . .	42
<b>4-7.</b> Histogramas de los diámetros de células mononucleares de la muestra $E_1$ en (a) escala lineal y (b) en escala semi-logarítmica. . . . .	43
<b>4-8.</b> Histogramas de los diámetros de células mononucleares de la muestra $E_2$ en (a) escala lineal y (b) en escala semi-logarítmica. . . . .	43
<b>4-9.</b> (a) Es la reconstrucción de amplitud de una célula de la muestra $E_2$ y (b) es el mapa de fase envuelto, (c) el mapa de índice de refracción y (d) un perfil sobre el eje central de la célula superior . . . . .	45
<b>4-10.</b> (a), (c) y (e) son mapas de índice de refracción de células de pacientes con LLA para las tres clases de células presentes en las muestras $S_1$ y $S_2$ . (b) (d) y (f) son sus respectivos perfiles sobre la línea indicada . . . . .	47
<b>A-1.</b> Separación de linfocitos de glóbulos rojos por centrifugado en dos tubos de precipitado diferentes. . . . .	54
<b>A-2.</b> Linfocitos purificados vistos por microscopio óptico a una magnificación de 40x . . .	55

## Lista de tablas

2-1. Síntesis de los parámetros ópticos para el diseño del DPM, tomado de [3] . . . . .	24
3-1. Tabla de promedios de tamaños de pixel medidos en diferentes elementos de la tarjeta USAF . . . . .	32
4-1. Promedio de diámetro de células por los cuatro intervalos de confianza para la muestra $S_1$ . . . . .	37
4-2. Promedio de diámetro de células por los tres intervalos de confianza para la muestra $S_2$ . . . . .	38
4-3. Índice de Refracción Promedio para los grupos de células sanas para las muestras $S_1$ y $S_2$ . . . . .	40
4-4. Promedio de diámetro de células por los cinco intervalos de confianza para la muestra $E_1$ . . . . .	44
4-5. Promedio de diámetro de células por los cinco intervalos de confianza para la muestra $E_2$ . . . . .	44
4-6. Índice de Refracción Promedio para los grupos de células enfermas para las muestras $S_1$ y $S_2$ . . . . .	46

# Lista de símbolos y abreviaturas

## Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI
$n$	Índice de refracción integral	<i>adimensional</i>
$n_0$	Índice de refracción del medio	<i>adimensional</i>
$f_{1,2}$	Distancias focales	<i>cm</i>
$d_{abbe}$	Resolución de Abbe	$\mu m$
$a$	Tamaño del pixel de la CCD	$\mu m$
$S_{1,2}$	Muestras de donantes sanos	<i>adimensional</i>
$E_{1,2}$	Muestras de pacientes con LLA	<i>adimensional</i>
$d$	Diámetro de la célula	$\mu m$

## Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI
$\phi_{obj}$	Corrimiento de fase del haz objeto	°
$\phi_{ref}$	Corrimiento de fase del haz de referencia	°
$\lambda$	Longitud de onda	<i>nm</i>
$\Lambda$	Periodo de la rejilla de difracción	<i>l/mm</i>
$\beta$	Ángulo entre haces que interfieren	<i>l/mm</i>
$\Delta\varphi$	Diferencia de fase	°

## Subíndices

Subíndice	Término
Obj	Onda objeto
Ref	Onda de referencia

## Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ACS</i>	Sociedad Americana de Cáncer
<i>CCD</i>	Charge-Coupled Device
<i>CMOS</i>	Complementary Metal-Oxide-Semiconductor
<i>MHD</i>	Microscopía Holográfica Digital
<i>DPM</i>	Microscopía de Fase por Difracción
<i>FAB</i>	Grupo Cooperativo Francés-Americano-Británico
<i>FPM</i>	Microscopía de Fase de Fourier
<i>HPM</i>	Microscopía de Fase de Hilbert
<i>OPM</i>	Microscopía Óptica de Fase
<i>PDI</i>	Interferómetro de Difracción Puntual
<i>LMA</i>	Leucemia Mieloblástica Aguda
<i>LLA</i>	Leucemia Linfocítica Aguda
<i>RSC</i>	Conteo Sanguíneo Completo

# Introducción

La incidencia de diferentes tipos de cáncer ha venido en aumento en el mundo. Aunque algunos tumores han experimentado un estancamiento en su pronóstico, otros han mostrado una mejoría progresiva de la supervivencia [4]. Esta mejoría está relacionada con diferentes factores entre los que se destaca un mayor acceso a los servicios de salud, los programas de detección temprana y control de factores de riesgo, un mayor conocimiento de la biología de las neoplasias y el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a blancos moleculares específicos. Uno de los puntos más importantes para lograr mejorar el pronóstico es un diagnóstico temprano y preciso de la enfermedad. En el caso de las neoplasias hematológicas y en particular de las leucemias agudas, la introducción de métodos para análisis del inmunofenotipo de las células leucémicas como la citometría de flujo, ha permitido una mejor clasificación de estas neoplasias y el reconocimiento de nuevas características pronósticas como la persistencia de enfermedad mínima residual que prometen mejorar la selección de las estrategias de tratamiento [5]. Aun así, el cáncer sigue siendo un problema social de gran relevancia a nivel mundial [6].

Además de la citometría de flujo, en la física y en particular en el campo de la óptica, se han desarrollado diversas técnicas de cuantificación de fase, las cuales han sido aplicadas al estudio de células y tejidos vivos [7, 8]. Así, se han encontrado mecanismos ópticos para describir cambios del orden de nanómetros en células y determinado propiedades de las mismas como volumen y área superficial, entre otras [9, 10, 11]. Estos desarrollos buscan facilitar el diagnóstico y brindar nueva información sobre las características de las células tumorales que puedan permitir nuevas estrategias terapéuticas y mejorar pronóstico.

Actualmente el diagnóstico de la Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), requiere la realización de citometría de flujo en muestras de médula ósea y ocasionalmente en sangre periférica [12]. Este método diagnóstico es necesario para verificar el linaje de los blastos leucémicos y realizar una selección apropiada del tratamiento. Sin embargo, esta técnica está disponible en centros especializados y requiere además contar con personal experto para su realización. En ese sentido, el análisis morfológico en muestras de sangre realizado por microscopia de luz convencional en extendidos de sangre periférica por los profesionales locales en cada hospital es la primera prueba diagnóstica usualmente realizada y su sensibilidad para detectar de manera precisa poblaciones de blastos, esta sujeta a la experiencia y el entrenamiento de la persona que conduce el análisis.

Aunque las células blásticas de la LLA presentan características morfológicas que permiten su diferenciación, estas pueden ser confundidas con otros tipos celulares y no ser reportadas como malignas, generando retardos en establecer una sospecha diagnóstica correcta e iniciar el direccionamiento a un centro especializado de atención. Aún con la disponibilidad de analizadores hema-

tológicos automáticos que clasifican las poblaciones celulares de acuerdo a diferentes características, la verificación de los hallazgos anormales sigue siendo en la mayoría de los casos morfológica [13, 14]

El desarrollo de métodos precisos de detección de células blásticas y que puedan ser realizados en sangre periférica sin necesidad de utilizar coloraciones o anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos, permitiría una rápida identificación de los pacientes con LLA y su remisión oportuna a centros especializados de tratamiento antes de que se presenten complicaciones mayores que afecten la posibilidad de supervivencia.

Dentro de las diversas técnicas de cuantificación de fase desarrolladas en la última década, es la Microscopía de Fase por Difracción (DPM- por su sigla en inglés) la que permite obtener imágenes cuantitativas de diferencia de fase sensibles a cambios micrométricos en caminos ópticos durante amplias escalas temporales, sin altas exigencias de estabilidad mecánica [15]. Los interferogramas generados con esta técnica contienen información de diferencias de fase de los objetos estudiados, codificados en el patrón de irradiancia que a través de una reconstrucción digital aportan información de su morfología y composición interna. Por lo tanto, se tiene una técnica no invasiva que permite obtener información interna del objeto estudiado en una sola toma con alta sensibilidad y bajo ruido mecánico. Ya que esta técnica ha sido eficazmente aplicada al estudio de ciertos tejidos y células, es posible extender su aplicación al estudio y caracterización de la LLA.

El presente proyecto busca aprovechar las propiedades del microscopio de fase por difracción para estudiar propiedades físicas que permitan identificar en una muestra de sangre periférica, la presencia de células tumorales que permitan sin necesidad de utilizar coloraciones u otros métodos, diferenciarlas de células normales de manera sensible y específica.

Para que esto sea posible, se realiza una transferencia tecnológica del microscopio de difracción de fase que desde sus inicios ha sido implementado con luz coherente [3], luz blanca [6]; en reflexión para análisis microtopográfico y transmisión para analizar objetos traslucidos como células y tejidos vivos [16]. Aunque el DPM tiene este amplio espectro de modificaciones y aplicaciones, en esta transferencia, se busca diseñar y construir un interferómetro básico que sea capaz de resolver las células en estudio a bajo costo.

Por lo tanto, cabe hacer la siguiente pregunta de investigación: ¿El Microscopio de Fase por Difracción es una herramienta que permite caracterizar células sanguíneas de tal forma que en una muestra de sangre periférica sea posible diferenciar células tumorales (blastos) de otros tipos de células mononucleares?

En este sentido se plantea el objetivo principal de esta tesis: *Identificar características propias de la composición de sangre periférica humana con leucemia linfocítica aguda (LLA), por medio de la técnica de microscopía de fase por difracción (DPM).*

Para ello se implementa la técnica microscopía de fase por difracción (DPM) en el laboratorio del grupo de óptica aplicada de la Universidad Nacional de Colombia. Se identifican blastos a par-

tir de la caracterización morfométrica de la población de células existentes en sangre periférica, distinguiendo poblaciones de células mononucleares de pacientes con LLA y donantes sanos. Esto hace posible caracterizar ópticamente los blastos en sangre periférica humana, reportándose una diferencia en el índice de refracción de cada tipo de célula.

Para evidenciar el desarrollo metodológico, este documento de tesis esta distribuido de la siguiente manera: En el capítulo 1 se expone el estado del arte de las técnicas de cuantificación de fase y las pruebas diagnósticas de leucemia linfocítica aguda. En el capítulo 2 se presenta el marco conceptual de este proyecto, donde es describen las técnicas de cuantificación de fase y se establecen los principios físicos para el diseño de un microscopio de fase por difracción (DPM). Dados los parámetros de diseño, en el capítulo 3 se describe el proceso experimental para implementar el DPM en el laboratorio del grupo de óptica aplicada, cómo se preparan las muestras y se calibra el sistema óptico. El capítulo 4 contiene los resultados del estudio de sangre periférica humana de pacientes con LLA y donantes sanos. Posteriormente, en el capítulo 5 se plantean las conclusiones, recomendaciones y trabajo a futuro. Finalmente, se encuentran los anexos que complementan desarrollos teóricos y experimentales planteados en el documento y se listan las referencias que nutrieron la investigación.

# 1. Estado del Arte

Para mostrar la pertinencia del estudio de sangre periférica de pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA) implementando la microscopía de fase por difracción, en este capítulo se presenta el origen de las técnicas de cuantificación de fase y su implementación en el estudio de objetos biológicos. Además, se presentan los diferentes mecanismos que en la actualidad se utilizan para el diagnóstico de leucemias y las técnicas de procesamiento de imagen que se han implementado en esta tesis para diferenciar células sanas de enfermas.

## 1.1. Técnicas de Cuantificación de Fase

La *microscopía óptica* ha sido por mucho tiempo una herramienta útil y altamente difundida para la visualización y estudio de tejidos, células y otros objetos biológicos. En esta técnica, se ilumina la muestra con un campo electromagnético, con frecuencia en el visible, que al ser dispersado permite visualizar componentes estructurales del objeto ya que genera una modificación en la amplitud del campo óptico percibido por el ojo humano, asociado a cambios de brillo y color. Esto solo es posible si se hace una marcación de las células, porque al ser objetos traslucidos son de bajo contraste intrínseco. Sin embargo, el campo óptico que incide en el objeto es complejo, esto implica que también se presenta una modificación en el frente de onda, produciendo un corrimiento de fase relativo al haz que no ha interactuado con el objeto.

La gran mayoría de los especímenes estudiados en biología y medicina son objetos de fase, es decir, poseen características internas que modifican el frente de onda del campo óptico complejo que interactúa con ellos. La luz dispersada por un objeto se genera por la interacción entre dicho campo y el objeto inhomogéneo iluminado y como consecuencia se modifican la forma de su frente de onda y su amplitud. Parte del campo dispersado es transmitido, y en este frente de onda que ha sido alterado se guarda información de la estructura interna del objeto. Por lo tanto, estudiar y extraer información de la fase del campo transmitido es una fuente muy poderosa de información morfológica y topográfica de una muestra, por eso ha sido de gran interés visualizarla y cuantificarla [17].

Para visualizar las propiedades de fase de las células no marcadas y convertir los corrimientos de fase del campo óptico complejo en diferencias de amplitud, se desarrolló la *microscopía óptica de fase* (OPM, por su sigla en inglés) [18]. El primero de estos microscopios lo inventó Zernike en 1930[19, 20], con él se obtienen mapas de fase de campos difractados por objetos semitransparentes utilizando una placa de fase retardadora para generar interferencia destructiva que convierte en diferencias de amplitud los saltos de fase; generando un contraste de intensidad para hacer visible la estructura interna del objeto estudiado.

Aunque con este microscopio se obtenían mapas cualitativos de diferencia de fase, no era posible cuantificarlos porque la relación entre la irradiancia y la fase del campo no es lineal y esta acoplada.

Solo hasta que Gabor inventó la holografía en 1948[21], fue posible registrar un patrón de interferencia entre el campo óptico difractado por un objeto y un campo de referencia sin modificar, esto para obtener información de fase y así cuantificar los desfases inducidos por la muestra. Aplicando las virtudes del microscopio de Zernike y la holografía de Gabor, a través de modificaciones en el campo de referencia, es posible obtener información cuantitativa de diferencias de fase en cada punto del espacio y más aún cuantificar el campo óptico complejo difractado por los objetos, de esta forma surgen las diferentes técnicas de *cuantificación de fase*[22, 23].

Las células y otros organismos biológicos poseen complejas estructuras internas, y hasta ahora la microscopía óptica no permite observar, describir y cuantificar todas ellas. Por lo tanto, se ha visto en la cuantificación de fase un recurso para estudiar objetos biológicos, su ventaja esta en la posibilidad de reconstruir el campo óptico complejo por métodos no invasivos y sin marcación de la muestra, promoviendo la conservación de las células y accediendo a estudios de dinámica celular sin alterar el funcionamiento natural de los organismos. Por estas razones, se han desarrollado técnicas de adquisición de imágenes para reconstruir el campo dispersado y obtener no solo información de amplitud, sino de los corrimientos de fase del campo debidos a su interacción con las muestras [24]. Durante las dos últimas décadas se ha prestado mucha atención al desarrollo de métodos de cuantificación de fase para el estudio de células y tejidos, así como al de monitoreo óptico en la construcción de materiales y controles de calidad[25]. Con el desarrollo de las CCD (*charged-couple-devices*) y las CMOS (*Complementary metal-oxide semiconductor*) en 1990 como sensores de estado sólido se abrió paso a la holografía digital y fue posible obtener mapas de fase y de amplitud a partir de hologramas registrados digitalmente. Las resoluciones de megapíxeles alcanzadas por estos detectores, han permitido obtener resolución nanométrica en estructuras celulares y los tiempos de adquisición que superan los kHz facilitan reconstrucciones en tiempo real de dinámicas celulares[26].

Así, desde los años 50 las diferentes técnicas de cuantificación de fase han sido una herramienta muy útil para diferentes grupos de investigación alrededor del mundo dedicados a estudiar dinámicas celulares [27], crecimiento de células[28, 29], flujos de membranas celulares [30], estudio de glóbulos rojos[29], detección molecular[10], entre otros [31, 32].

Por lo tanto, con el principio de microscopía por contraste de fase es posible realizar medidas de propiedades ópticas de un objeto semitransparente en el plano imagen de un sistema óptico determinado; asumiendo que en este se encuentra la misma información de amplitud y fase que el presente en el campo dispersado en el plano de la muestra [3]. En las diferentes técnicas de cuantificación se mapea el corrimiento de camino óptico debido a la dispersión generada por la muestra de estudio en cada punto de la imagen. Los mapas de fase obtenidos proveen información en escala micrométrica de la estructura y la dinámica de las mismas [33].

Aunque cada una de las técnicas de cuantificación de fase tiene características que las hacen virtuosas sobre las otras; en general, todas poseen una alta sensibilidad en la reconstrucción de fase. Se alcanzan sensibilidad en el orden de los nanómetros en estructuras biológicas transparentes, equivalente a saltos de fase de  $1\text{radian}$  y es posible hacer seguimientos de dinámica en tiempo real por largos periodos de tiempo. Aún en ambientes con nivel de ruido muy alto es posible mantener la precisión nanométrica de los sistemas. Además, son técnicas no invasivas y no destructivas en las que no es necesario marcar las muestras con marcadores químicos o fluorescentes para poder observar y describir los procesos internos dentro de las células.

Gracias a todas estas virtudes de la cuantificación de fase, se busca implementar una técnica en

específico para estudiar las células mononucleares que están presentes en sangre periférica y diferenciar en ellas las células cancerígenas. Para reconocer la composición de la sangre, la morfología de las células y en especial las características de la leucemia se presenta un recuento de lo que es la enfermedad. En el capítulo 2 se explicarán las diferentes técnicas de cuantificación de fase y las razones por las que se escogió la microscopía de fase por difracción para el estudio de Leucemia Linfocítica aguda.

## 1.2. Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)

En esta sección se describe la leucemia y se establece su clasificación según la morfología y origen de las células blásticas. Posteriormente, se exponen las diferentes pruebas que hasta el momento existen para diagnosticar la enfermedad, específicamente los trabajos que se han adelantado en la implementación de análisis de imágenes para diferenciar células sanas de enfermas.

El *cáncer* es un conjunto de enfermedades caracterizado por el crecimiento desordenado y no controlado de células anormales y es el causante principal de muerte en todo el mundo, por lo que es considerado un problema social [34]. La *Leucemia* es cáncer en la sangre y resultado del crecimiento desordenado de células sanguíneas debido a mutaciones en los genes que regulan la diferenciación y proliferación de estos procesos en la médula ósea. Aunque la leucemia se puede presentar a cualquier edad, la incidencia más alta se encuentra en niños entre los 3 y los 7 años; esto se debe a que el inicio de la enfermedad se da por mutaciones genéticas durante la etapa de gestación.

La mayor tasa de mortalidad se presenta en países en vía de desarrollo, y las pruebas diagnósticas actuales se realizan en estados avanzados de la enfermedad. Para el 2017 se han reportado 5970 nuevos casos de leucemia y 1440 muertes en Estados Unidos, predominando la muerte de hombres sobre la de mujeres [1]. Para Colombia la tasa de mortalidad está en 1731 y con 5010 nuevos casos diagnosticados al año entre 2002 y 2006 según [35].

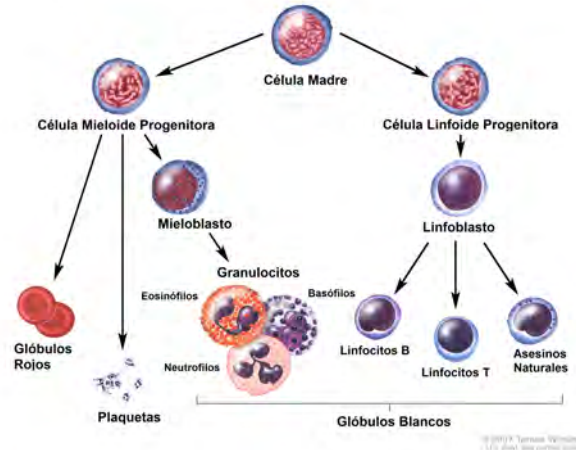
### 1.2.1. Clasificación de leucemias

Una leucemia se reconoce por la presencia de células blásticas en la médula ósea o en el torrente sanguíneo. Los blastos son células de sangre que no están completamente diferenciadas en el proceso de hematopoyesis (formación de sangre) en la médula ósea y salen a circular de forma inmadura y desordenada. Esto causa una alteración en el funcionamiento regular de la oxigenación y defensa del cuerpo humano. Existen diferentes tipos de leucemia, que se clasifican según el tipo de célula blástica y el nivel de agresividad de la enfermedad.

Según el porcentaje de células blásticas en médula y en sangre periférica, esta puede ser aguda o crónica. Si es aguda hay como mínimo un 20% de blastos en el torrente sanguíneo, y si no hay tratamiento oportuno conlleva a la muerte en solo algunas semanas. Por la morfología, anomalía genética, origen de la célula, entre otros; se han establecido otros criterios de clasificación.

La primera clasificación fue realizada en 1976 por el grupo cooperativo francés-americano-británico (FAB) [36], quienes usaron métodos morfométricos y cito químicos para estudiar extendidos de sangre periférica y de médula ósea en 200 casos de leucemias agudas. A partir de allí se definieron dos grupos principales: Leucemia Mielo blástica Aguda (LMA) y Leucemia Linfocítica Aguda (LLA).

Por su parte, dentro de las leucemias linfoblásticas se distinguen tres líneas  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$ . Esta clasificación se debe al tipo de célula sanguínea que ha sido alterada y convertida en blasto.



**Figura 1-1.:** Desarrollo de las células sanguíneas en la médula ósea. Adaptado de la página del Instituto Nacional de Cáncer de EEUU.[1]

En el esquema de la figura 1-1, se observa el proceso de formación de células de la sangre, llamado hematopoyesis. Todas las células vienen de una célula madre pluripotencial que se produce en la médula ósea y tiene la capacidad de auto-renovarse constantemente y generar diferentes líneas celulares por división celular. La diferenciación inicia cuando esta célula madre produce dos tipos de célula progenitora, la mieloide y la linfoide. Al madurar, los progenitores mieloides se extienden por el torrente sanguíneo como eritrocitos (glóbulos rojos), granulocitos (un tipo de glóbulos blancos) y plaquetas. Los progenitores linfoides generan los *linfocitos T*, los *linfocitos B* y los *asesinos naturales*[37].

Todas estas células cumplen una función específica que garantizan el buen funcionamiento del cuerpo humano, pero cuando hay leucemia alguna de ellas no se diferencia correctamente y sale de la médula ósea al torrente sanguíneo sin madurar. Como consecuencia las células se ven alteradas y ya no cumplen sus funciones normales. De esta forma, si se presenta malformación en los granulocitos, entonces se genera la leucemia mieloide, ya sea crónica o aguda; y la abundancia de linfocitos alterados en sangre periférica son la evidencia de leucemia linfocítica aguda, las líneas  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  definidas por el FAB indican qué tipo de linfoblasto se ha generado.

### 1.2.2. Pruebas diagnósticas de Leucemia Linfocítica Aguda

En esta sección se describen los protocolos utilizados para diagnosticar cualquier tipo de leucemia, con base en lo reportado por la Sociedad Americana de Cáncer (ACS, por su sigla en inglés). Todas las pruebas se hacen sobre muestras de sangre periférica y extractos de médula ósea. [38].

Cuando un paciente presenta síntomas de leucemia, la primera prueba de diagnóstico que se realiza es la del *conteo sanguíneo completo con un diferencial (RSC)*; esta consiste en tomar del paciente una muestra de sangre periférica y realizar una marcación sobre las células, así los linfocitos toman un color diferente al de los glóbulos rojos y permite hacer un conteo de la cantidad de glóbulos

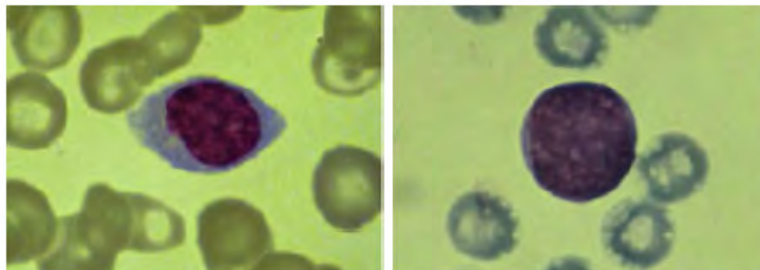
blancos, la cantidad de hemoglobina y la porción de linfoblastos (células malignas). Este recuento lo hace un especialista que reconoce las células y sus diferencias.

Otra prueba de leucemia y se realiza de forma similar, es el análisis de un *extendido de sangre periférica*, en este se toma una gota de sangre y se extiende sobre una placa de vidrio para observarla en un microscopio óptico. Si en la muestra se presentan alteraciones en la morfología de las células mononucleares y un porcentaje considerable de blastos sobre células mononucleares sanas, el experto puede considerar sospecha de enfermedad.

Estas pruebas no son exclusivas para LLA, también se usan para diagnosticar otro tipo de enfermedades y están sujetas a la experiencia del observador para diferenciar y determinar el porcentaje de población de células enfermas vs la cantidad de células sanas. Aunque es un procedimiento que no es costoso, el diagnóstico por estos métodos es posible obtenerlo solo en instancias avanzadas de la enfermedad, requiere marcación de las células y no es certero con el diagnóstico.

En una segunda instancia, se realiza una aspiración y biopsia de médula ósea y parte del hueso. Una muestra de ésta es analizada por observación en el microscopio y un especialista determina el porcentaje de células blásticas presentes en médula. Este análisis no es suficiente para diagnosticar, así que son necesarios otros análisis más específicos. En el *análisis cito químico*, se marca la muestra de médula y se observa como cada tipo de célula sanguínea reacciona de forma diferente al químico expuesto, esto permite diferenciarlas e identificar los blastos. Con esta prueba es posible determinar la línea de leucemia que tenga el paciente porque cada tipo de linfocito reacciona diferente a los marcadores.

Para diagnosticar la LLA, existe además *la citometría de flujo*, un procedimiento que clasifica las células mononucleares según las proteínas que las distinguen. Para ello las células se marcan con anticuerpos y se hacen fluir en un circuito que permite iluminar una a una cada célula con un haz monocromático. Según su línea proteica, cada célula emite en una frecuencia diferente y el sistema cuenta y clasifica toda la población analizada según el tipo de célula asociada a ciertas frecuencias. El resultado arroja el porcentaje de linfocitos y linfoblastos presentes en médula y sangre periférica y determina el tipo de leucemia que tiene el paciente [8]. Un método similar, con la misma extracción de médula, es un *análisis de inmunofenotipación* para identificar células según su base de antígenos, comparando células sanas y cancerosas del mismo sistema inmunitario [7]. Esta clase de pruebas son invasivas, costosas, requieren marcaciones y se realizan únicamente en centros especializados, generalmente en etapas ya avanzadas de la enfermedad.



**Figura 1-2.:** A la izquierda un linfocito y a la derecha un linfoblasto observados con un microscopio óptico y marcados para su visualización. Tomado de [2]

Cualquiera que sea el método implementado, la base del diagnóstico se centra en diferenciar una célula mononuclear sana de una enferma utilizando criterios morfológicos o de porcentaje de población en sangre periférica y/o médula ósea. En la figura **1-2** se muestran un linfocito sano y un linfoblasto; este es solo un ejemplo de cómo, utilizando un microscopio óptico se evidencia la diferencia morfológica entre un linfocito y un linfoblasto. Como se mencionó anteriormente, las pruebas de conteo en sangre periférica son de carácter subjetivo ya que el conteo se hace por un observador especializado y aunque son asequibles por su costo, solo generan sospecha de leucemia y nos son elementos contundentes de diagnóstico. Por ese motivo se han venido desarrollando pruebas cuantitativas que diferencien los tipos de leucemia según su morfología como lo establecieron FAB.

### ***Pruebas por procesamiento de imagen***

Dado el grado de subjetividad en el reconocimiento y diferenciación de células a través de los métodos ya descritos, los cuales dependen de la experticia del observador; se ha hecho necesaria la implementación de nuevas técnicas de diagnóstico que cuantifican la información brindada por las imágenes obtenidas con el microscopio óptico. A través de procesos automatizados y *machine learning* se estudian extendidos de sangre que han sido marcados para que automáticamente se identifiquen células blásticas y se diferencien de las células mononucleares sanas. El objetivo es brindar herramientas que faciliten el diagnóstico temprano y completo de la enfermedad.

Scotti et al. [39, 40], por ejemplo, desarrollaron un método de clasificación de linfoblastos automatizado utilizando imágenes de sangre periférica en escala de grises, como las tomadas por un microscopio óptico. A través del análisis de intensidades, diferenciaron células sanas de no sanas por área de la membrana, área del núcleo y niveles de gris; con ello concluyeron que el parámetro diferenciador es el tamaño del núcleo. Aislaron 150 linfocitos marcados de 8400 células de sangre implementando algoritmos de segmentación. Aunque es una técnica de diferenciación sigue siendo cualitativa y requiere marcación de las células.

Markiewicz et al. [41], por su parte implementa un sistema autómatas para reconocer blastos mieloides en imágenes de aspirados de médula ósea. Se clasificaron 17 tipos de células por su textura y geometría a través de un sistema de reconocimiento vectorial, denominado en inglés "*Support Vector Machine*". El algoritmo busca disminuir los parámetros de diferenciación entre vectores de entrada y optimiza la diferencia entre ellos. Este reconocimiento automático resultó comparable con la identificación manual.

Hazwani et al. [42] proponen una técnica de procesamiento de imagen para conteo automático de células blásticas en imágenes de leucemia. El método aplica el "*Hue Saturation and Value*", un proceso de segmentación de glóbulos blancos basados en la saturación y el color de las células en contraste con el fondo. Se estudiaron 50 imágenes de pacientes con LLA, tomadas con un microscopio óptico y se segmentaron por dos parámetros de diferenciación: El tamaño y la forma del núcleo de las células y la presencia de nucleolos en el núcleo; ya que las células blásticas de LLA son uniformes con escaso citoplasma y un sólo núcleo. El método resultó confiable y concuerda en un 97,8 % con el conteo manual. Aunque son técnicas comparables con las manuales y aumentan la confiabilidad en el diagnóstico carecen de cuantificación y siguen limitándose a la morfología de las células.

En 2013, Mohapatra et al. [2] realizaron un estudio más amplio de sangre periférica de pacientes con

leucemia linfocítica aguda. Analizaron 150 sub imágenes de células enfermas y 120 sub imágenes de células sanas de pacientes entre los 3 y los 45 años. Establecieron parámetros de diferenciación entre el área del núcleo, el área del citoplasma, la razón-citoplasma núcleo y el tamaño de la célula. Por significancia estadística son discriminadores suficientes entre linfocitos malignos y sanos. Los detalles del método y los valores reportados por ellos serán expuestos en el capítulo de resultados de esta tesis, servirán como parámetro comparativo de la técnica aquí implementada.

En la presente tesis, se busca establecer parámetros de diferenciación entre células mononucleares de donantes sanos y células blásticas de pacientes con LLA, implementando una técnica de cuantificación de fase. Como aporte a los presentes protocolos de diagnóstico y métodos de diferenciación se reportan valores de diferencia de fase, tamaño y mapas de índice de refracción de cada tipo de célula. Dentro de las ventajas que tienen las técnicas de cuantificación de fase sobre los análisis hechos en imágenes de microscopio óptico esta la descripción morfológica en alta resolución que brinda el sistema sin necesidad de implementar una alta magnificación, la no marcación de las muestras y el establecimiento de parámetros cuantitativos de diferenciación, sobre los cualitativos.

## 2. Cuantificación de Fase

La cuantificación de fase es una aproximación al estudio de objetos biológicos y su extendida aplicación para la caracterización de tejidos, células y diagnóstico de enfermedades ha aumentado en los últimos años. Esto se debe a que facilita su estudio ya que no necesita marcación de objetos, no es invasiva y alcanza en algunos casos resolución de fase en el orden de los nanómetros. En este capítulo se hace una descripción de los diferentes métodos de cuantificación de fase que se han desarrollado, sus ventajas y las técnicas específicas que diferentes grupos de investigación al rededor del mundo han implementado. Posteriormente se hará una descripción de la técnica de *microscopía de fase por difracción* (DPM, por su sigla en inglés) y se darán los parámetros ópticos para su implementación, ya que será la técnica utilizada en esta tesis para la caracterización de sangre periférica humana.

### 2.1. Técnicas de Cuantificación de fase

Cuando la luz interactúa con un objeto inhomogéneo uno de los fenómenos presentados es el de dispersión. Vista desde su naturaleza ondulatoria, la luz se describe como un campo electromagnético donde la dispersión representa una modificación en su frente de onda y en su amplitud; llevando en ella información de la estructura interna del objeto que la ha alterado. Para obtener la amplitud de este campo óptico complejo dispersado, en la microscopía óptica convencional se registra su intensidad; pero para medir las diferencias de fase generadas por el objeto que se desea estudiar, se han desarrollado técnicas de cuantificación basadas en los principios de interferencia y difracción. En cualquiera de las técnicas, para generar interferencia se registra la superposición del campo electromagnético dispersado por el objeto y un campo de referencia no dispersado. Al modificar el patrón del campo electromagnético de referencia es posible cuantificar las diferencias de fase en cada punto del espacio. Por lo tanto, todas las técnicas desarrolladas utilizan el campo óptico complejo completo y modifican la referencia según sea el caso, para obtener mapas de amplitud y mapas de diferencia de fase asociadas a la estructura interna del objeto [26, 43].

El campo dispersado por el objeto que se propaga en una sola dirección  $U_O$  y el de referencia  $U_R$ , se expresan en su forma compleja de la siguiente manera:

$$U_O(x, y) = |U_O(x, y)|e^{-i\phi_{obj}(x, y)}, \quad (2-1)$$

$$U_R(x, y) = |U_R(x, y)|e^{-i\phi_{ref}(x, y)}, \quad (2-2)$$

donde  $|U_O(x, y)|$  y  $|U_R(x, y)|$  representan la amplitud de cada campo,  $\phi_{obj}(x, y)$  la fase de la onda dispersada y  $\phi_{ref}(x, y)$  la fase de la onda de referencia.

Para obtener información de amplitud y de diferencia de fase, y así extraer información del objeto que se esté estudiando, de la interferencia entre la onda objeto y la de referencia se registra el

patrón de intensidad. Los detalles para llegar a una expresión como la de 2-3 se encuentran en 2,2,2.

En consecuencia, en su forma más general, la modulación temporal y espacial del campo complejo registrado por un sensor es:

$$I(x, y; \tau) = I_O(x, y) + I_R(x, y) + 2 |\Gamma_{12}(x, y; \tau)| \cos [\beta x + \omega \tau - \phi_O(x, y)]. \quad (2-3)$$

Aquí  $I_O$  e  $I_R$  son las intensidades debidas al haz objeto y el haz de referencia, respectivamente.  $\Gamma_{12}(x, y; \tau)$  es la correlación entre los dos haces.  $\beta$  es el corrimiento de la frecuencia espacial y  $\omega$  es la frecuencia temporal.  $\tau$  es la diferencia temporal y  $\phi_O(x, y)$  representa el aporte de fase debido al objeto, la cantidad que se desea cuantificar. Existen técnicas interferométricas que se implementan para desacoplar la fase del campo difractado, dando lugar a los métodos de cuantificación de fase que serán resumidos brevemente a continuación.

### 2.1.1. Interferometría fuera de eje

En *interferometría fuera de eje* (off-axis interferometry) la diferencia temporal entre los campos es minimizada, por lo tanto,  $\tau \simeq 0$ . Además, el ángulo que forman los haces al incidir en el plano sensor es diferente de cero, lo que genera un corrimiento espacial de fase  $\beta$  que determina el periodo de las franjas que se forman en el patrón de interferencia. Entonces,

$$I(x, y; 0) = I_O(x, y) + I_{ref}(x, y) + 2 |\Gamma_{12}(x, y; 0)| \cos [\beta x + \phi_{ref} - \phi_O(x, y)] \quad (2-4)$$

En esta línea de interferómetros se encuentran el de Goodman y Lawrence quienes en 1967 fueron pioneros en la holografía digital reconstruyendo numéricamente un interferograma obtenido digitalmente [44]. En 1982, Takeda propone un método por transformadas de Fourier para reconstruir la topografía de una muestra [45]. Más adelante, con el desarrollo de las CCDs se mejoró la calidad de las imágenes y nuevas técnicas se desarrollaron como: *La microscopía holográfica digital (DHM)* [46], que requiere deconvolución por propagación de Fresnel para obtener el campo complejo en el plano imagen, y *La Microscopía de Fase de Hilbert (HPM)* [9]; en 2005 propone ubicar el sensor en el plano imagen para evitar esta propagación y disminuir el ruido en la reconstrucción de fase de muestras biológicas, midiendo la intensidad para reconstruir la fase en una sola toma (single-shot). Para obtener mapas de diferencia de fase en estas técnicas, se realiza una reconstrucción numérica del campo óptico complejo aplicando la teoría de la difracción al interferograma registrado, generalmente son interferómetros de Michelson o Mach-Zehnder e implementan transformación de Hilbert [47] para reconstruir cuantitativamente la información de fase.

### 2.1.2. Métodos por corrimiento de fase

En esta técnica  $\beta \cong 0$ , es decir que no hay ángulo entre los haces y la fase del haz de referencia debe modularse varias veces para obtener imágenes cuantitativas de fase. Para generar corrimientos de fase de  $0, \pi/2, 3\pi/2, \pi$  en  $\phi_{ref} = \tau\omega$ , se generan retardos de  $\tau$  o cambios en la frecuencia  $\omega$ . El patrón de interferencia queda definido como:

$$I(x, y; \tau) = I_O(x, y) + I_{ref}(x, y) + 2 |\Gamma_{12}(x, y; \tau)| \cos [\phi_{ref}(\tau) - \phi_O(x, y)], \quad (2-5)$$

donde,

$$\phi_O(x, y) = \arg [I(x, y; 0) - I(x, y; \pi), I(x, y; 3\pi/2) - I(x, y; \pi/2)]. \quad (2-6)$$

Un ejemplo de este tipo de interferómetros es el *Interferómetro de Difracción Puntual* (PDI), que bajo una configuración en línea es posible reconstruir el campo óptico complejo de objetos semitransparentes y cuantificar sus diferencias de fase, esta técnica se implementó recientemente en el Grupo de Óptica Aplicada de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá [48]

### 2.1.3. Métodos de camino común

La interferometría de camino común genera una alta estabilidad temporal, lo que permite medir diferencias de fase con bajos niveles de ruido. Esto se debe a que los campos del objeto y la referencia tienen caminos muy próximos dentro del sistema óptico; es decir, pasan por las mismas componentes ópticas, generando interferogramas altamente estables.

La *Microscopia de Fase de Fourier* (FPM, por su sigla en inglés) es una técnica de camino común desarrollada en el 2004 caracterizada por una alta estabilidad temporal y ha sido usada para medir fluctuaciones de membrana y crecimiento celular a escala nanométrica [49]. La FPM usa una fuente cuasi-monocromática y un modulador espacial de luz para aplicar corrimientos controlados de fase al haz de referencia. Una lente de Fourier es la responsable de dividir los haces de referencia y de objeto para posteriormente hacerlos coincidir en el plano del sensor. La diferencia de fase se obtiene al combinar cuatro interferogramas como en la ecuación (2-5) [26].

El *Microscopio de Difracción de Fase* (DPM) que será utilizado para el estudio de blastos en extendidos de sangre con Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) es considerado como un método de cuantificación de fase por camino común, por los grupos de investigación que lo han implementado [50, 51]. Esta combina los principios de interferencia y difracción en un módulo compacto y altamente estable que puede llegar a resolver objetos en escala nanométrica. Esta técnica se ha aplicado para obtener información del campo óptico complejo en 2D de tejidos biológicos y su configuración la hace apropiada para el estudio de células [52, 53]. También se ha hecho monitoreo temporal de dinámica celular [54] y reconstrucción tomográfica [55, 56]. Los detalles de esta técnica se describirán en 2.2.

### 2.1.4. Métodos de luz blanca

Las técnicas de corrimiento de fase presentan speckle, ya que son sistemas iluminados con luz coherente, esto hace que las imágenes no tengan una alta calidad. Por lo tanto, en el 2012, Bhaduri desarrolló un microscopio de difracción de fase con luz blanca [15]. El W-DPM mejora la estabilidad temporal y espacial de forma significativa, para estudiar morfología y dinámica de células. Se usa un modulador espacial de fase para asegurar la coherencia espacial del haz de referencia en el plano del sensor, es decir, donde se genera el patrón de interferencia. Una versión del FPM también fue desarrollada con luz blanca [57]. Este método tiene el mismo esquema que el de un interferómetro fuera de eje con la particularidad de implementar luz parcialmente coherente. Aun cuando tiene gran aplicabilidad en el estudio de tejidos y ha sido implementado para el diagnóstico de enfermedades [50] sus detalles teóricos no son relevantes para los objetivos de esta tesis.

## 2.2. Microscopía de fase por difracción

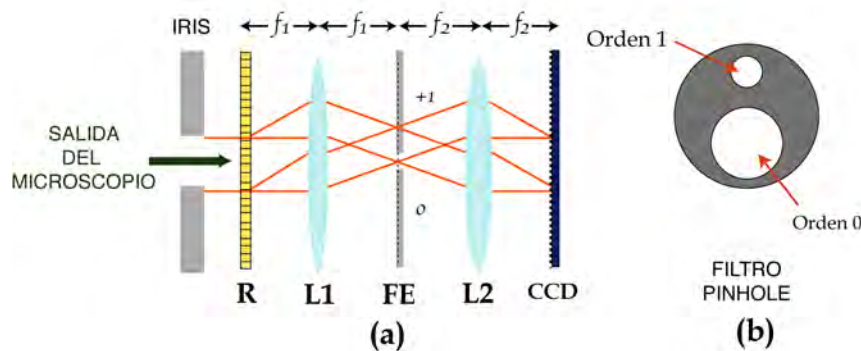
La *Microscopía de fase por difracción* (DPM-por su sigla en inglés) es una técnica de cuantificación fuera de eje, desarrollada en el 2006 por Gabriel Popescu [27]. Se fundamenta en el mismo principio del interferómetro de Mach-Zehnder y por considerarse de camino común disminuye el ruido causado por vibraciones mecánicas y fluctuaciones del aire. Además, el registro del interferograma se realiza en una sola toma (single-shot) simplificando el tiempo de adquisición, el cual está limitado por la velocidad de la cámara [58].

Por estas razones, el DPM combina todos los atributos de las diferentes técnicas actuales de cuantificación, haciéndolo útil para monitorear en escala nanométrica la dinámica de muestras biológicas en diferentes ambientes; las muestras no necesitan preparación previa ni marcaciones para ser observadas y el procedimiento es no invasivo [59].

A continuación, se presentan los principios físicos del DPM basados en el trabajo de Bhaduri y Popescu[3], las consideraciones que deben hacerse sobre su diseño óptico y el procedimiento para reconstruir el campo óptico complejo y de allí obtener características morfológicas e información interna de muestras biológicas, en este caso de células mononucleares de sangre periférica.

### 2.2.1. Esquema de Funcionamiento de un DPM

El microscopio de fase por difracción utiliza la imagen de un objeto formada por un microscopio óptico comercial, al iluminarlo con un haz coherente. Desde el plano imagen del microscopio, se adapta el módulo del interferómetro, el cual está compuesto principalmente por una rejilla de difracción (R), un sistema de lentes  $4f$  y un filtro espacial (FE). La distribución de los mismos se observa en la figura 2-1.



**Figura 2-1.:** (a) Esquema del sistema óptico de un Microscopio de Fase por Difracción (DPM). Compuesto por una rejilla de difracción a la salida de un microscopio óptico y un sistema  $4f$ . (b) Pinhole utilizado para realizar un filtrado de Fourier de primer orden de difracción. Imagen adaptada de[3].

Para generar el interferograma y la posterior reconstrucción del campo óptico complejo dispersado por un objeto, se utiliza el campo electromagnético que forma la imagen del objeto magnificada en el plano imagen del microscopio. En este plano se ubica el módulo del DPM que inicia con una

rejilla de difracción ( $R$ ), la cual recibe la información y la difracta en diferentes ángulos y con diferente intensidad, pero guardando en el frente de onda la misma información del objeto.

El objetivo es tomar dos de esos órdenes para hacerlos interferir, para ello se deben eliminar los otros que no van a ser útiles, filtrándolos en el espacio de frecuencias. Esto se hace tomando una lente que se ubica a una distancia focal ( $f_1$ ) del plano de la rejilla. Así, se tiene el espectro de Fourier de todo el patrón difractado en el plano  $FE$ , donde es ubicado un filtro espacial. Este filtro tiene dos propósitos: El primero es anular todos los órdenes excepto el +1 y el 0; y el segundo, hacer pasar el orden +1 por un filtro pasa bajos, eliminando las frecuencias altas y dejando únicamente el DC. Así se pierde toda la información de los detalles del objeto y se genera un haz limpio.

Por lo tanto, al ubicar la segunda lente a su distancia focal ( $f_2$ ) se forma un sistema  $4f$  y en el plano de la CCD se genera un patrón de interferencia entre un campo óptico complejo sin desviar, que proviene del orden 0 y trae toda la información de la muestra; y una onda plana generada por el orden +1, que ha sido desviada un ángulo  $\beta$ . Este ángulo de incidencia depende del periodo de la rejilla. Posteriormente se reconstruye digitalmente el patrón de interferencia para obtener la información de fase de los objetos a estudiar.

Para obtener un patrón de interferencia adecuado; es decir, que pueda ser censado por la cámara para su reconstrucción, existe una relación entre el periodo de la rejilla ( $\Lambda$ ) y el sistema de lentes  $4f$  que generan una segunda magnificación en el campo óptico. Estos vienen determinados por la apertura numérica del microscopio, la distancia focal de las lentes y el tamaño de pixel de la CCD. Para definir la relación entre estos parámetros es necesario hacer una descripción del diseño óptico del interferómetro y un análisis de la óptica de Fourier del sistema. Al final de este capítulo, se presentará una síntesis de la relación entre los parámetros para los componentes ópticos que determina la resolución apropiada para el estudio de células mononucleares.

### 2.2.2. Principio Físico

El campo óptico que incide en la rejilla es el que ha sido dispersado por el objeto en estudio; por lo tanto, trae información de la muestra y del haz incidente. Así, al plano de la rejilla llega un campo complejo  $U(x, y)$  que al difractarse generara múltiples copias de la imagen a diferentes ángulos. La ecuación (2-7) define el campo difractado  $U_{GP}(x, y)$ , considerando únicamente el orden 0 ( $U_0(x, y)$ ) y el orden +1 ( $U_{+1}(x, y)$ ) de difracción. Los otros órdenes no se tomarán en cuenta porque serán filtrados por el sistema y no aportan a la interferencia. Aquí  $\beta \equiv \pi/\Lambda$  y es el ángulo entre el orden 0 y el orden +1 de difracción.  $\Lambda$  es el periodo de la rejilla y define en parte la resolución del sistema. Por lo tanto,

$$U_{GP}(x, y) = U_0(x, y) + U_{+1}(x, y)e^{i\beta x}. \quad (2-7)$$

El propósito de la segunda lente (con una distancia focal  $f_1$ ) es generar una trasformada de Fourier en el plano focal del campo representado en la ecuación (2-7). En este lugar se ubica un filtro que se caracteriza por ser una superficie opaca que bloquea todos los órdenes de difracción excepto el 0 y el +1. Las frecuencias altas del orden +1 se eliminan implementando un filtro pasa bajo, de tal forma que solo quede información del haz (DC) y no del objeto. Por su parte el orden 0 pasa sin ninguna modificación por un agujero ubicado a una distancia  $\Delta x$  de la micro lente; este lleva la información del campo óptico complejo del objeto a estudiar.

De esta forma, en la ecuación (2-8) se encuentra la transformada de Fourier del campo complejo ( $\tilde{U}_{F-}$ ), justo antes de pasar por el filtro:

$$\tilde{U}_{F-}(k_x, k_y) = \tilde{U}_0(k_x, k_y) + \tilde{U}_1(k_x - \beta, k_y). \quad (2-8)$$

Como al realizar la transformada al espacio de frecuencias existe un re-escalamiento, en la ecuación (2-8)  $k_x$  y  $k_y$  son las nuevas coordenadas que dependen de la longitud de onda ( $\lambda$ ) con la que se ilumina el sistema y de la distancia focal de esta primera lente ( $f_1$ ). En la ecuación (2-9) se define esta relación.  $\beta$  representa el desplazamiento del orden +1 debido al desfase por difracción; es decir, es la distancia que hay entre los dos órdenes en el espacio de las frecuencias.

$$k_x = 2\pi x_1/(\lambda f_1) \equiv \alpha x_1, k_y = 2\pi y_1/(\lambda f_1) \equiv \alpha y_1. \quad (2-9)$$

Filtrar el campo significa multiplicar (\*) la función  $\tilde{U}_{F-}$  por una función  $\delta(\alpha x_1 - \beta, \alpha y_1)$  centrada en el primer orden de difracción, la cual elimina todas las frecuencias altas y deja la DC; tal que al plano de registro llegue con amplitud y fase constante. La representación queda entonces:

$$\tilde{U}_{F+}(\alpha x_1, \alpha y_1) = \tilde{U}_0(\alpha x_1, \alpha y_1) + \tilde{U}_1(\alpha x_1 - \beta, \alpha y_1) * \delta(\alpha x_1 - \beta, \alpha y_1).$$

Aplicando las propiedades de la función  $\delta$ ,  $\tilde{U}_{F+}$  resulta ser la superposición de una señal no filtrada con información de la imagen  $\tilde{U}_0$  en el orden cero de difracción y un término que representa el DC ( $\tilde{U}_1$ ) desplazado una distancia  $\beta$  en el espacio de las frecuencias:

$$\tilde{U}_{F+}(\alpha x_1, \alpha y_1) = \tilde{U}_0(\alpha x_1, \alpha y_1) + \tilde{U}_1(0, 0)\delta(\alpha x_1 - \beta, \alpha y_1). \quad (2-10)$$

Posteriormente, la segunda lente del sistema  $4f$  realiza una segunda transformada de Fourier del campo filtrado (2-10) y su imagen se encuentra en el plano focal donde se ubica el sensor óptico. La ecuación (2-11) es entonces la expresión para el campo óptico de la imagen final en coordenadas cartesianas y en términos de la magnificación del sistema  $4f$ .

$$\begin{aligned} F.T.\{\tilde{U}_{F+}(\alpha x_1, \alpha y_1)\} &= F.T.\{\tilde{U}_0(\alpha x_1, \alpha y_1) + \tilde{U}_1(0, 0)\delta(\alpha x_1 - \beta, \alpha y_1)\} \\ &= \frac{1}{\alpha}(U_0(\xi/\alpha, \eta/\alpha)) + \tilde{U}_1(0, 0)e^{-i\xi\beta/\alpha}, \end{aligned} \quad (2-11)$$

donde las coordenadas de la nueva transformada son:

$$\xi \equiv 2\pi x/\lambda f_2, \eta \equiv 2\pi y/\lambda f_2.$$

Tomando en cuenta la magnificación del sistema, se realiza un cambio de variable y el campo óptico complejo en el plano sensor resulta ser:

$$U_{CP}(x, y) = \frac{1}{\alpha} \left[ U_0(-x/M_{4f}, -y/M_{4f}) + U_1(0, 0)e^{i\beta x/M_{4f}} \right] \quad (2-12)$$

donde,

$$M_{4f} \equiv -f_2/f_1 \quad (2-13)$$

Escribiendo en forma de fasores el campo en el plano de la CCD se tiene que:

$$U_0(x, y) \equiv A_0(x, y)e^{i\varphi_0(x, y)} \quad U_1(x, y) \equiv A_1(x, y)e^{i\varphi_1(x, y)} \quad (2-14)$$

Lo que permite re escribir la ecuación (2-12) de la siguiente forma:

$$U_{CP}(x, y) = \frac{1}{|\alpha|} (A_0(-x/M_{4f}, -y/M_{4f})e^{i\phi_0(-x/M_{4f}, -y/M_{4f})} + A_1(0, 0)e^{i\beta x/M_{4f}} e^{i\phi_1(0, 0)}) \quad (2-15)$$

Si se hace un nuevo cambio de variable para simplificar la expresión, tal que:

$$-x/M_{4f} \rightarrow x', -y/M_{4f} \rightarrow y', A_0/|\alpha| \rightarrow A'_0, A_1/|\alpha| \rightarrow A'_1 \quad (2-16)$$

Entonces, el campo registrado por la cámara se genera por la interferencia de dos haces; uno que viene filtrado como DC y otro que trae información del objeto. Ambos están magnificados por el sistema 4f e invertidos debido a la doble transformada de Fourier. La ecuación (2-18) muestra el campo que incide en la CCD.

$$U_{CP}(x, y) = A'_0(x', y')e^{i\phi_0(x', y')} + A'_1e^{i\beta x'} e^{i\phi_1}. \quad (2-17)$$

Como los sensores registran intensidades, la ecuación (2-17) define el patrón de irradiancia que tiene la misma forma que el de la ecuación (2-4). Aplicamos la definición de irradiancia como el módulo cuadrado del campo óptico complejo, en este caso por la linealidad se aplica a las amplitudes complejas del campo:

$$I_{CP}(x', y') = U'_{CP}(x, y)U'^*_{CP}(x, y).$$

Aplicando las propiedades para exponenciales complejas, se tiene:

$$I_{CP}(x', y') = |A'_0(x', y')|^2 + |A'_1(x', y')|^2 + 2|A'_1||A'_0(x', y')| \cos(\beta x' + \Delta\phi). \quad (2-18)$$

Los dos primeros términos de la ecuación (2-18), representan la irradiancia de cada uno de los órdenes de difracción, en el argumento del coseno se encuentra la información de diferencia de fase entre el haz referencia y el haz objeto. Aplicando la teoría escalar de la difracción es posible aplicar métodos digitales para reconstruir el campo óptico complejo y obtener información del mapa de diferencia de fase de cada objeto de estudio y también obtener un mapa de amplitud[47, 60, 6]. Los detalles de esta reconstrucción se explican al final del capítulo 2, donde a partir de 2-18 se hace una reconstrucción digital del campo óptico complejo.

### 2.2.3. Parámetros de Diseño

Como componentes fundamentales del interferómetro se encuentran (a) la rejilla de difracción que determina el ángulo  $\beta$  con el cual los órdenes de difracción se separan, (b) el sistema 4f además que además de magnificar el campo óptico complejo que sale del microscopio, permite manipular los órdenes de difracción para generar interferencia; y (c) la magnificación dada por el microscopio

invertido. Los parámetros establecidos para estas magnitudes definen la resolución del sistema óptico.

A continuación, se establecen las relaciones entre cada uno de estos parámetros para definir las condiciones mínimas para la formación de una imagen apropiada y el sistema pueda resolver células cuyo tamaño se encuentre en el orden de los micrómetros.

### Resolución del microscopio

La primera limitante en la resolución está dada por el microscopio y su sistema de iluminación. Un microscopio está compuesto principalmente por: (a) una fuente de iluminación, que puede ser puntual o no, y coherente o incoherente (b) Una lente condensadora que se encarga de generar la imagen de la fuente en el plano objeto, donde se ubica la muestra para iluminarla y (c) un objetivo de microscopio con una magnificación ( $M$ ) y una apertura numérica ( $NA_{obj}$ ) determinada.

Si la fuente no es puntual o es incoherente, el campo óptico proveniente de la fuente de iluminación es difractado por superposición de ondas en el plano objeto; este fenómeno limita la resolución y puede cuantificarse con el valor de la apertura numérica de la lente condensadora ( $NA_{con}$ ) [61]. Por su parte, la magnificación dada por el objetivo microscopio ( $M_{obj}$ ) también da un límite de resolución definido por la apertura numérica del mismo ( $NA_{obj}$ ). Por lo tanto, la resolución de Abbe para un microscopio con una alta apertura numérica y una fuente incoherente es [62]:

$$d_{abbe} = \frac{\lambda}{(NA_{obj} + NA_{con})}, \quad (2-19)$$

en esta ecuación se desprecia el término de la apertura numérica de la lente condensadora si se asume una iluminación altamente coherente. Por lo tanto, la expresión para la resolución queda:

$$d_{abbe} = \frac{\lambda}{NA_{obj}} \quad (2-20)$$

Por definición, la apertura numérica es:  $NA_{obj} = n \sin(\theta)$  donde  $n$  es el índice de refracción de la lente y  $\theta$  es el ángulo de iluminación. En el caso particular de una apertura circular, el patrón de difracción se describe por un anillo de Airy cuyo radio está definido por  $\Delta\rho = 0,61\lambda/NA$ , que representa la distancia desde el máximo de intensidad a su primer mínimo en la función de Bessel que lo describe.

Aplicando el criterio de Rayleigh [63], el cual afirma que dos imágenes (puntos de una fuente) se pueden *resolver* cuando el máximo central de una fuente coincide con el primer mínimo de la otra, el radio de difracción para determinar la resolución del microscopio es:

$$\Delta\rho = \frac{1,22\lambda}{NA_{obj}}, \quad (2-21)$$

definido como el doble del límite de resolución dado por Abbe. Por lo tanto, la resolución es mayor cuanto mayor sea la apertura numérica del objetivo de microscopio a cierta longitud de onda. Como consecuencia, a mayor magnificación el campo de visión se reduce.

### Rejilla de difracción

En el plano imagen del microscopio, donde el campo ya ha sido magnificado y contiene la información de la muestra a estudiar, se ubica una rejilla de difracción caracterizada por su periodo  $\Lambda$ . Existen diferentes tipos de rejilla y aunque en la literatura se menciona una *blazed grating*, la cual difracta con mayor intensidad el orden  $+1$  y  $-1$  que el orden cero[3]; se desarrolla el análisis con una rejilla de difracción sin ángulo de inclinación ya que esta será la implementada en el sistema óptico de la presente tesis.

Una rejilla genera una variación de amplitud y/o de fase periódica a una onda incidente. Aquí se considera una rejilla de fase con el propósito de replicar el campo óptico transmitido por el objeto en los diferentes ángulos de difracción de la rejilla, manteniendo su amplitud. Cada par de líneas de la rejilla es un elemento difractor que se comporta como una fuente secundaria de la onda que la está atravesando; debido a la repetición periódica de estas líneas se presenta interferencia de múltiples haces difractados. El sensor registra un patrón de interferencia modulado por la difracción de cada fuente, la relación matemática que describe la intensidad para una rejilla de  $N$  aperturas es

$$\frac{1}{N^2} I(p) = \left[ \frac{\text{sen}(Nkdp/2)}{N \text{sen}(kdp/2)} \right]^2 \left[ \frac{\text{sen}(ksp/2)}{ksp/2} \right]^2. \quad (2-22)$$

El primer término determina la interferencia del patrón registrado y el segundo la modulación dada por la difracción. Así, el primer máximo de interferencia se encuentra cuando el argumento de la función sinusoidal es cero o múltiplo entero de  $\pi$ , entonces

$$\frac{Nkdp}{2} = n\pi, \quad (2-23)$$

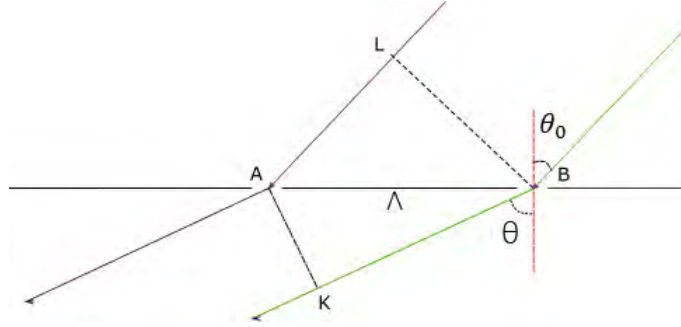
siendo  $p$  la distancia entre dos máximos de intensidad, tal que

$$p = \frac{n\lambda}{Nd}. \quad (2-24)$$

Si la relación entre  $n/N$  es entera, se define  $m$  entero como un orden de difracción. Se encuentra,

$$p = \frac{m\lambda}{d}. \quad (2-25)$$

Por otra parte,  $p$  también determina la distancia entre máximos de interferencia obtenida por la diferencia de camino óptico entre dos haces que atraviesan la rejilla. Para calcular esta distancia, en la figura **2-2** se observan dos puntos A y B como fuentes puntuales, tal que la luz incide con un ángulo  $\theta_0$  y se difracta con un ángulo  $\theta$ . La diferencia de camino óptico entre los haces incidentes es  $LA = \Lambda \text{sen}(\theta_0)$ , mientras que la diferencia entre camino óptico entre los haces difractados queda  $BK = \Lambda \text{sen}(\theta)$ , donde  $\Lambda$  es el periodo de la rejilla.



**Figura 2-2.:** Difracción de la luz por una rejilla de fase

Como consecuencia, la diferencia de camino óptico entre dos haces de luz que salen de la rejilla que llegan a un mismo punto lejano es:

$$BK - LA = \Lambda(\sin(\theta) - \sin(\theta_0)) = \Lambda p. \quad (2-26)$$

Relacionando lo obtenido en (2-25) con (2-26):

$$p = m \frac{\lambda}{\Lambda}, \quad (2-27)$$

Ahora, esta diferencia de camino óptico está incluida en el término de interferencia de los dos haces que en (2-18) es  $\beta$  y que representa la diferencia de fase entre dos órdenes de interferencia. Entonces,

$$\beta = kp = \frac{2\pi}{\Lambda}, \quad (2-28)$$

el cual representa el ángulo de desviación del orden +1, un parámetro de resolución del sistema porque determina el periodo de las franjas en el interferograma registrado en la CCD. Para observar su influencia, se toma la transformada de Fourier del interferograma registrado en (2-18).

$$\tilde{I}_{CP}(k_x, k_y) = FT[I_{CP}(x', y')].$$

Entonces,

$$\tilde{I}_{CP}(k_x, k_y) = FT[U_0(x', y')U_0^*(x', y') + U_1U_1^* + U_0(x', y')U_1^*e^{-i\beta x'} + U_0^*(x', y')U_1e^{i\beta x'}]. \quad (2-29)$$

En (2-29) la multiplicación del campo por su conjugado se expresa en cuatro términos.  $U_0(x', y')$  representa al orden cero como haz objeto y  $U_1e^{i\beta x'}$  como el haz de referencia desfasado por una distancia  $\beta$ . Por linealidad, la transformada de Fourier de toda la expresión es la suma de la transformada de cada uno de los términos: Para el primero, por teorema de la convolución, la transformada de Fourier de una multiplicación es la convolución de las transformadas, entonces:

$$FT[U_0(x', y')U_0^*(x', y')] = \tilde{U}_0(k_x, k_y) * \tilde{U}_0^*(-k_x, -k_y). \quad (2-30)$$

Por su parte, la transformada de una exponencial representa un corrimiento proporcional a su fase en el espacio de las frecuencias de dicho campo, es decir,  $e^{-i\beta x'} \rightarrow \delta(k_x - \beta, k_y)$ . Por lo tanto, la transformada del tercer y cuarto término de (2-29) es respectivamente:

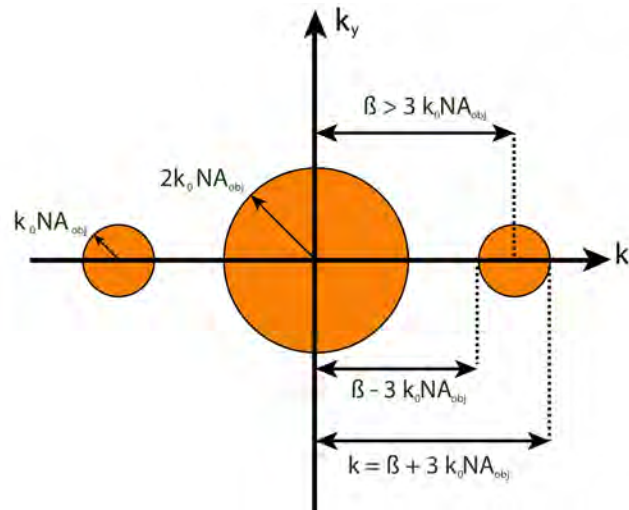
$$FT[U_0(x', y')U_1^*e^{-i\beta x'}] = \tilde{U}_0(k_x, k_y) * \tilde{U}_1^*(\delta(k_x - \beta, k_y)) \quad (2-31)$$

$$FT[U_0^*(x', y')U_1e^{i\beta x'}] = \tilde{U}_0^*(-k_x, -k_y) * \tilde{U}_1(\delta(k_x + \beta, k_y)) \quad (2-32)$$

Asumiendo que el campo es uniforme cuando pasa el filtro, el segundo término resulta:

$$FT[U_1 * U_1^*] = |U_1|^2\delta(k_x, k_y) \quad (2-33)$$

En síntesis, la amplitud del campo óptico complejo que es difractado viene limitada por (2-20), que es la resolución del microscopio. Al tomar la transformada de Fourier, la magnitud del campo en el espacio de frecuencias es su inverso, es decir,  $k_0NA_{obj}$ . Como consecuencia, al realizar la convolución del campo óptico complejo con su conjugado, el espectro de frecuencias genera un pico central de  $2k_0NA_{obj}$  y dos picos equidistantes al central desfasados  $+\beta$  y  $-\beta$  del centro del espectro. En este sentido la representación de este espectro queda como el de la figura 2-3.



**Figura 2-3.:** Espectro de Fourier del campo óptico complejo censado por la CCD para un patrón de interferencia tomado por un DPM [3].

Aquí está implícita una relación entre el periodo de la rejilla y la apertura numérica del objetivo microscopio. Para que los órdenes no se superpongan la distancia entre los centros debe ser tal que:

$$\beta \geq 3k_0NA_{obj}. \quad (2-34)$$

En consecuencia, relacionando 2-34 con 2-21, se tiene que:

$$\Lambda \leq \frac{\Delta\rho M_{obj}}{3,66}. \quad (2-35)$$

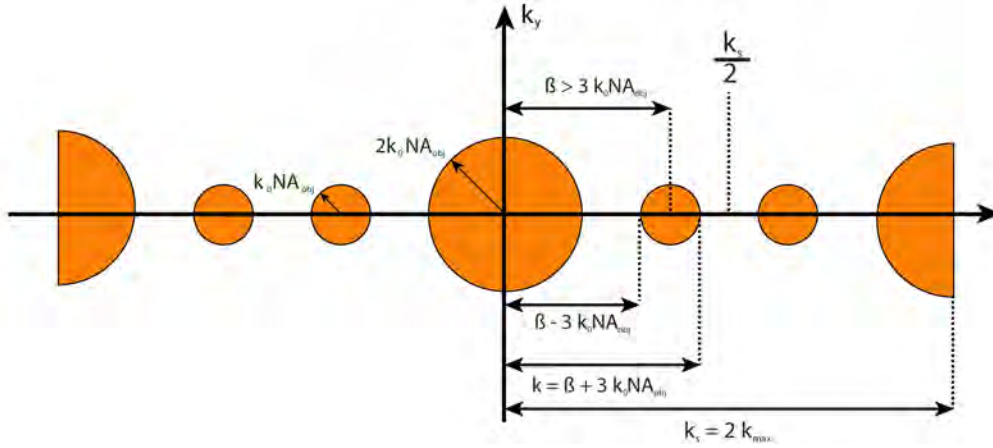
### Muestreo

Además del límite de resolución dado por la rejilla, debe considerarse la discretización de la señal cuando el patrón de irradiancia es registrado en la CCD. Como la transformada de Fourier es una

señal periódica, existe una relación entre el periodo de la función (en el espacio de las coordenadas,  $X$ ) y un ancho de banda que filtrará la señal, dado por el teorema de Nyquist [64],

$$X = \frac{1}{2|U_{max}|} \quad (2-36)$$

en este se define un límite mínimo de muestreo de la señal de banda limitada, tal que no se pierda información de frecuencias y un límite máximo para no sobre muestrear la señal. Como se observa en la figura 2-4, este límite está definido como dos veces la frecuencia de la señal en el espacio de Fourier ( $U_{max}$ ). En este caso  $U_{max} = 2(\beta + k_0 NA_{obj})$  es la frecuencia de corte tal que se incluyen el orden central y los dos órdenes laterales.



**Figura 2-4.:** Esquema de la distribución espacial de los órdenes de difracción en el espacio de Fourier donde se describe el ancho del periodo para muestrear la señal sin que haya superposición de frecuencias.

En este sentido el muestreo hecho por la cámara debe ser mayor a este límite, por lo tanto:

$$U_s = \frac{2\pi}{a} M_{obj} |M_{4f}| \geq 2(\beta + k_0 NA_{obj}) \quad (2-37)$$

esta frecuencia de corte para el muestreo de la señal de entrada a la CCD, tiene en cuenta el tamaño del pixel ( $a$ ) que debe muestrear la imagen de la rejilla magnificada por el sistema  $4f$  ( $|M_{4f}|$ ) y la magnificación del campo óptico difractado por la muestra, dada por el objetivo microscopio ( $M_{obj}$ ). Como consecuencia, para un periodo de rejilla determinado existe un mínimo de magnificación:

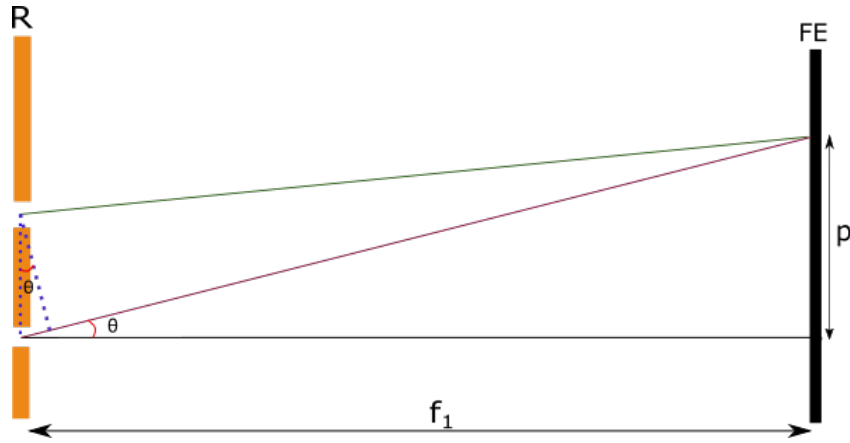
$$|M_{4f}| \geq 2 \left[ a \frac{1}{\Lambda} + \frac{1}{\lambda} \frac{NA_{obj}}{M_{obj}} \right] \quad (2-38)$$

### Filtro espacial

Otro elemento fundamental en la construcción del microscopio de fase por difracción es el filtro espacial. Como se ha dicho, la primera lente del DPM forma la imagen de los órdenes de difracción de la rejilla en su plano focal ( $f_1$ ), que corresponde al plano de Fourier. En este plano se ubica

el filtro que anula las frecuencias de todos los órdenes de difracción exceptuando el 0 y el +1, los cuales se van a hacer interferir.

Por lo determinado anteriormente, la distancia entre máximos de difracción en el plano sensor es  $p$ , la cual se definió en (2-27) y se relaciona con la diferencia de camino óptico entre haces objeto y referencia. En la figura 2-5 se observa desde otro punto como dos haces que inciden en la rejilla, salen difractados, pero por el principio de Huygens-Fresnel interfieren. En este caso, la distancia entre máximos también se relaciona con la distancia a la pantalla, que se ubica en el plano de Fourier a una distancia  $f_1$ .



**Figura 2-5.:** Relación entre la distancia entre máximos de intensidad y la diferencia de camino óptico, para un patrón de difracción registrado en una pantalla que se encuentra a una distancia  $f_1$  de una rejilla de difracción.

Geoméricamente,

$$\tan(\theta) = \frac{p}{f_1} \quad (2-39)$$

Por aproximación paraxial,  $\tan(\theta) \cong \sin(\theta)$ , que define la diferencia de camino óptico. Como consecuencia,

$$\frac{p}{f_1} = m \frac{\lambda}{\Lambda}, \quad (2-40)$$

de tal forma que la distancia entre órdenes es:

$$p = \frac{m f_1 \lambda}{\Lambda} \quad (2-41)$$

Esto significa que la distancia física entre órdenes es proporcional a la distancia focal de la primera lente e inversamente proporcional al periodo de la rejilla, para una longitud de onda constante. Este es el último parámetro necesario para definir los elementos del sistema óptico que forman el DPM y que definen la resolución del sistema óptico.

Al determinar el espaciamiento físico entre órdenes, se procede a filtrar el orden +1 de difracción, ya que la interferencia debe generarse entre un haz que contenga la información del objeto y un haz de referencia que esté limpio. Para limpiar la información del objeto, se ubica una micro lente

en la posición del orden +1 que funciona como un filtro pasa bajos y su objetivo es eliminar las frecuencias altas para dejar solo la DC.

De esta forma, al colocar la segunda lente y formar un sistema telescópico ( $4f$ ), en la segunda distancia focal se ubica el sensor y será el plano holograma. Allí se genera un interferograma entre el campo óptico transmitido por el objeto que pasa por el filtro sin ser alterado y una onda plana, proveniente del haz que ha sido filtrado por la micro lente en el plano de Fourier.

En resumen, los parámetros del DPM necesarios para la formación de imagen según lo analizado anteriormente se listan en la tabla **2-1**:

Parámetro de diseño	Ecuación
Resolución	$\Delta\rho = \frac{1,22\lambda}{NA_{obj}}$
Mínima magnificación del $4f$	$ M_{4f}  \geq 2a \left[ \frac{1}{\Lambda} + \frac{1}{\lambda} \frac{NA_{obj}}{M_{obj}} \right]$
Magnificación	$M_{4f} = \frac{-f_2}{f_1}$ , $M = M_{obj}M_{4f}$
Separación órdenes 0 y +1 en el plano de Fourier	$\Delta x = \frac{f_1\lambda}{\Lambda}$
Máximo diámetro del Pinhole	$D \leq \frac{2,44\lambda f_2}{\gamma d}$

**Tabla 2-1.:** Síntesis de los parámetros ópticos para el diseño del DPM, tomado de [3]

Con esto establecido, en el siguiente capítulo se calculan las dimensiones específicas para el DPM que se construye en el laboratorio del Grupo de Óptica Aplicada.

### 3. Implementación de un Microscopio de Fase por Difracción para estudio de Sangre Periférica

En este capítulo se especifican las características de los componentes ópticos utilizados en el laboratorio del grupo de óptica aplicada para la construcción del microscopio de difracción de fase. Dado el análisis previo de cómo debe ser la relación entre la magnificación de las muestras, las dimensiones de la rejilla y el sistema telescópico; se definen los parámetros que debe tener el montaje experimental para ser capaz de resolver células con un tamaño en el orden de las decenas de micra. Posteriormente, se realiza la calibración del sistema óptico construido para definir tamaño y valores de fase. Por último, se expondrán los protocolos utilizados para la manipulación, almacenamiento, separación, análisis y desecho de sangre periférica; ya que la forma en que estos procesos se han llevado a cabo, son los que han permitido obtener información relevante para el estudio de células mononucleares.

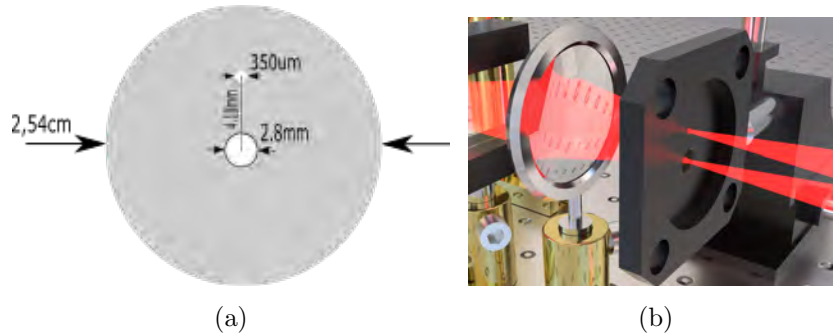
#### 3.1. Parámetros de Diseño

En primer lugar se requiere iluminar una muestra semitransparente con un haz altamente coherente. Se usa un haz monocromático en el rojo de  $632,8nm$  de longitud de onda ( $\lambda$ ) y  $0,1mW$  de potencia. El siguiente elemento que condiciona el sistema es la rejilla de difracción en transmisión, con una frecuencia de 110 líneas por milímetro. Por especificación del fabricante [65], en la distribución de intensidad el orden cero de difracción tiene el 45 % de intensidad y el orden  $+1$  y  $-1$  el 25 % cada uno. Por su parte la CCD utilizada es monocromática y tiene un tamaño de pixel ( $a$ ) =  $5,2\mu m$ . Definidos estos parámetros, se utilizan las relaciones resumidas en la tabla **2-1** para hallar la relación entre las lentes del sistema  $4f$  y la magnificación del microscopio. Por la ecuación (2-38), esta magnificación ( $M_{4f}$ ) depende de  $\lambda$ ,  $M_{obj}$ ,  $NA_{obj}$  y  $a$ ; entonces su mínimo valor debe ser  $M_{4f} = (1,4 \pm 0,1)$ . Como puede ser mayor se define para este sistema una magnificación de  $(2,5 \pm 0,1)$  utilizando una lente de distancia focal  $f_1 = (6,0 \pm 0,1)cm$  y otra de  $f_2 = (5,0 \pm 0,1)cm$ , cada una con un diámetro de una pulgada.

Para determinar la magnificación del objetivo microscopio, se determina la distancia entre órdenes de difracción en el plano focal de la primera lente. De la ecuación (2-41) se obtiene  $p = (4,18 \pm 0,01)mm$ . Se establece una magnificación en el objetivo de microscopio de  $40X$  con una apertura numérica de  $0,46$  que satisface las condiciones de diseño dadas por (2-35).

Con esta misma distancia se construye *el filtro* que anula todos los órdenes de difracción que genera la rejilla, excepto el  $+1$  y el  $0$ . Este filtro es un cilindro hecho por impresión 3D con un polímero flexible y opaco; sus dimensiones son,  $2,54cm$  de diámetro y  $0,78mm$  de profundidad. Tiene un

orificio justo en su centro de  $2,8mm$  de diámetro, lo suficientemente grande para que el orden de difracción que lleva información del objeto pase sin ser alterado o difractado. A una distancia  $p = (4,18 \pm 0,01)mm$  de su centro se tiene un segundo agujero de  $0,35mm$  de diámetro, en el cual se ubica una microlente responsable de filtrar el otro orden de difracción y eliminar toda la información del objeto. En la figura **3-1** se muestra el diseño del filtro espacial en **3-1a** y la ubicación de la microlente como esta dispuesta dentro del agujero más pequeño en **3-1b**.

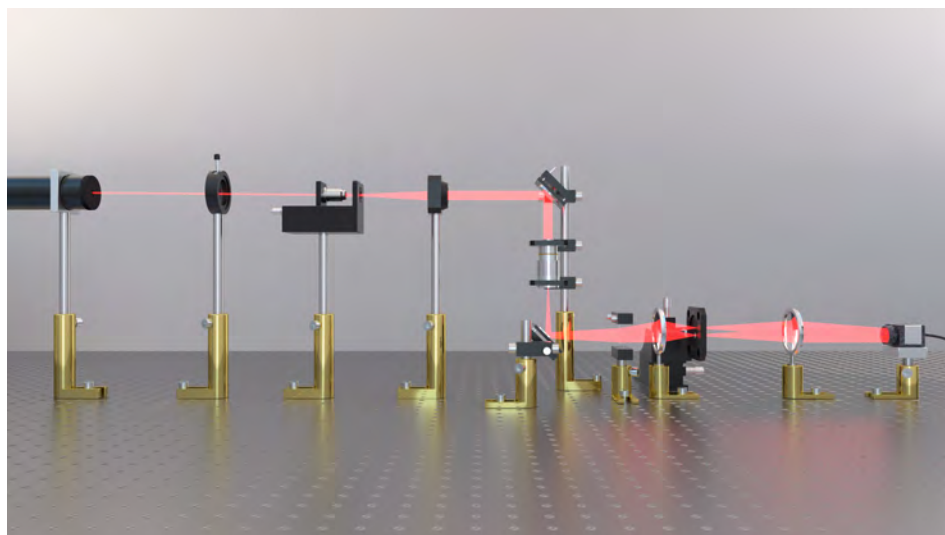


**Figura 3-1.:** (a) Dimensiones del filtro de Fourier (b) Filtro con microlente incorporada

La microlente es un cilindro de  $0,35mm$  de diámetro y  $0,78mm$  de profundidad según las especificaciones de fábrica [66] por esto el filtro tiene las dimensiones justas para que la lente quede ubicada a presión justo en el agujero y tanto a la entrada como a la salida el haz no choque dentro del mismo y se difracte o absorba. La función de esta microlente es tomar todo el haz incidente que lleva información de la muestra y filtrar las altas frecuencias. Su distancia focal efectiva es de  $0,3mm$ , generando imagen del haz a una distancia casi cero del plano de Fourier; es lo suficientemente corta como para asumir que se genera un DC en el plano de Fourier de tal manera que hay una onda plana en el plano de la CCD. Este aporte que aún no está publicado, es desarrollado por el grupo de *Quantitative Phase Imaging* del Instituto Beckman de la Universidad de Illinois. En la literatura se usa un pinhole [67], que es una perforación de un diámetro de  $5\mu m$  aproximadamente, lo que dificulta su ubicación espacial en el plano de Fourier y por ende la generación apropiada del interferograma. Para finalizar, el posicionamiento dentro del DPM del filtro y la microlente, se realiza con un desplazador micrométrico XYZ.

### Montaje Experimental

Usualmente el módulo del DPM se adapta a una salida de un microscopio óptico convencional que usa como fuente un haz de luz monocromático. En este caso, el esquema óptico es mixto ya que no se cuenta con el microscopio óptico; se ilumina y magnifica la muestra con un objetivo microscopio y posteriormente genera el patrón de interferencia con el DPM. La disposición de los elementos ópticos se muestra en la figura **3-2**. Primero, se colima el haz rojo horizontalmente y se dirige verticalmente sobre la muestra para iluminarla; como en un microscopio convencional. El objetivo de microscopio magnifica la imagen del objeto y guarda información del frente de onda en un campo complejo esférico.



**Figura 3-2.:** Esquema del Microscopio de fase por Difracción como esta dispuesto en el laboratorio.

Posterior al objetivo microscopio, se ubica un espejo que desvía nuevamente el haz a una configuración horizontal. La imagen que forma el objetivo de microscopio es la entrada del módulo del DMP. En consecuencia y como característica fundamental de diseño, el plano imagen de la salida del microscopio, la rejilla de difracción y el plano de entrada del sistema  $4f$  deben coincidir, de tal forma que en el plano de la CCD se registra la interferencia de los dos órdenes de difracción del campo óptico complejo magnificado y transmitido por el microscopio, y una imagen magnificada de la rejilla de difracción. Así, se tiene un holograma formado en plano-imagen como se describió en el capítulo 2.

Por último se ubican las lentes formando un sistema telescópico y generando una magnificación de 2,5 veces la imagen del microscopio en el plano de la CCD y se ubica el filtro en el plano de Fourier de la primera lente. Para generar el interferograma se debe obtener un filtrado limpio del haz que atraviesa la microlente, esto se logra cuando se tiene una irradiancia homogénea en la CCD si solo se deja pasar éste haz. Si no hay una apropiada iluminación, aún desde la colimación del sistema, no se garantiza homogeneidad en el patrón de irradiancia ni en el de interferencia. Una vez se haya alineado, se tiene un sistema con alta estabilidad mecánica, con franjas horizontales y estables con un período igual al inverso del período de la rejilla ( $\beta = \frac{1}{\Lambda}$ ).

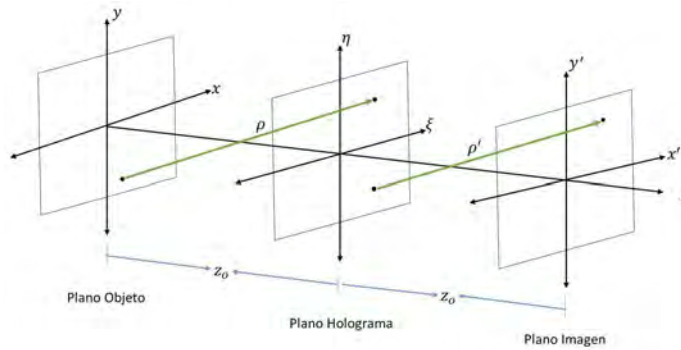
## 3.2. Reconstrucción del campo óptico complejo

Los parámetros de diseño dados para la construcción del DPM permiten registrar digitalmente la irradiancia el campo óptico complejo debido a la interferencia de un haz objeto, el cual lleva información de la muestra y un haz de referencia que para este caso ha sido filtrado por la microlente. Sin embargo, es necesario realizar un tratamiento digital al campo registrado por la CCD para reconstruir los mapas de amplitud y de fase.

El proceso consiste en realizar una transformada de Fourier del patrón de irradiancia como se hizo en el capítulo dos en la ecuación 2-29, para obtener el espectro de frecuencias del campo. Como este

tiene dos órdenes de difracción, se hace un filtro de Fourier en el cual se toma uno de esos órdenes, se recorta, se centra y se vuelve a transformar. A este campo que ha sido filtrado se le denomina campo óptico complejo filtrado ( $U_F(\xi, \eta)$ ) y para reconstruirlo existen varias aproximaciones y algoritmos digitales basados en el principio de propagación de ondas por difracción.

La ecuación 2-18 define el patrón de irradiancia que es registrado y discretizado por el sensor. Para reconstruirlo se definen algunos planos importantes: El haz objeto se encuentra en el *plano-objeto* con coordenadas  $(x, y)$  y se propaga a través del sistema óptico en dirección  $z$  hasta el *plano-holograma*, con coordenadas  $(\xi, \eta)$  una distancia  $z_0$ . Para reconstruir digitalmente este campo, se debe iluminar con una onda plana digital  $U_R(x, y)$ ; similar al haz de referencia con el que se registró y propagar nuevamente de forma digital hasta el *plano-imagen* con coordenadas  $(x', y')$  [68]. Así es posible recuperar la información de la amplitud de la onda objeto y la diferencia de fase entre la onda objeto y la de referencia. La figura 3-3, muestra los diferentes planos involucrados en la reconstrucción digital, que a continuación se describe matemáticamente.



**Figura 3-3.:** Planos presentes en la holografía digital.

El proceso de reconstrucción digital parte del principio de propagación del campo óptico complejo, en el que una onda se difracta al atravesar una abertura, que en este caso particular es un holograma; y está descrita por la ecuación de Fresnel-Kirchoff (3-1):

$$U(x', y') = \frac{i}{\lambda} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} I(\xi, \eta) U_R(x, y) \frac{\exp(-i \frac{2\pi}{\lambda} \rho)}{\rho} d\xi d\eta \quad (3-1)$$

Donde  $\rho' = \sqrt{(x' - \xi)^2 + (y' - \eta)^2 + z_0^2}$  es la distancia entre un punto cualquiera ubicado en el plano-holograma y un punto cualquiera en el plano-imagen,  $U_R(x, y)$  es la amplitud de la onda de referencia,  $I(\xi, \eta)$  la intensidad registrada en el plano del sensor y  $z_0$  la distancia entre el plano-holograma y el plano-imagen a una longitud de onda  $\lambda$  (Ver figura 3-3).

Como este campo es complejo, es posible obtener su intensidad (amplitud) y su fase a través de métodos matemáticos computacionales que varían según la eficiencia computacional y el grado de aproximación al campo reconstruido. Entre ellos se encuentran la aproximación por convolución, la aproximación de Fresnel y el algoritmo de espectro angular [69].

Cabe notar que en la técnica del DPM se aplican métodos de reconstrucción por plano-imagen [15], en la que se considera  $z_0 = 0$ ; lo que implica que el plano-imagen esta en el mismo plano holograma [70]. También se han aplicado otros métodos alternos como el de la segunda derivada [71] y el de la

transformada de Hilbert [72]. Ya que es difícil asegurar el enfoque de las muestras biológicas para que el plano-imagen coincida con el plano-holograma, se implementa el método de reconstrucción de espectro angular de campo cercano y se considera  $z_0 \cong 0$  [73].

### Reconstrucción por espectro angular

En este algoritmo se interpreta al campo como una superposición de ondas planas con amplitud constante que se propagan en una única dirección, es decir, no se difracta. El espectro angular de un campo de entrada  $U(x, y, z)$  en  $z_0 = 0$  está dado por:

$$U(\xi, \eta, 0) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} U(x, y, 0) \exp(-i(\xi x + \eta y)) dx dy \quad (3-2)$$

Esta es la forma directa de una transformada de Fourier, pero si se quiere describir la amplitud compleja del campo en  $z_0 = 0$  a partir de su espectro angular, se toma la forma inversa de la transformada:

$$U(x, y, 0) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} U(\xi, \eta, 0) \exp(i(\xi x + \eta y)) d\xi d\eta \quad (3-3)$$

Si el campo  $U(\xi, \eta, z_0 = 0)$  se propaga una distancia  $z_0$ , el espectro angular del campo a esa distancia está dado por:

$$U(\xi, \eta, z_0) = U(\xi, \eta, 0) \exp(i(k_z z)) \quad (3-4)$$

Con  $U(\xi, \eta, 0)$ , el espectro angular del campo en el punto  $z_0 = 0$  dado por (3-2) y la frecuencia espacial  $k_z = \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}$  [74]. Por su parte,  $\exp(i(k_z z))$  es un término de fase asociado a la propagación de la onda.

Por lo tanto, la ecuación 3-3 se modifica por un término de fase debido a la propagación hasta el plano imagen, donde las nuevas coordenadas son  $(x', y')$  y queda:

$$U(x', y'; z_0) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} U(\xi, \eta, 0) \exp(i(k_z z_0)) \exp(i(k_x x' + k_y y')) dx' dy' \quad (3-5)$$

Lo cual representa la transformada de Fourier propagada del campo en la apertura, es decir, en el plano holograma. En síntesis, el campo registrado se lleva al espacio de frecuencias con una transformada de Fourier y se multiplica por un factor de fase. Posteriormente, se vuelve a realizar otra transformada de Fourier habiendo centrado el campo y así se obtiene el campo óptico complejo reconstruido. Como se explicó en el capítulo uno, por la digitalización del campo, este se discretiza en función definiendo un tamaño de pixel reconstruido está dado por las relaciones:

$$\Delta x' = \frac{\lambda z_0}{N \Delta x} \quad \Delta y' = \frac{\lambda z_0}{N \Delta y}, \quad (3-6)$$

donde  $\Delta x'$  y  $\Delta y'$  son las dimensiones del pixel en el plano reconstruido y  $\Delta x$  y  $\Delta y$  son las dimensiones reales del pixel en la CCD. En este caso,  $\Delta x = \Delta y = a$ . Esto define los límites de muestreo

del campo óptico complejo que se usaron para establecer el diseño óptico del microscopio de fase por difracción.

### Cálculo de la amplitud y diferencia de fase del campo

Teniendo ya reconstruido digitalmente el campo óptico complejo modificado por el objeto, se calcula la amplitud del campo que corresponde a:

$$I(x', y') = |U(x', y')|^2 \quad (3-7)$$

Y el mapa de diferencia de fase de la onda objeto mediante:

$$\Psi(\xi', \eta') = \arctan \left[ \frac{Im(U(x', y'))}{Re(U(x', y'))} \right] \text{mod}(2\pi) \quad (3-8)$$

Donde  $Im$  y  $Re$  representan la parte imaginaria y real de  $U(x', y')$ , respectivamente [75] y  $\text{mod}(2\pi)$  implica que se debe realizar un desenvolvimiento de los mapas de fase cuando se presenten discontinuidades debido a las indeterminaciones de la función tangente.

Para tener una reconstrucción apropiada del campo óptico complejo, no solo se registra un holograma entre la interferencia del haz difractado por el objeto y el haz de referencia. También se hace necesario obtener un *holograma de referencia* con las mismas condiciones del holograma a reconstruir pero sin objeto. Estos dos hologramas se registran y se restan para compensar la curvatura y minimizar las aberraciones debido a los sistemas formadores de imagen del DPM.

### 3.3. Cálculo de Índice de Refracción

A partir de la diferencia de fase obtenida por el campo óptico complejo del objeto reconstruido es posible medir el índice de refracción de objetos semitransparentes. Por lo tanto, el DPM es un método de cuantificación de fase que permite estudiar la variación de esta propiedad según los cambios internos que puedan presentar, en este caso, las células.

Un cambio en el índice de refracción conlleva a un cambio en el camino óptico, lo que implica una variación de fase entre la onda objeto y la onda de referencia en un patrón de interferencia. El cambio de fase debido a variaciones del índice de refracción esta dado por [76, 77, 78]:

$$\Delta\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \int_{l_1}^{l_2} [n(x, y, z) - n_0] dz, \quad (3-9)$$

donde  $n_0$  es el índice de refracción del medio donde se encuentra la muestra de estudio, y  $n(x, y, z)$  es la distribución de índice de refracción debido al aporte de fase dado por el objeto. La luz atraviesa la muestra en dirección  $z$ , así que la integral se calcula en esta dirección. Haciendo  $d = l_2 - l_1$  se define la distancia que recorre la luz en el medio perturbativo. Si se considera un objeto homogéneo, no hay variaciones en  $z$  y  $n$  es constante. Por lo tanto la integral 3-9 queda:

$$\Delta\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} [n(x, y, z) - n_0] \int_{l_1}^{l_2} dz = \frac{2\pi}{\lambda} [n(x, y, z) - n_0] \times d. \quad (3-10)$$

En consecuencia, para calcular el índice de refracción a partir de la diferencia de fase, se debe conocer el índice de refracción del medio y asumir homogeneidad en el índice de refracción del objeto. En el caso de células semitransparentes como los linfocitos, se debe hacer una consideración más sobre la morfología de las células, asumiendo esfericidad; es decir, la distancia  $d$  que recorre la luz es la misma que la distancia del diámetro medida lateralmente.

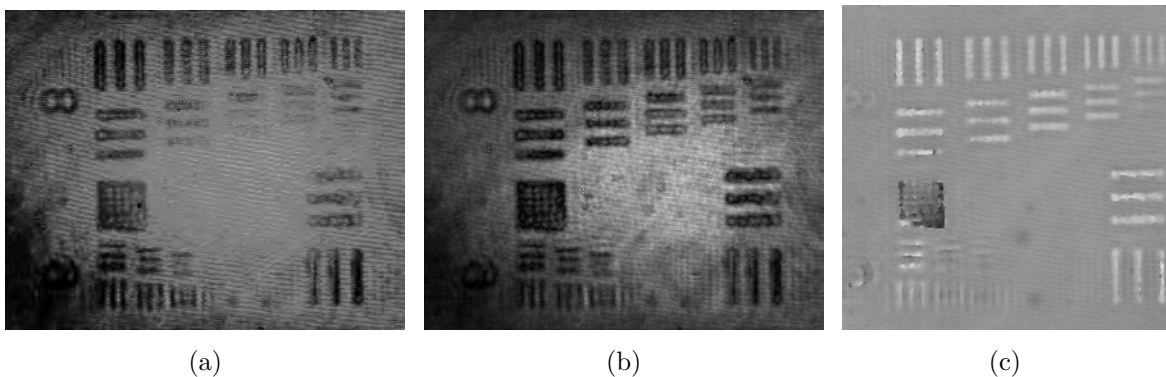
Despejado el índice de refracción del objeto de 3-10, se tiene:

$$n(x, y, z) = \frac{\lambda}{2\pi d} \Delta\varphi(x, y) + n_0 \quad (3-11)$$

### 3.4. Calibración lateral en fase

Establecidas las condiciones de diseño necesarias para generar interferencia y muestreo del interferograma por la CCD; se registra la intensidad del campo óptico complejo transmitido por el objeto de estudio. Con esta información es posible reconstruir digitalmente mapas de amplitud y de diferencia de fase a partir del patrón de irradiancia de (2-18). Se aplica inicialmente este proceso de reconstrucción con aproximación a *plano imagen* dado en la sección anterior a una tarjeta de calibración lateral de alta resolución USAF 1951 en positivo, con el propósito de calibrar lateralmente el sistema y determinar el tamaño de pixel reconstruido.

La USAF es un arreglo de franjas horizontales y verticales, distribuidas en una placa de vidrio transparente por grupos y elementos que varían su periodo de forma descendente según se vaya incrementando el número de grupo. Un *elemento* se define como un conjunto de tres franjas verticales y otras tres horizontales con un ancho de igual medida que su separación; y un *grupo* es un conjunto de tres elementos con el mismo periodo. La tarjeta utilizada para calibrar tiene seis elementos por grupo, excepto el grupo 9 que tiene tres elementos.



**Figura 3-4.:** (a) Registro, (b) reconstrucción de amplitud y (c) reconstrucción del mapa de fase de los grupos 8 y 9 de la USAF

En la figura 3-4, se observa el registro 3-4a, la reconstrucción en amplitud 3-4b y la reconstrucción del mapa de fase 3-4c de los grupos 8 y 9 de la USAF. Para determinar un tamaño de pixel reconstruido en micras y calibrar longitudinalmente el sistema, se toman diferentes perfiles de cada elemento y se mide la distancia pico a pico en pixeles de cada uno. El fabricante reporta el ancho calibrado de cada barra según grupo y elemento, así se construye la tabla 3-1 en la que se registra

el tamaño de pixel en micras calculado para cada elemento según el tamaño de cada franja y el respectivo promedio. Se determina que el tamaño promedio del pixel es de  $(0,109 \pm 0,006)\mu m$ , valor que será utilizado para establecer la escala de los mapas de fase reportados en esta tesis.

Grupo	Elemento	Ancho de Barra ( $\mu m$ )	Tamaño Promedio de Pixel ( $\mu m$ )
8	1	1.95	$(0,104 \pm 0,002)$
	2	1.74	$(0,107 \pm 0,006)$
	3	1.55	$(0,105 \pm 0,002)$
	4	1.38	$(0,113 \pm 0,007)$
	5	1.23	$(0,114 \pm 0,002)$
	6	1.10	$(0,116 \pm 0,008)$
9	1	0.98	$(0,118 \pm 0,003)$
	2	0.87	$(0,105 \pm 0,014)$
	3	0.78	$(0,104 \pm 0,009)$
<b>Tamaño de Pixel Promedio (<math>\mu m</math>)</b>			<b><math>(0,109 \pm 0,006)</math></b>

Tabla 3-1.: Tabla de promedios de tamaños de pixel medidos en diferentes elementos de la tarjeta USAF

### 3.5. Preparación de Muestras Biológicas

El principal objeto de estudio es sangre periférica humana, como se indicó en el capítulo 2, la sangre esta constituida por diferentes tipos de células además del plasma y cada una de estas células posee organelos que las distinguen morfológicamente. Para identificar células blásticas en sangre periférica, el proceso de selección, diferenciación y caracterización de las mismas se describe a continuación.

Las muestras a analizar deben ser de dos tipos, el primero es sangre periférica de individuos sanos y el segundo de pacientes con Leucemia Linfocítica Aguda (LLA). Para cada tipo se realiza un proceso de separación de tal forma que se pueda obtener una muestra de células linfociticas puras sanas y no sanas. Estas muestras se analizan con el microscopio de fase por difracción y se obtienen características ópticas diferenciables que permitan distinguir células blásticas del resto de células mononucleares.

Los donantes sanos son estudiantes anónimos y voluntarios de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, la extracción y manipulación de sangre es realizada por la profesora Marcela Camacho, quien cumple con todos los requisitos legales y éticos para realizar este procedimiento. Las muestras de sangre con leucemia linfocítica aguda son tomadas a pacientes voluntarios y anónimos por el Instituto Nacional de Cancerología (INC). La muestra poblacional son dos donantes sanos y dos donantes enfermos, este número es suficiente para realizar una estadística que valide los resultados en las medidas de índice de refracción y tamaños; que son los parámetros de diferenciación que

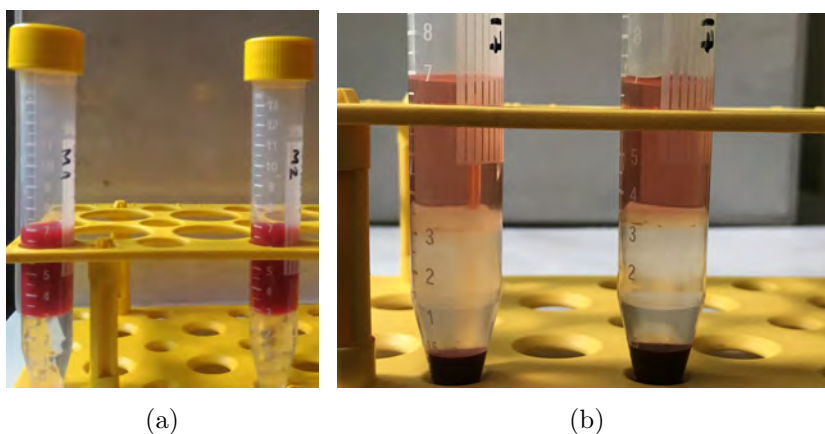
serán estudiados en la presente tesis.

Para los dos tipos de muestra, se hace una separación de células blancas, glóbulos rojos y plasma con Ficoll-Paque PLUS. Basados en un protocolo sugerido por el fabricante [79] se propone un protocolo de separación y lavado adaptado a las condiciones del laboratorio y la centrifuga utilizada. Los detalles del experimento que permitió definir el protocolo implementado en esta tesis se describen en el anexo A.

### Muestras de LLA

Para los dos donantes con LLA se distinguen las muestras como *E1* y *E2*. La preparación se realiza con  $1\text{ml}$  de sangre que se diluye con  $3\text{ml}$  de un medio de cultivo, el cual es una mezcla de RPMI con PBS. La solución que tiene un volumen de  $4\text{ml}$  se sirve en un tubo de ensayo que contiene  $4\text{ml}$  de Ficoll. Siempre se debe asegurar el no mezclar las sustancias al depositar la sangre. Posteriormente, se centrifuga a  $1500\text{rpm}$  durante media hora para realizar la separación. En figura 3-5a se observan dos tubos donde cada muestra ha sido depositada en Ficoll sin mezclar, en la figura 3-5b es posible diferenciar cuatro bandas; de abajo hacia arriba se encuentran los glóbulos rojos, el ficoll, las células blancas y el plasma.

Después de la separación, se extrae del tubo la banda de células blancas para lavarlas. El proceso de lavado se realiza nuevamente en la centrifuga a  $800\text{rpm}$  por 15 minutos, después de haber diluido la banda de linfocitos en medio de cultivo, esto se hace para asegurar el decantamiento de los linfocitos y la separación del Ficoll. Cada tubo queda con dos capas, los linfocitos al fondo y el Ficoll en la parte superior. De aquí son extraídos para cultivo y para la preparación de las muestras que se analizan con el microscopio de contraste de fase.



**Figura 3-5.:** (a) Preparación y (b) bandas de separación de sangre de pacientes con LLA, obtenidas por el protocolo de separación con Ficoll

### Muestras de sangre sana

Para las células sanas se realiza el mismo procedimiento que para las enfermas. En este caso se toman  $2\text{ml}$  de sangre y se diluyen en  $2\text{ml}$  de medio de cultivo, para obtener una solución de  $4\text{ml}$  que se deposita en  $4\text{ml}$  de Ficoll. Se separan las bandas en la centrifuga a  $222\text{rpm}$  por media hora.

El lavado se realiza a  $222rpm$  por 15 minutos. Las bandas obtenidas tanto en la separación como en el lavado son muy similares a las de la figura **3-5**.

Con esta preparación se definen para analizar con el microscopio de difracción de fase  $E_1$  y  $E_02$  como muestras de sangre de pacientes con LLA y  $S_1$  y  $S_2$  como muestras de sangre de donantes sanos. Las muestras constan de linfocitos aislados del plasma y de los glóbulos rojos. Se espera identificar diferencias morfológicas y en el índice de refracción para cada tipo de célula linfocítica en las muestras sanas que permitan distinguir células blásticas en las muestras de pacientes enfermos. Los resultados de este proceso se presentan en el capítulo 4.

Habiendo definido el protocolo de preparación de las muestras de sangre periférica humana, que es el objeto de estudio de esta tesis para determinar diferencias. Y estableciendo el proceso de reconstrucción del campo óptico complejo de los hologramas registrados por el DPM para obtener información de tamaño e índice de refracción de las células, en el siguiente capítulo se describen los resultados obtenidos al estudiar células sanas y enfermas.

## 4. Resultados y análisis

Dadas las condiciones experimentales para el registro de hologramas de muestras biológicas, su respectiva reconstrucción de amplitud y mapas de fase y la preparación apropiada de las muestras, descrita en el capítulo 3, se procede a estudiar muestras de sangre periférica de donantes voluntarios sanos y pacientes voluntarios anónimos diagnosticados con LLA. Se realiza una separación de linfocitos para cada donante, se caracterizan las células mononucleares por tamaño y se registran hologramas para obtener el índice de refracción de cada una de ellas a partir de los mapas de fase reconstruidos numéricamente. En este capítulo se presentan los resultados de las medidas de tamaño de cada tipo de célula mononuclear hechas por microscopio óptico y se reporta el índice de refracción promedio para clasificar cada tipo de célula, estableciendo un parámetro de diferenciación entre las células sanas y las células enfermas.

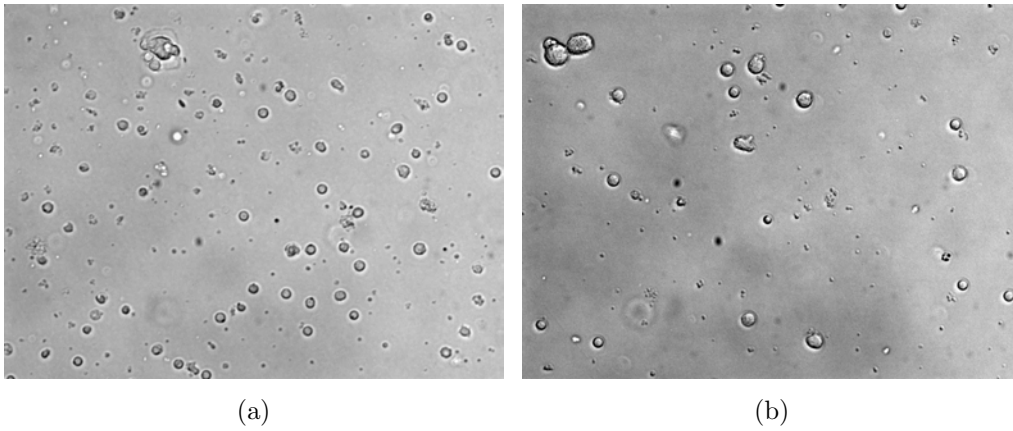
### 4.1. Caracterización de células mononucleares en sangre periférica de donantes sanos

Se obtuvo por donación voluntaria muestras de sangre periférica humana de dos donantes sanos. Dado que para la manipulación de sangre se requiere seguir ciertos protocolos estandarizados, la preparación de las muestras se hace en el laboratorio de Biofísica de la Universidad Nacional de Colombia bajo la supervisión de la Dra. Marcela Camacho y con la aprobación del comité ético de la Universidad Nacional de Colombia (ver Anexo C).

Implementando el protocolo de diferenciación de linfocitos descrito en el capítulo 3, se realiza la separación de sangre para las dos muestras que se identifican como  $S_1$  y  $S_2$ . De cada una se extraen el suero y los glóbulos rojos, dejando aislada la población de linfocitos; se espera que en cada muestra haya únicamente linfocitos T, linfocitos B y monocitos.

#### 4.1.1. Tamaño de células mononucleares sanas

Después de la separación por centrifuga, se obtiene la banda de linfocitos que se diluye en PBS, tal como se describió en 3.3. Para su observación, se realizan extendidos sobre láminas de vidrio y utilizando un microscopio óptico con un objetivo de microscopio de 40x se obtienen imágenes de las muestras  $S_1$  y  $S_2$ . Implementando una escala dada por el fabricante del microscopio, se mide el diámetro de una población de 226 células para la muestra  $S_1$  y 174 células para la muestra  $S_2$ . En la figura 4-1 se observan dos imágenes correspondientes a cada tipo de muestra, vista por el microscopio óptico.

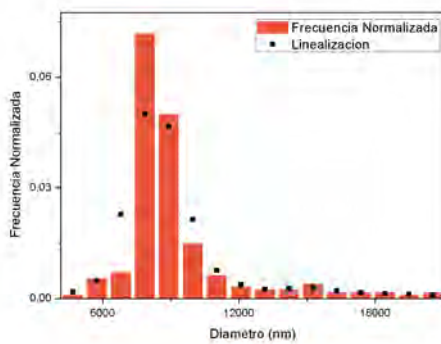


(a)

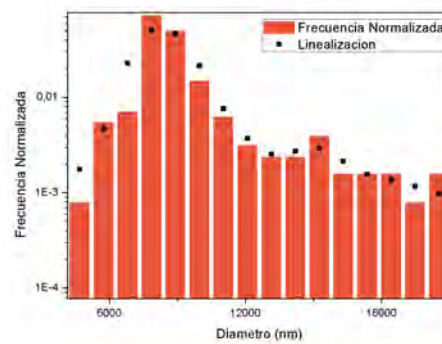
(b)

**Figura 4-1.:** Imágenes de los linfocitos de las muestras (a)  $S_1$  y (b)  $S_2$  vistas por un microscopio óptico con un objetivo de microscopio de 40x

Con la medida de los diámetros de las células en cada muestra, se hace un análisis estadístico de cada población. Se observa que hay una menor cantidad de linfocitos en la muestra  $S_2$  ya que se obtuvo un volumen menor en la separación. En los histogramas de las figuras 4-2 y 4-3 se observa la distribución frecuencial de las células medidas para  $S_1$  y  $S_2$  respectivamente, los datos se normalizan y se linealizan para determinar el comportamiento modal. Los puntos indican la curva de linealización, esto permite determinar máximos locales sobre la tendencia y así definir intervalos de confianza para analizar los datos por sub-grupos y así asociados a diferentes tipos de células mononucleares.

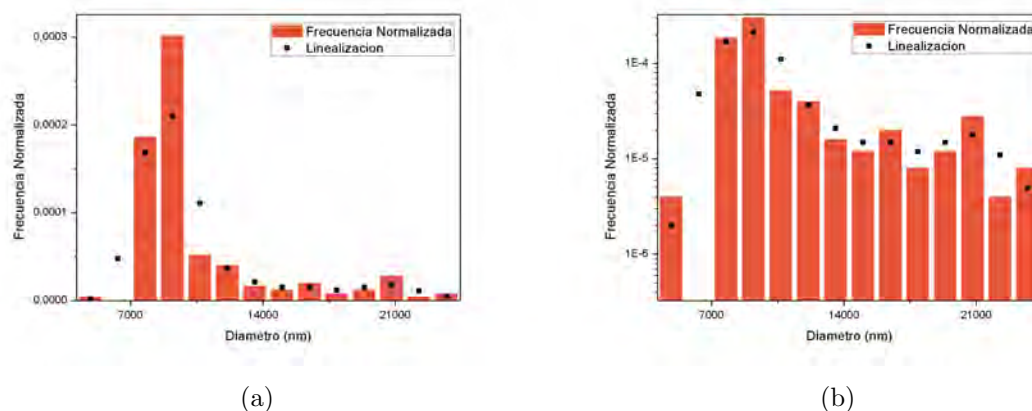


(a)



(b)

**Figura 4-2.:** Histogramas de los diámetros de células mononucleares de la muestra  $S_1$  en (a) escala lineal y (b) en escala logarítmica.



**Figura 4-3.:** Histogramas de los diámetros de células mononucleares de la muestra  $S_2$  en (a) escala lineal y (b) en escala logarítmica.

Para la muestra  $S_1$ , en el histograma 4-2a se observan 4 máximos locales que no son tan claros para los intervalos donde las frecuencias de la muestra son menores. Por lo tanto, se grafica en escala logarítmica en 4-2b donde se pueden apreciar 4 diferentes picos que definen cuatro subgrupos los cuales pueden asociarse a Linfocitos T y B, monocitos y contaminación de glóbulos rojos. Ya que los datos no son suficientes para asociar un sub-grupo determinado a un tipo de célula en específico, se calculan promedios en esos intervalos para compararlos con diámetros de células ya reportados. En la tabla 4-1 se registran los promedios de diámetro para cada sub-grupo.

Grupo	Diámetro promedio ( $\mu m$ )	Mínimo ( $\mu m$ )	Máximo ( $\mu m$ )	Cuenta Poblacional
<i>A</i>	$5,41 \pm 0,42$	4.69	6.05	11
<i>B</i>	$7,84 \pm 0,66$	6.50	9.55	176
<i>C</i>	$11,66 \pm 1,79$	9.55	14.8	27
<i>D</i>	$17,57 \pm 1,84$	15.22	20.55	10

**Tabla 4-1.:** Promedio de diámetro de células por los cuatro intervalos de confianza para la muestra  $S_1$

El mismo procedimiento se realiza con la muestra  $S_2$ , en el histograma 4-3a se observa que hay un sub-grupo predominantes en la distribución, pero también se grafica en escala logarítmica para observar la distribución modal de los subgrupos con menor frecuencia (4-3b). Así, se definen para este caso tres intervalos de confianza, con sus respectivos máximos y para cada subgrupo se calcula el promedio de la muestra, en la tabla 4-2 se muestran los resultados.

Grupo	Diámetro promedio ( $\mu m$ )	Mínimo ( $\mu m$ )	Máximo ( $\mu m$ )	Cuenta Poblacional
<b>A</b>	$8,04 \pm 0,71$	6.65	10.27	135
<b>B</b>	$11,70 \pm 0,91$	10.32	13.77	16
<b>C</b>	$18,51 \pm 0,27$	13.92	23.70	22

**Tabla 4-2.:** Promedio de diámetro de células por los tres intervalos de confianza para la muestra  $S_2$

Esto se puede afirmar, ya que según los valores reportados para células mononucleares, el diámetro de glóbulos rojos se encuentra entre  $7,5\mu m$  y  $8,7\mu m$  [80]. Por su parte, los linfocitos varían su tamaño según estén activados o no, tanto los T y los B son sólo un poco más grandes que los glóbulos rojos con un diámetro entre  $6\mu m$  y  $9\mu m$ ; pero si están activados miden entre  $10\mu m$  y  $14\mu m$ . Los monocitos son la población con menor porcentaje pero mayor tamaño con un diámetro aproximado de  $20\mu m$ . [81, 82]

Así, para la muestra  $S_1$  se confirma que hay cuatro tipos diferentes de células, sin embargo los tamaños medidos discrepan de los reportados. Los grupos A, B y C pueden ser Linfocitos T y B y Glóbulos Rojos, pero por diferenciación asumimos el grupo A como glóbulos rojos, el B y el C como linfocitos T y B y el D como monocitos. Por su parte, para la muestra  $S_2$  los grupos A y B se asocian a poblaciones de Linfocitos T y B activos y no activos, y el grupo C a monocitos. No se evidencia contaminación de glóbulos rojos.

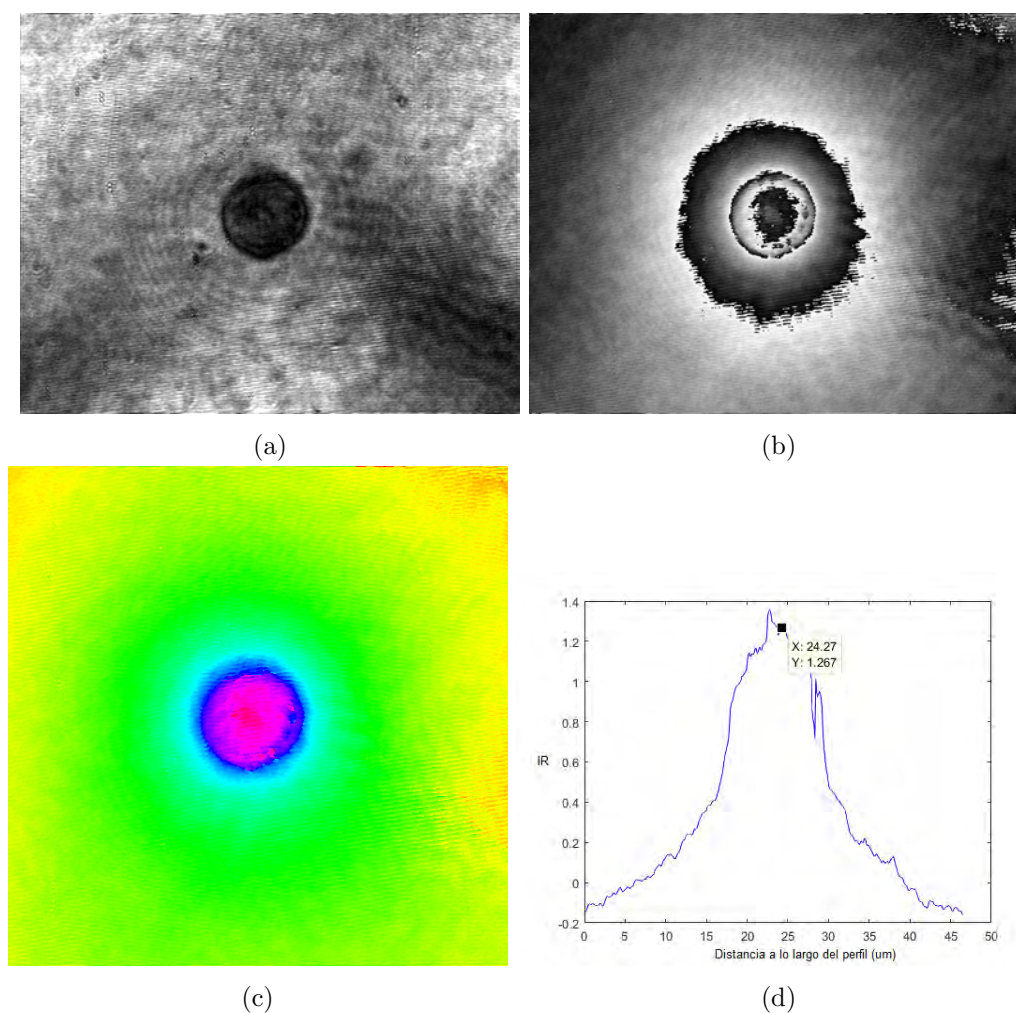
#### 4.1.2. Cálculo del Índice de Refracción de células sanas

Para calcular el índice de refracción de cada tipo de célula, de las muestras se registran 24 hologramas para la muestra  $S_1$  y 20 hologramas para la muestra  $S_2$  con el DPM. Para esto, sobre una laminilla cubre objetos se deposita una porción de linfocitos diluidos en PBS, se deja secar el medio de cultivo y el porta muestras se ubica en el plano objeto del sistema óptico, tal que en el sensor se tenga una imagen magnificada de las células enfocadas. Se registran varios hologramas de diferentes células escogidas aleatoriamente para reconstruir el campo óptico complejo dispersado por el objeto.

Para reconstruir su amplitud y mapas de fase se implementa el algoritmo de reconstrucción espectral angular tomando la aproximación a plano-imagen ( $z_0 = 0$ ). Se registran y reconstruyen dos hologramas, el primero es el de la interferencia entre haz objeto con objeto y haz referencia; y el segundo, los dos haces interfiriendo sin objeto. Para cada campo óptico complejo reconstruido se aplica la ecuación 3-7 para obtener la amplitud del campo y 3-8 para el mapa de diferencia de fase. Posteriormente, se calcula el mapa de índice de refracción de cada célula con la ecuación 3-11, asumiendo su esfericidad. Por lo tanto, la distancia  $d$  medida longitudinalmente por el DPM se puede suponer que es la misma longitud axial que la luz recorre [83].

Las figura 4-5 muestra un ejemplo de la reconstrucción de amplitud y fase, y el mapa de índice de

refracción con un perfil sobre el eje central para determinar valores promedio de índice de refracción sobre todas las células registradas.



**Figura 4-4.:** (a) Es la reconstrucción de amplitud de una célula de la muestra  $S_2$  y (b) es el mapa de fase envuelto (c) el mapa de índice de refracción y (d) un perfil sobre el eje central de la célula superior

Para obtener el índice de refracción promedio para cada grupo de células, por cada mapa de fase se trazó tres perfiles en el centro de la célula y se halló el promedio del valor máximo de cada perfil. Posteriormente, se asociaron las medidas según el tamaño de la célula, a partir de los rangos establecidos con las medidas realizadas del tamaño por microscopía óptica. En la tabla 4-3 se reportan las medidas de índice de refracción para linfocitos sanos.

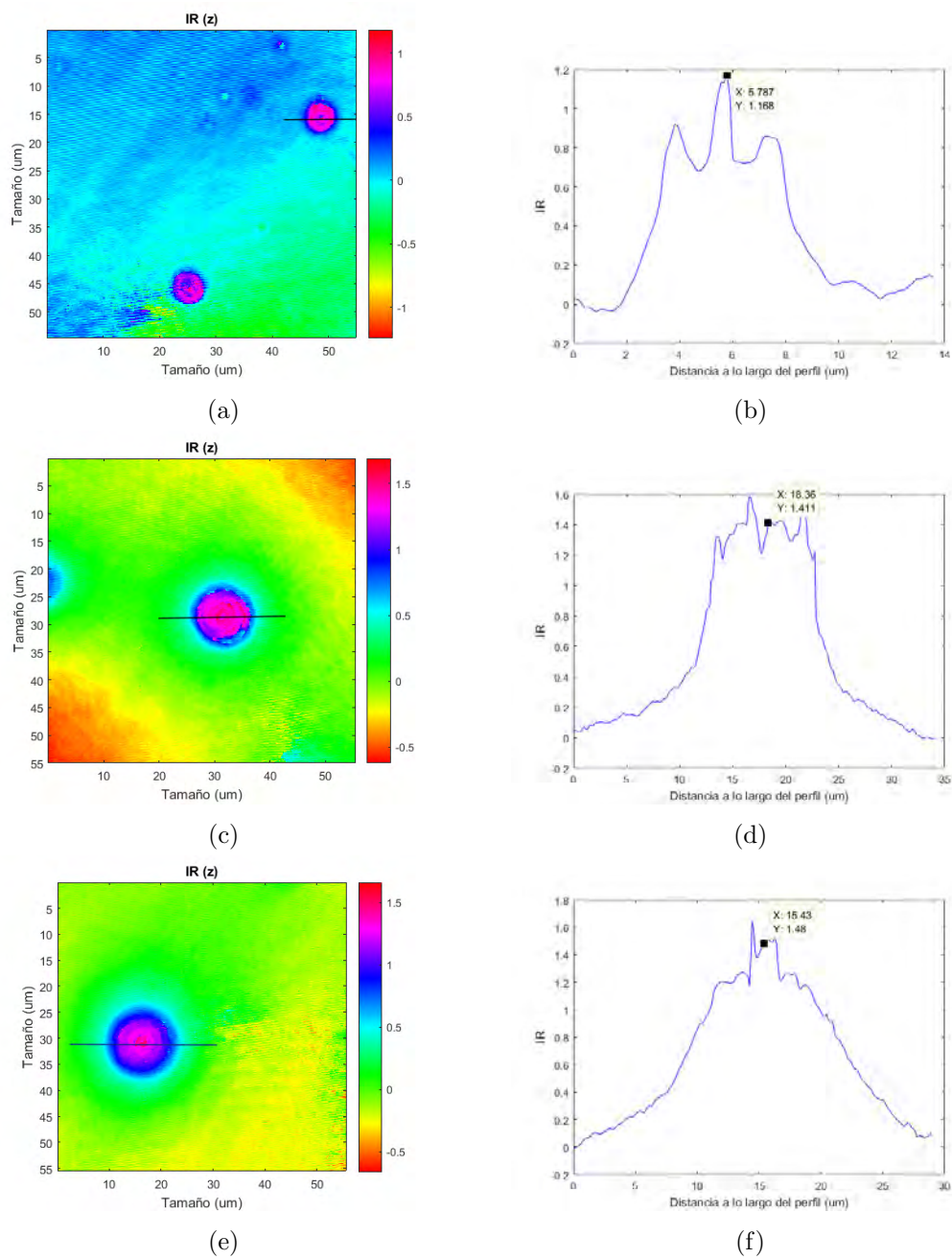
Grupo	Rango de tamaños ( $\mu m$ )	Índice de refracción Promedio
B	5,45 – 6,08	$1,087 \pm 0,332$
C	7,62 – 7,49	$1,339 \pm 0,160$
D	9,89 – 12,63	$1,435 \pm 0,153$

**Tabla 4-3.:** Índice de Refracción Promedio para los grupos de células sanas para las muestras  $S_1$  y  $S_2$

Según estudios previos de células de sangre, el índice de refracción promedio de glóbulos rojos sanos es de  $(1,399 \pm 0,006)$ , [84], para linfocitos es de 1,378 y para monocitos de 1,381, medidos por holografía digital [83]. Comparando con los resultados obtenidos por DPM mostrados en la tabla 4-3 y considerando sus rangos de error, hay una coincidencia entre datos. Esto evidencia que la técnica es apropiada para determinar el índice de refracción de linfocitos sanos y que al determinar el índice de células enfermas se obtendrá un valor comparable que puede generar una diferenciación. Sin embargo, debe considerarse que la discrepancia entre los datos del DPM y los datos reportados que se han tomado con otras técnicas es alto y los factores de error deben identificarse y reducirse. También se observa que cada tipo de célula tiene un índice de refracción diferente y que entre más grande sea, su índice de refracción aumenta, según se puede observar en la tabla 4-3.

En las imágenes siguientes se observan mapas de índice de refracción de algunas células registradas de cada familia de células y un ejemplo del perfil tomado a lo largo de la línea que se observa en cada uno de los mapas de la figura 4-5 para medir su índice de refracción.

Se observa que los tamaños de las células para cada grupo son diferentes, la reconstrucción del campo óptico complejo genera imágenes magnificadas de cada célula comparadas con la microscopía óptica. En estos mapas también se hace evidente la diferencia entre el núcleo y el citoplasma de las células mononucleares. Por lo tanto, el sistema óptico es capaz de resolver las diferencias de fase entre uno y otro organelo de las células. En este estudio se toma únicamente el valor central de fase y como consecuencia un único valor de índice de refracción por cada célula; ya que el único valor que de tamaño del que se tiene certeza es de el diámetro de la célula. Con este valor, medido en diferentes células es posible establecer una base de diferenciación no solo entre células de una misma muestra, sino con los linfocitos de pacientes con LLA, las cuales se estudiarán a continuación para establecer las características que las diferencian.



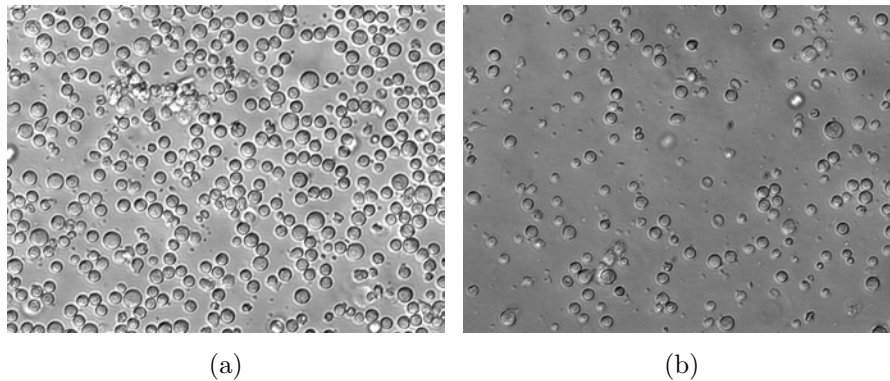
**Figura 4-5.:** (a), (c) y (e) son mapas de índice de refracción de células sanas para las tres clases de células presentes en las muestras  $S_1$  y  $S_2$ . (b) (d) (f) son sus respectivos perfiles sobre la línea indicada

## 4.2. Caracterización de Células Mononucleares en sangre periférica de pacientes con LLA

Se obtuvo por donación anónima y voluntaria, muestras de sangre periférica humana de dos pacientes con LLA, los donantes son pacientes del Instituto Nacional de Cancerología a quienes se les diagnosticó la enfermedad y su elección fue aleatoria. Dado que para la manipulación de sangre son necesarios ciertos protocolos y cursos, la preparación de las muestras se hace en el laboratorio de Biofísica de la Universidad Nacional de Colombia bajo la supervisión de la Dra. Marcela Camacho. Implementando el protocolo de diferenciación de linfocitos descrito en el capítulo 3, se realiza la separación de sangre para las dos muestras que se identifican como  $E_1$  y  $E_2$ . De cada una se extrae el suero y los glóbulos rojos dejando aislada la población de linfocitos, se espera que en cada muestra haya únicamente linfocitos T, linfocitos B, monocitos y células blásticas.

### 4.2.1. Tamaño de células mononucleares enfermas

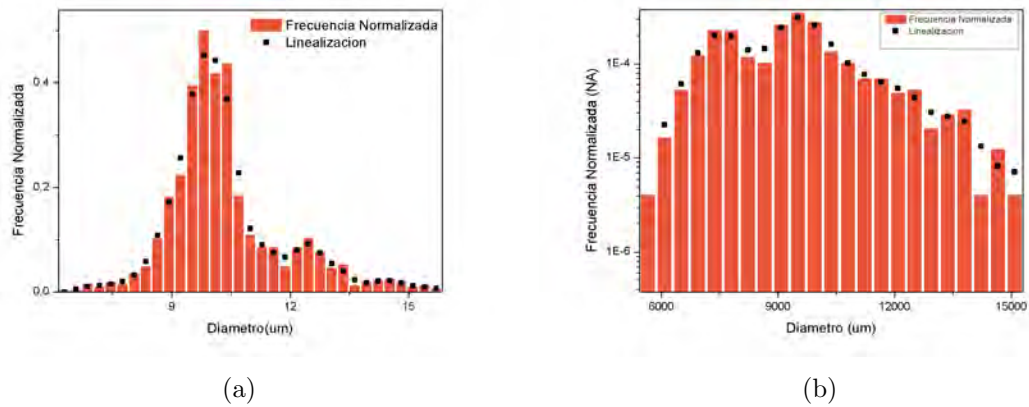
Utilizando un microscopio óptico con una magnificación de 40x se obtienen imágenes de las muestras  $E_1$  y  $E_2$ . De igual manera que con las células sanas, se mide el diámetro de una población de 1122 células para la muestra  $E_1$  y 575 células para la muestra  $E_2$ . En la figura 4-6 se observan dos imágenes correspondientes a cada tipo de muestra, vista por el microscopio óptico.



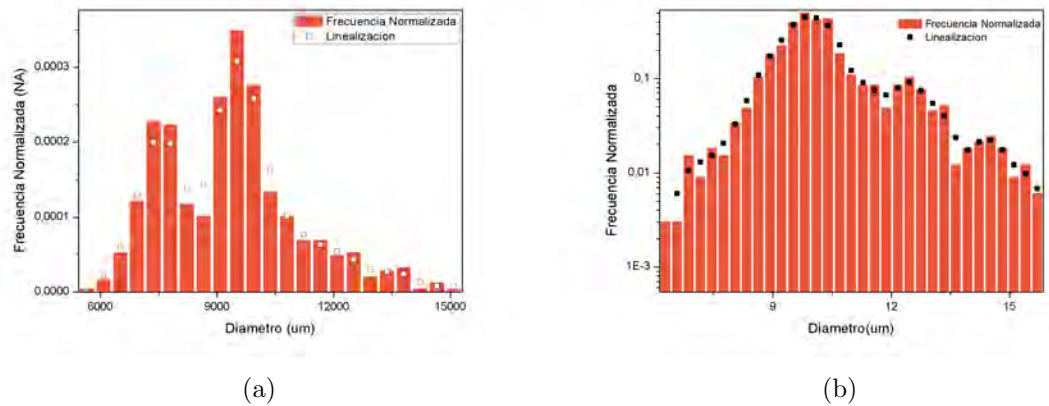
**Figura 4-6.:** Imágenes de los linfocitos de las muestras (a)  $E_1$  y (b)  $E_2$  vistas por un microscopio óptico con un objetivo de microscopio de 40x

En estas imágenes se puede observar que la población de linfocitos, resultado de la separación, es mayor en la muestra  $E_1$  que en la muestra  $E_2$ . Además, es posible diferenciar distintos tipos de células por su tamaño, pero no se tiene certeza de cuantas clases de células mononucleares hay. Por lo tanto, se miden los diámetros y se obtiene un histograma de ellos para cada una de las muestras. En las figuras 4-7 y 4-8 se observan las gráficas correspondientes a la distribución de frecuencias por tamaño del diámetro de  $E_1$  y  $E_2$  respectivamente, los puntos indican la linealización de los datos, esto permite determinar máximos locales sobre la tendencia y definir intervalos de confianza para analizar los datos de forma independiente.

## 4.2 Caracterización de Células Mononucleares en sangre periférica de pacientes con LLA3



**Figura 4-7.:** Histogramas de los diámetros de células mononucleares de la muestra  $E_1$  en (a) escala lineal y (b) en escala semi-logarítmica.



**Figura 4-8.:** Histogramas de los diámetros de células mononucleares de la muestra  $E_2$  en (a) escala lineal y (b) en escala semi-logarítmica.

De la tendencia vista en los histogramas, es apreciable que presenta un comportamiento multimodal; cada máximo de la linealización representa sub-grupo de la población, indicando que existen diferentes diámetros asociados a distintos tipos de células. Para estas muestras se determinan 5 máximos relacionados con: Linfocitos T, Linfocitos B, Monocitos, Blastos y Glóbulos Rojos. Aunque se esperaban 4 poblaciones, la separación de linfocitos quedó contaminada y hay residuos de glóbulos rojos, como consecuencia se considera una población más en el análisis.

Como es una población mixta, se determinan intervalos de confianza y en cada uno se obtiene el promedio de los diámetros de cada grupo, que se espera determine una familia específica de glóbulos blancos. En las tablas 4-4 y 4-5 se encuentran reportados los diámetros promedio para los grupos de cada población escogidos por los intervalos de confianza definidos por los máximos locales de la curva de linealización. Se observa que efectivamente hay cinco grupos en cada muestra, donde el Grupo A tiene la menor cuenta poblacional y el grupo B es el que tiene el mayor porcentaje

poblacional.

Grupo	Diámetro promedio ( $\mu m$ )	Mínimo ( $\mu m$ )	Máximo ( $\mu m$ )	Cuenta Poblacional
<b>A</b>	$7,34 \pm 0,49$	6.28	7.98	29
<b>B</b>	$9,76 \pm 0,68$	8.04	11.36	897
<b>C</b>	$12,37 \pm 0,59$	11.40	13.72	164
<b>D</b>	$14,27 \pm 0,29$	13.82	14.72	20
<b>E</b>	$15,21 \pm 0,35$	14.80	15.99	12

**Tabla 4-4.:** Promedio de diámetro de células por los cinco intervalos de confianza para la muestra  $E_1$

Grupo	Diámetro promedio ( $\mu m$ )	Mínimo ( $\mu m$ )	Máximo ( $\mu m$ )	Cuenta Poblacional
<b>A</b>	$7,17 \pm 0,46$	5.66	7.90	166
<b>B</b>	$9,35 \pm 0,67$	7.91	11.36	897
<b>C</b>	$11,66 \pm 0,49$	10.91	12.52	57
<b>D</b>	$13,25 \pm 0,42$	12.53	13.86	20
<b>E</b>	$14,88 \pm 0,51$	14.34	15.52	6

**Tabla 4-5.:** Promedio de diámetro de células por los cinco intervalos de confianza para la muestra  $E_2$

Comparando los diámetros promedio para las muestras sanas con las de las enfermas, se observa que, en todos, el diámetro de las enfermas es mayor, pero sigue conservando la tendencia de crecimiento de los grupos mononucleares; es decir, se puede identificar una población de glóbulos rojos asociada al grupo A por estar en el rango reportado. En cuando a los grupos B, C y D, los cuales tienen la mayor cuenta poblacional, se encuentran en el rango de linfocitos en reposo y activados. Como son las células que presentan mayor densidad poblacional tanto en la muestra como en la sangre periférica, en general se catalogan como linfocitos T y B. Las células del grupo E, pueden asociarse a monocitos por dos razones: Son las células más grandes y las que menor porcentaje poblacional presentan. Sin embargo, los mapas de fase nos brindarán información morfológica para hacer una distinción según su citoplasma y su núcleo.

En el estudio de LLA realizado por Mohapatra [2] se reportan tamaños de linfocitos sanos y enfermos. El diámetro de un linfocito enfermo es de  $(9,08 \pm 1,60)\mu m$ , un poco más grande que el tamaño de un linfocito sano que se encuentra en  $(8,44 \pm 0,43)\mu m$ , en promedio. Este es otro argumento para asociar los linfocitos al grupo B de cada población, ya que los valores promedio de diámetro coinciden con lo reportado en otras investigaciones [82]. Por lo tanto, además del

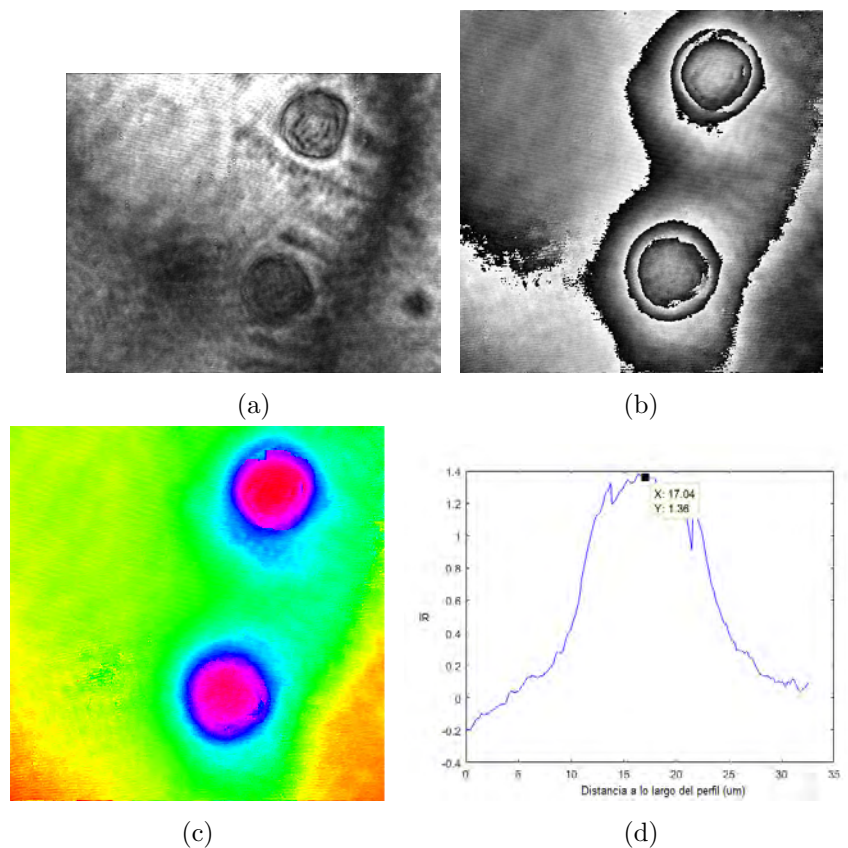
## 4.2 Caracterización de Células Mononucleares en sangre periférica de pacientes con LLA5

aumento de tamaño de linfocitos, las muestras enfermas presentan monocitos con menor tamaño que la sanas. En consecuencia, se puede afirmar que se tiene un parámetro de diferenciación entre los grupos de linfocitos sanos y los enfermos por su variación en tamaño.

### 4.2.2. Cálculo del Índice de Refracción de células enfermas

Las mismas muestras que se observaron en el microscopio óptico se registran con el DPM. Sobre una laminilla cobre objetos se deposita una porción de linfocitos que han sido diluidos en PBS. El sistema óptico permite enfocar en el sensor el plano objeto donde se ubica la muestra. Se registran varios hologramas de diferentes células aleatoriamente de las muestras  $E_1$  y  $E_2$  respectivamente.

Posteriormente, se reconstruyen los hologramas con el procedimiento descrito en el capítulo 2. En el que implementando el algoritmo de reconstrucción implementado para las células sanas. Entonces, se registran hologramas de 23 células de la muestra  $E_1$  y 18 de células de la muestra  $E_2$ . Para cada una, se hace la reconstrucción numérica, se obtiene el mapa de fase, se mide su tamaño y se calcula un índice de refracción promedio para tres medidas del máximo central de perfiles en el mapa de índice. Las imágenes de cada paso del proceso se observan en 4-9 .



**Figura 4-9.:** (a) Es la reconstrucción de amplitud de una célula de la muestra  $E_2$  y (b) es el mapa de fase envuelto, (c) el mapa de índice de refracción y (d) un perfil sobre el eje central de la célula superior

En los mapas de fase y en consecuencia en los mapas de índice de refracción, es posible observar la diferencia entre el núcleo y el citoplasma de la célula. Si se comparan las imágenes de las células sanas con las enfermas, además de un aumento de tamaño existe un aumento en el área del núcleo en relación con el área del citoplasma; lo que concuerda con estudios hechos de LLA por análisis de imagen en microscopía óptica [2].

Con los mapas de fase se mide el índice de refracción, trazando varios perfiles y calculando el promedio del máximo de dicho perfil en todas las células. En la tabla 4-6 se registran los promedios de tamaño e índice de refracción para células que se encuentran en los mismos grupos determinados por su diámetro en el microscopio óptico. En este caso se tienen cuatro grupos. La figura 4-10 se observan mapas de índice de refracción y un perfil de una célula representativa de cada grupo.

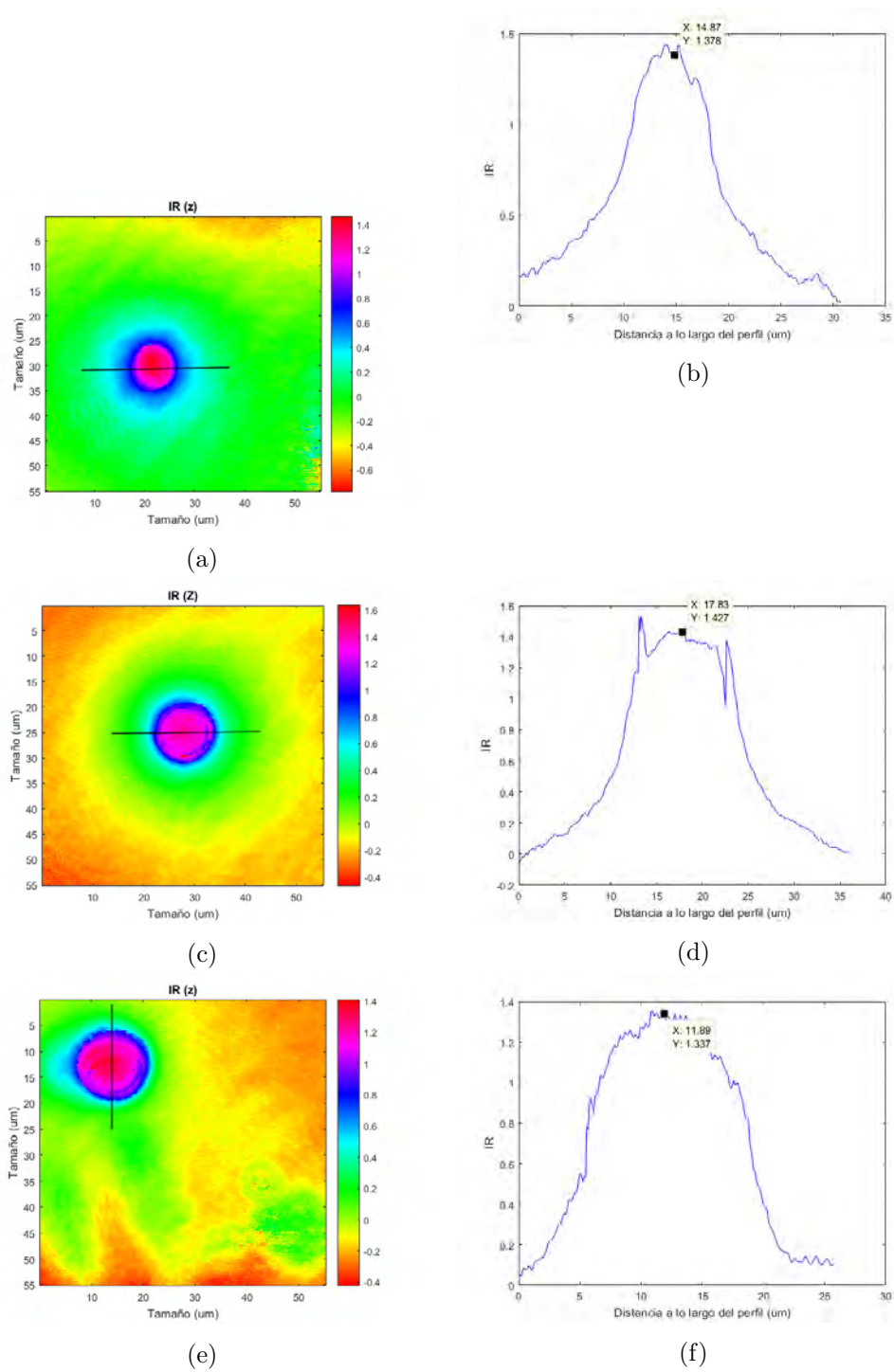
Grupo	Rango de tamaños ( $\mu m$ )	Índice de refracción Promedio
<b>B</b>	8,15 – 10,40	1,475 $\pm$ 0,229
<b>C</b>	10,61 – 13,16	1,449 $\pm$ 0,155
<b>D</b>	13,52 – 14,51	1,335 $\pm$ 0,152
<b>E</b>	14,97 – 17,39	1,362 $\pm$ 0,101

**Tabla 4-6.:** Índice de Refracción Promedio para los grupos de células enfermas para las muestras  $S_1$  y  $S_2$

Los datos indican que los índices de refracción de las células varían según el tamaño, como también se observó con las células sanas. Por lo tanto, cada tipo de célula mononuclear tiene un índice de refracción asociado que la identifica. Además, los valores de índice son considerablemente mayores en el caso de las enfermas al compararlas con las sanas, esto indica que el índice de refracción, además del tamaño, también es un parámetro de diferenciación entre linfocitos sanos y linfocitos enfermos.

Con los datos obtenidos implementando el DMP para caracterizar sangre periférica, se observa que las células mononucleares presentan diferencias en su composición y como consecuencia en su índice de refracción. Por lo tanto, existen diferencias entre células mononucleares de un mismo donante y además es considerable la discrepancia entre los índices de refracción de células sanas y células enfermas. De este modo, se puede afirmar que la técnica de cuantificación de fase desarrollada en el laboratorio es capaz establecer diferencias entre células sanas y no sanas. Sin embargo, para que el proceso tenga validez se hace necesario un estudio más amplio que incluya un mayor número de pacientes y donantes sanos para comprobar la reproducibilidad de la técnica.

## 4.2 Caracterización de Células Mononucleares en sangre periférica de pacientes con LLA7



**Figura 4-10.:** (a), (c) y (e) son mapas de índice de refracción de células de pacientes con LLA para las tres clases de células presentes en las muestras  $S_1$  y  $S_2$ . (b) (d) y (f) son sus respectivos perfiles sobre la línea indicada

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1. Conclusiones

#### Respecto al diseño del DPM

Los parámetros ópticos establecidos en el diseño del DPM descritos en la sección 3,1, permitieron el correcto registro de los hologramas con la magnificación deseada y con la resolución necesaria para el tipo y tamaño de objeto a analizar, esto se puede evidenciar por los mapas de fase e índices de refracción que se pudieron obtener a partir de los registros realizados.

Basados en los principios de diseño óptico para un microscopio y en los límites de resolución dados por el muestreo del campo óptico complejo por un sensor, se establecieron los parámetros para generar interferencia entre dos de los órdenes de difracción generados por una rejilla en transmisión, de un haz que porta información de amplitud y fase de un objeto traslúcido en estudio. Esto conlleva a que la frecuencia del patrón de franjas de interferencia sea determinado por el periodo de la rejilla, la longitud de onda utilizada y los parámetros de los sistemas formadores de imagen, lo cual tiene como positivo el hecho de tener un control sobre la frecuencia y orientación de las franjas dependiendo de los detalles del objeto a estudiar.

#### Respecto a la implementación del DPM

Los parámetros de diseño implementados para la construcción del DPM por medio de los cuales se logró una magnificación total de 100 entre el microscopio y el sistema 4f, mostraron ser los pertinentes para el tamaño de las muestras a estudiar. De la misma forma, se logró un excelente acople entre el sistema utilizado para generar los dos haces a interferir (rejilla de difracción y filtrado de uno de los órdenes) y el sistema formador de imágenes, esto se puede evidenciar por dos caminos: primero porque la frecuencia de franjas obtenida es suficiente para el correcto registro de los hologramas, cumpliendo el principio de Nyquist y segundo porque el contraste de las mismas es óptimo no solamente para su visualización, sino también para la obtención de la información de fase deseada. Con el diseño realizado del DMP se logra una resolución lateral de  $0,87\mu m$ , lo cual es óptimo para los propósitos de esta tesis en cuanto a la medición de tamaños y tipo de muestras a estudiar. El DPM es una configuración altamente estable mecánicamente, ya que cualquier perturbación mecánica afecta por igual a los haces de referencia y objeto, eso se puede evidenciar por la estabilidad temporal de las franjas, los registros realizados y la información de fase que fue posible extraer de ellos.

Al igual que en cualquier otro microscopio, se evidencia la dificultad para el enfoque de las muestras traslúcidas, no solo porque afectan mínimamente la amplitud del campo óptico con el que son iluminadas, sino también por los límites ópticos para definir el plano de mejor enfoque, lo que

limita la reconstrucción plano-imagen, por esta razón, en algunas ocasiones también se propaga el campo por medio del algoritmo del espectro angular.

La estrategia para filtrar la información de las altas frecuencias debidas al objeto y convertir el orden +1 en haz de referencia por medio de una micro lente a cambio de un pinhole, fue efectiva, esto se evidencia porque la información de fase reconstruida contiene un mínimo de ruido.

### **Respecto a las muestras de sangre periférica**

El hecho de contar con muestras de sangre periférica de pacientes sanos y enfermos fue una ventaja enorme, ya que esto facilitó el establecimiento de parámetros de comparación entre sus respectivas células. Para la identificación de las células blásticas en cada población, fue necesario determinar un parámetro de diferenciación. Para separar las células linfocíticas en las poblaciones sanas y enfermas, para su posterior caracterización, se siguieron los protocolos ya establecidos, después de este proceso se observó una pequeña contaminación de glóbulos rojos, normal en este tipo de experimentaciones, lo cual no impidió el correcto análisis de las muestras aisladas. Las muestras fueron conservadas a  $37^{\circ}C$  lo que permitió su manipulación y observación en días diferentes, facilitando su estudio.

### **Respecto a la diferenciación de blastos por DPM**

Tomando para análisis las muestras de sangre de dos pacientes sanos y dos pacientes enfermos, haciendo la respectiva separación de los linfocitos y luego de obtener de ellos, los mapas de amplitud y diferencia de fase por la técnica del DPM y realizar la medición de sus tamaños, se pueden identificar claramente cinco rangos de tamaños en las células enfermas y cuatro rangos en las células sanas, por microscopía óptica con una magnificación de  $40x$ . Por DPM se registra una menor muestra de células enfermas y sanas obteniendo tres rangos de tamaño para células sanas y cuatro rangos para células enfermas, pero siguiendo el mismo comportamiento que lo observado por microscopía óptica. Esto nos da indicios de la efectividad de la técnica del DPM para la identificación morfométrica de los blastos estudiados. De acuerdo con lo anterior y comparando con valores de tamaños previamente reportados [2], se puede asumir que:

Para las células sanas que están en el rango ( $5,45\mu m - 6,08\mu m$ ) son glóbulos rojos y corresponden al 8,5 % de la población total estudiada, los que están en el rango ( $7,62\mu m - 7,49\mu m$ ) son linfocitos T y B y corresponden al 57,4 % de la población total, los que están en el rango ( $9,89\mu m - 12,63\mu m$ ) son linfocitos activos y corresponden al 34,1 % de la población total. Lo anterior evidencia la efectividad de la técnica en cuanto al establecimiento de la existencia de linfocitos T y B, con contaminación de glóbulos rojos en la sangre periférica de los pacientes sanos. No fue posible cuantificar tamaño monocitos por DPM, pero en el estudio por microscopía óptica se comprueba la presencia de esta población con un diámetro promedio de ( $17,57 \pm 1,84$ ).

Para las células enfermas se encuentran 4 rangos con el DPM. Los que están en el rango ( $8,15\mu m - 14,51\mu m$ ), lo que corresponde a los grupos B,C y D, se asocian a linfoblastos, es decir, linfocitos inmaduros y corresponden a 88 % de la población. Las células que están en el rango de ( $14,97\mu m - 17,39\mu m$ ), se asocian a monocitos, no se registra contaminación de glóbulos rojos.

Respecto a las diferencias de fase y como consecuencia a los valores de índice de refracción medidos, se observa que cada tipo de célula mononuclear (Linfocitos T, B y monocitos), tiene un índice de refracción absoluto diferente, permitiendo con esto que podamos proponer al índice de refracción como un parámetro diferenciador entre ellas. Las células sanas presentan en promedio índices de refracción un 9% más bajo que el índice de refracción de las células enfermas.

Se concluye entonces que el microscopio de cuantificación de fase al permitir la medición de tamaño e índice de refracción de células de sangre periférica de personas sanas y pacientes con LLA, se configura como una herramienta aplicable y útil para diferenciar células sanas de enfermas.

## 5.2. Recomendaciones y Trabajo a Futuro

Tomando en cuenta los resultados y las conclusiones de la presente tesis, y con el objetivo de seguir perfeccionando la técnica, se realizan las siguientes recomendaciones:

Aumentar el tamaño de la muestra de donantes sanos y enfermos para el estudio de linfocitos por DPM para hacer un análisis estadístico lo suficientemente amplio que aumente el grado de confianza a los resultados reportados; tener una mayor población de donantes sanos y enfermos con diferentes líneas de sangre y en diferentes estadios de enfermedad da mayor grado de confianza a los resultados y permite una mayor generalización de los parámetros de diferenciación.

Como trabajo a futuro está el proyecto que se ha propuesto con el Instituto Nacional de Cancerología a Inversión Nación, para financiar la investigación en una población más amplia de donantes. La obtención, diferenciación, conservación y desecho de muestras requiere de protocolos y condiciones éticas que un trabajo en colaboración facilita el proceso. El objetivo de la colaboración es establecer un parámetro de diagnóstico que pueda ser reproducible en centros de salud del país para la detección temprana de leucemia.

Se contempla también la posibilidad de extender el análisis a las otras líneas de leucemia para encontrar similitudes o parámetros de diferenciación entre ellas, estudiar las células en diferentes estados de maduración de la enfermedad y en diferentes etapas de tratamiento del paciente para observar la evolución en el tratamiento.

El microscopio de fase por difracción ha mostrado ser un instrumento útil para el estudio de objetos traslucidos y biológicos de dimensiones en el orden de las décimas de micrómetro y su versatilidad y estabilidad mecánica, además de no requerir propagación en la reconstrucción digital le hace aplicable al estudio de otro tipo de objetos con estas dimensiones.

## 5.3. Productos

La implementación de la técnica de esta tesis ha sido presentada en:

- **Evento:** XV Encuentro Nacional de Óptica  
**Lugar:** Bucaramanga, Colombia.  
**Fecha:** 20-24 de Noviembre 2017.  
**Trabajo:** Microscopía de Fase por Difracción para el estudio de sangre periférica de pacientes con Leucemia Linfocítica Aguda

**Modalidad:** Oral

**Los resultados de esta tesis están sometidos para presentarse en un congreso internacional:**

- **Evento:** Photonics Europe  
**Lugar:** Estrasburgo, Francia.  
**Fecha:** 22-26 de Abril de 2018.  
**Trabajo:** Recognition of Blastic Cells in Human Peripheral Blood by Diffraction Phase Microscopy.  
**Modalidad:** Poster  
**Proceeding:** *Recognition of blastic cells in human peripheral blood by diffraction phase microscopy, Proceedings Volume 10677 doi:10.1117/12.2307052*

**Además de los eventos internacionales, se realizó la siguiente estancia internacional:**

- **Universidad:** Instituto Beckman, Universidad de Illinois.  
**Lugar:** Urbana Champaign, IL. Estados Unidos.  
**Grupo de investigación:** Quantitative Phase Imaging.  
**Director:** Gabriel Popescu.  
**Fecha:** 5 de Septiembre al 7 de Octubre 2016.  
**Actividades realizadas:** Trabajo teórico-experimental para adquirir conocimientos acerca del Microscopio de Fase por Difracción.

**Actualmente se ha propuesto un proyecto de investigación en colaboración**

- **Institución:** Instituto Nacional de Cancerología, en colaboración con  
**Grupo de investigación:** Grupo de Óptica Aplicada (GOA)  
**Lugar:** Bogotá, Colombia.  
**Investigador Principal** Orlando Bonell Patiño Escobar  
**Título del Proyecto:** Microscopía de Fase por Difracción para la caracterización de blastos en sangre periférica como método de diagnóstico de leucemia linfoblástica.

# Apéndices

## A. Anexo A: Protocolo Separación Linfocitos

A continuación, se plantea un procedimiento para separar *in vivo*, linfocitos de sangre periférica. Con base en las recomendaciones del protocolo sugerido por el proveedor de Ficoll [85], se describe un método de separación específico para las condiciones experimentales dadas en el laboratorio de Biofísica de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá.

### Materiales

Para separar linfocitos en 2ml de sangre centrifugando en dos tipos de tubo:

1. Ficoll GE Healthcare: Cada 100ml contiene Ficoll PM400, 5, 7gr, Diatrizoato de Sodio, 9, 0gr, con Edetate Calcio Disodio en agua purificada U.S.P. (4ml)
2. Tubos de ensayo de dos tipos: con base cónica Falcon 15ml (Tipo A) y con base esférica (Tipo B), ver figuraA-1.
3. Pipetas
4. Tubos de centrifugado
5. Centrifuga
6. Solución salina para balanceo de muestras PBS 1X (2ml)
7. Sangre periférica (2ml): La muestra debe anticoagularse y mantenerse entre 18 y 20°C durante el procedimiento para conservar las propiedades de las células. La sangre se recoge en tubo BD Vacutainer Citrato de Sodio (Na).

Se realiza la purificación de linfocitos en dos tubos con diferente base, una cónica y otra esférica, esto con el propósito de probar si la forma del tubo de ensayo usado en la centrifugación influye en la separación.

### Preparación de la muestra

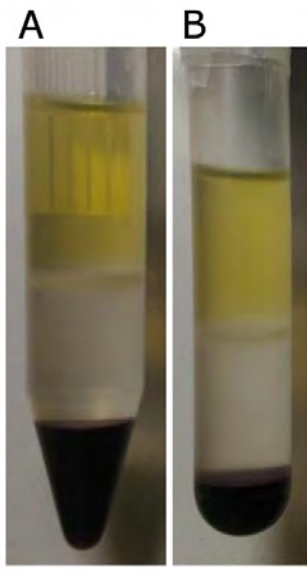
Se sirven 4ml de sangre en un tubo de ensayo (no es relevante su forma) y con una pipeta previamente esterilizada se sirven 4ml de PBS y se mezcla por inmersión, como consecuencia la densidad de sangre disminuye y el volumen de la solución aumenta.

## Montaje de la muestra

Según el protocolo dado por el fabricante, se destapa el frasco de Ficoll quitando la cobertura metálica sin romperla. Se pone boca abajo y con una jeringa sin aire en su interior se extraen 4ml de la sustancia. En cada tipo de tubo (A y B) se depositan 2ml de Ficoll. Con una pipeta diferente se depositan 2ml de la solución de sangre en el tubo tipo A y otros 2ml en el tubo tipo B. Se debe depositar sobre la pared interna del tubo inclinado, de tal forma que cuando la sangre haga contacto con el Ficoll se minimice su mezcla. Se debe dejar reposar la solución de tal forma que la interface entre el Ficoll y la sangre se estabilice antes de centrifugar. Los tubos con la solución (sangre + Ficoll) se tapan y se masan. Debe verificarse que la masa de todos los tubos (El tipo A y tipo B) sea la misma para equilibrar el sistema en la centrifuga y disminuir las fuentes de error.

## Separación

En los tubos de centrifugado se colocan dos tubos tipo A de la misma masa en lados opuestos y dos tubos tipo B en lados opuestos para equilibrar las fuerzas. Los dos tubos que no tienen preparación se llenan con hipoclorito. La centrífuga se debe programar para generar 400 gravedades, que equivalen a 1519 revoluciones por minuto (RPM) según el cálculo dado por fabricante (Referencia Centrífuga). En esta primera experiencia se estableció experimentalmente un valor de 1580RPM durante 30' (manteniendo el rango del 10% de discrepancia). En la figura **A-1** se observa el resultado de la separación en los dos tubos, en ella es posible distinguir la banda de linfocitos que ha sido purificada. En orden ascendente se encuentran los glóbulos rojos, el Ficoll, la banda de linfocitos y el plasma (suero), separados por densidades. La banda purificada de linfocitos es distinguible en los dos tipos de tubo, esto implica que, para cualquiera de las dos formas de la base, el proceso es efectivo.



**Figura A-1.:** Separación de linfocitos de glóbulos rojos por centrifugado en dos tubos de precipitado diferentes.

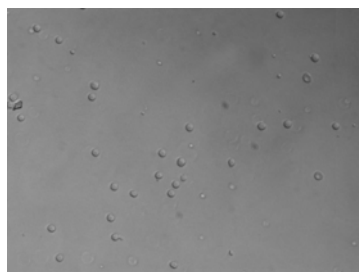
## Separación y Lavado

De esta primera separación, se recoge el suero de la parte superior de cada tubo con una pipeta esterilizada diferente, succionando en círculos, pero sin tocar la banda de linfocitos. Posteriormente, se recoge la banda de linfocitos con otra pipeta de la misma forma pero recogiendo un poco de Ficoll de la siguiente banda y se almacena en otros tubos de ensayo. Después de la separación se realiza el lavado, es decir, volver a centrifugar para decantar los linfocitos y retirar el Ficoll restante. Para ello, a los linfocitos se les agrega un volumen de medio de cultivo estéril (RPMI), considerablemente más alto que el de la banda para asegurar la separación entre estas y el Ficoll. En este caso, a la banda que se recogió del tubo de base esférica se le agregó unos mililitros de antibiótico para evitar que la muestra se contamine con bacterias porque la esterilización del tubo no estaba asegurada. Se procede a centrifugar un tubo con glóbulos rojos para lavarlo y los tubos con las dos bandas de linfocitos. La centrifugación se hizo por 10' a 1000 RPM, pero fue necesario repetirla bajo las mismas condiciones. Como resultado, las células linfocíticas se decantan y en la parte superior de los tubos se encuentra el sobre lavado; plaquetas y algunas células linfocíticas que no decantaron con el Ficoll restante.

Se recomienda volver a lavar, es decir, extraer las células decantadas, volverlas a mezclar con más medio de cultivo y centrifugar por 10' más a 1020RPM. Es último paso no se realizó en la primera prueba.

## Análisis de las muestras

Se observó en un microscopio óptico una muestra de sangre diluida, una de sobre lavado y una de los linfocitos purificados a diferentes densidades. Las imágenes de la figura **A-2** nos llevan a concluir que la purificación en los dos sistemas (los dos diferentes tubos) funciona porque es posible observar linfocitos puros en la muestra. En el sobre lavado se encuentran plaquetas y uno que otro glóbulo blanco, por lo tanto, es necesario centrifugar más para aumentar la pureza.



**Figura A-2.:** Linfocitos purificados vistos por microscopio óptico a una magnificación de 40x

En síntesis, los dos tipos de tubo de ensayo son útiles para realizar el proceso de purificación de linfocitos. Los parámetros dados a la centrifuga para la separación son apropiados, pero es necesario aumentar el tiempo en la centrífuga para el lavado. Sin embargo, la metodología implementada en la prueba funciona para diferenciar glóbulos rojos y células linfocíticas, que es el objetivo principal para obtener las muestras de prueba en el marco de estudio de sangre periférica que se esta desarrollando.



## B. Anexo B: Concepto Comité de Ética



COMITÉ DE ÉTICA FACULTAD DE CIENCIAS

Bogotá, septiembre 13 de 2016

Profesor  
**Freddy Alberto Monroy Ramírez**  
 Departamento de Física

Respetado Profesor:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 13 de septiembre de 2016 (Acta 16), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto **cumple** con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

**Proyecto:** Caracterización de blastos en sangre periférica humana por medio de difracción de fase.

**Responsables:** Caori Alejandra Organista (Tesis de Maestría en Ciencias Física) y **Freddy Alberto Monroy Ramírez** (Director de Tesis, Grupo de Óptica Aplicada).

**Observaciones:**

En esta investigación se emplearán muestras de sangre periférica de pacientes con Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) y blastos de médula ósea. Estas muestras serán preparadas como extendidos en placa, obtenidas y manipuladas bajo estrictos protocolos de bioseguridad en el Laboratorio de Hematología del Instituto Nacional de Cancerología, institución que aplicaría el Consentimiento Informado para la obtención de las muestras biológicas.

Los aspectos de Propiedad Intelectual se establecerán según los lineamientos del Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia.

**Concepto:** Avalado.

**LUIS FERNANDO OSPINA G.**  
 Coordinador Comité de Ética



## C. Anexo C: Certificado Pasantía



Prof. Gabriel Popescu  
Department of Electrical and Computer Engineering  
Beckman Institute  
405 North Mathews Ave., Urbana, IL 61801



Phone: (217) 333-4840  
Fax: (217) 244-1995  
Email: [gpopescu@illinois.edu](mailto:gpopescu@illinois.edu)  
QLI Lab: <http://light.ecs.uiuc.edu/>

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Bogotá, Colombia

October 14, 2016

To whom may concern,

Through this letter I want to confirm that Miss CAORI ALEJANDRA ORGANISTA CASTELBLANCO, joined the Quantitative Light Imaging group at the Beckman Institute for Advanced Science and Technology at the University of Illinois at Urbana-Champaign from September 5th to October 7th, 2016.

During her visit, she accomplished her objectives of learning about diffraction phase microscopy, which will help her continue her thesis project in Colombia.

If you need more information, please do not hesitate to contact me.

Sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "G. Popescu".

Gabriel Popescu  
Associate Professor of Electrical Engineering and Bioengineering

## Bibliografía

- [1] American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2017. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>. Último Acceso: 2017-10-14.
- [2] Subrajeet Mohapatra, Dipti Patra, and Sanghamitra Satpathy. An ensemble classifier system for early diagnosis of acute lymphoblastic leukemia in blood microscopic images. *Neural Computing and Applications*, 24(7-8):1887–1904, 2014.
- [3] Basanta Bhaduri, Chris Edwards, Hoa Pham, Renjie Zhou, Tan H Nguyen, Lynford L Goddard, and Gabriel Popescu. Diffraction phase microscopy: principles and applications in materials and life sciences. *Adv. Opt. Photon.*, 6(1):57–119, mar 2014.
- [4] Ali H. Mokdad, Laura Dwyer-Lindgren, Christina Fitzmaurice, Rebecca W. Stubbs, Amelia Bertozzi-Villa, Chloe Morozoff, Raghid Charara, Christine Allen, Mohsen Naghavi, and Christopher J. L. Murray. Trends and Patterns of Disparities in Cancer Mortality Among US Counties, 1980-2014. *Jama*, 317(4):388, 2017.
- [5] R Garand, K Beldjord, H Cavé, C Fossat, I Arnoux, V Asnafi, Y Bertrand, M-L Boulland, C Brouzes, E Clappier, E Delabesse, T Fest, F Garnache-Ottou, F Huguet, M-C Jacob, E Kuhllein, S Marty-Grès, a Plesa, N Robillard, M Roussel, J Tkaczuk, H Dombret, E Macintyre, N Ifrah, M C Béné, and a Baruchel. Flow cytometry and IG/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. *Leukemia*, (October 2012):370–376, 2012.
- [6] Hoa V. Pham, Christopher Edwards, Lynford L. Goddard, and Gabriel Popescu. Fast phase reconstruction in white light diffraction phase microscopy. *Applied Optics*, 52(1):A97, 2013.
- [7] J J M van Dongen and a Orfao. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia*, 26(9):1899–1907, 2012.
- [8] T Kalina, J Flores-Montero, V H J van der Velden, M Martin-Ayuso, S Böttcher, M Ritgen, J Almeida, L Lhermitte, V Asnafi, a Mendonça, R de Tute, M Cullen, L Sedek, M B Vidriales, J J Pérez, J G te Marvelde, E Mejstrikova, O Hrusak, T Szczepański, J J M van Dongen, and a Orfao. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, 26(9):1986–2010, 2012.

- 
- [9] Gabriel Popescu, Takahiro Ikeda, Catherine A Best, Kamran Badizadegan, Ramachandra R Dasari, and Michael S Feld. Erythrocyte structure and dynamics quantified by Hilbert phase microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 10(6):60503, 2005.
- [10] Chulmin Joo and Johannes F de Boer. Spectral-domain optical coherence reflectometric sensor for highly sensitive molecular detection. *Opt. Lett.*, 32(16):2426–2428, 2007.
- [11] David J Stephens and Victoria J Allan. Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science*, 300(5616):82–86, apr 2003.
- [12] Renato Bassan and Dieter Hoelzer. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 29(5):532–43, feb 2011.
- [13] George S. Cembrowski and Gwen Clarke. Quality Control of Automated Cell Counters. *Clin. Lab. Med.*, 35(1):59–71, 2015.
- [14] Devon S. Chabot-Richards and Tracy I. George. White Blood Cell Counts. *Clin. Lab. Med.*, 35(1):11–24, 2015.
- [15] Basanta Bhaduri, Hoa Pham, Mustafa Mir, and Gabriel Popescu. Diffraction phase microscopy with white light. *Opt. Lett.*, 37(6):1094–1096, mar 2012.
- [16] R Barer. Interference Microscopy and Mass Determination. *Nature*, 169(4296):366–367, mar 1952.
- [17] Taewoo Kim, Renjie Zhou, Lynford L. Goddard, and Gabriel Popescu. Solving inverse scattering problems in biological samples by quantitative phase imaging. *Laser & Photonics Reviews*, 27(1):n/a–n/a, 2015.
- [18] Claire L Curl, Catherine J Bellair, Peter J Harris, Brendan E Allman, Ann Roberts, Keith A Nugent, and Lea MD Delbridge. Quantitative phase microscopy: A new tool for investigating the structure and function of unstained live cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31(12):896–901, 2004.
- [19] F. Zernike. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II. *Physica*, 9(10):974–986, 1942.
- [20] F. Zernike. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II. *Physica*, 9(10):974–986, 1942.
- [21] D. Gabor. Microscopy by Reconstructed Wave-Fronts. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 197(1051):454–487, 1949.
- [22] A. Barty, K. A. Nugent, D. Paganin, and A. Roberts. Quantitative optical phase microscopy. *Opt. Lett.*, 23(11):817, 1998.
- [23] H. Kadono, M. Ogusu, and S. Toyooka. Phase shifting common path interferometer using a liquid-crystal phase modulator. *Opt. Commun.*, 110(3-4):391–400, 1994.

- [24] Pierre Marquet, Christian Depeursinge, and Pierre J Magistretti. Review of quantitative phase-digital holographic microscopy: promising novel imaging technique to resolve neuronal network activity and identify cellular biomarkers of psychiatric disorders. *Neurophotonics*, 1(2):20901, 2014.
- [25] T Kim, R Zhou, and L L Goddard. Breakthroughs in Photonics 2013: Quantitative Phase Imaging: Metrology Meets Biology. *Photonics J.*, 6(2), 2014.
- [26] Gabriel Popescu. *Quantitative Phase Imaging of Cells and Tissues*. 2011.
- [27] G Popescu, T Ikeda, R Dasari, and M Feld. Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics. *Optics letters*, 31(6):775–777, 2006.
- [28] D Zicha and G A Dunn. An image processing system for cell behaviour studies in subconfluent cultures. *Journal of Microscopy*, 179(1):11–21, 1995.
- [29] Mustafa Mir, Krishnarao Tangella, and Gabriel Popescu. Blood testing at the single cell level using quantitative phase and amplitude microscopy. *Biomedical Optics Express*, 2(12):3259, 2011.
- [30] Takahiro Ikeda, Gabriel Popescu, Ramachandra R Dasari, and Michael S Feld. Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent systems. *Opt. Lett.*, 30(10):1165–1167, may 2005.
- [31] Zahra El-Schich, Anna Mölder, Helena Tassidis, Pirkko Härkönen, Maria Falck Miniotis, and Anette Gjørloff Wingren. Induction of morphological changes in death-induced cancer cells monitored by holographic microscopy. *Journal of structural biology*, 189(3):207–212, 2015.
- [32] Zahra El-Schich, Emmy Nilsson, Anna S Gerdtsson, Christer Wingren, and Anette Gjørloff Wingren. Interfacing antibody-based microarrays and digital holography enables label-free detection for loss of cell volume. *Future science OA*, 1(3), 2015.
- [33] Ru Wang, Zhuo Wang, Larry Millet, Martha U Gillette, A J Levine, and Gabriel Popescu. Dispersion-relation phase spectroscopy of intracellular transport. *Opt. Express*, 19(21):20571–20579, oct 2011.
- [34] National Cancer Institute: Cancer Statistics. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>. Último Acceso: 2017-10-28.
- [35] American Cancer Society: How is Acute Lymphocytic Leukemia Diagnosed. [http://www.cancer.gov.co/cancer\\_en\\_cifras](http://www.cancer.gov.co/cancer_en_cifras). Último Acceso: 2017-10-31.
- [36] J. M. Bennett, D. Catovsky, Marie???Theregse ???T Daniel, G. Flandrin, D. A G Galton, H. R. Gralnick, and C. Sultan. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French???American???British (FAB) Co???operative Group. *British Journal of Haematology*, 33(4):451–458, 1976.
- [37] Pha H A Hoffbrand, A.V. and Moss. *Essencial Haematology*. 6th edition, 2011.

- [38] American Cancer Society: How is Acute Lymphocytic Leukemia Diagnosed. <https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html>. Último Acceso: 2017-10-28.
- [39] Fabio Scotti. Automatic morphological analysis for acute leukemia identification in peripheral blood microscope images. *CIMSA. 2005 IEEE Int. Conf. Comput. Intell. Meas. Syst. Appl. 2005.*, (July):96–101, 2005.
- [40] Ruggero Donida Labati, Vincenzo Piuri, and Fabio Scotti. ALL-IDB : The acute lymphoblastic leukemia image database for image processing. 2011.
- [41] Tomasz Markiewicz, S. Osowski, B. Marianska, and L. Moszczynski. Automatic recognition of the blood cells of myelogenous leukemia using SVM. *Proceedings. 2005 IEEE Int. Jt. Conf. Neural Networks, 2005.*, 4:2496–2501, 2005.
- [42] Nurul Hazwani, Abd Halim, Mohd Yusoff Mashor, and Rosline Hassan. Automatic Blasts Counting for Acute Leukemia Based on Blood. *Int. J. Res. Rev. Comput. Sci.*, 2(4):971–976, 2011.
- [43] Ulf Schnars, Claas Falldorf, John Watson, and Werner Jüptner. *Digital Holography*, pages 39–68. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015.
- [44] J. W. Goodman. Digital image formation from electronically detected holograms. *Applied Physics Letters*, 11(3):77, 1967.
- [45] Mitsuo Takeda, Hideki Ina, and Seiji Kobayashi. Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computer-based topography and interferometry. *J. Opt. Soc. Am.*, 72(1):156–160, 1982.
- [46] Etienne Cuche, Pierre Marquet, and Christian Depeursinge. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. *Appl. Opt.*, 38(34):6994–7001, 1999.
- [47] Basanta Bhaduri and Gabriel Popescu. Derivative method for phase retrieval in off-axis quantitative phase imaging. *Opt. Lett.*, 37(11):1868–1870, jun 2012.
- [48] Marcela Duarte. *Cuantificación del índice de refracción de micro objetos utilizando corrimientos de fase digital en Microscopía Holográfica Digital en línea*. PhD thesis, 2017.
- [49] Gabriel Popescu, Youngkeun Park, Niyom Lue, Catherine Best-Popescu, Lauren Deflores, Ramachandra R Dasari, Michael S Feld, and Kamran Badizadegan. Optical imaging of cell mass and growth dynamics. *American journal of physiology. Cell physiology*, 295(2):C538–C544, 2008.
- [50] Y Kim, Hyoeun Shim, Kyoohyun Kim, Hj Park, and Jh Heo. Common-path diffraction optical tomography for investigation of three-dimensional structures and dynamics of biological cells. *Opt. ...*, 22(9):228–232, 2014.

- 
- [51] YongKeun Park, Gabriel Popescu, Takahiro Ikeda, Kamran Badizadegan, Ramachandra R. Dasari, and Michael S. Feld. Diffraction phase microscopy. *Biomed. Opt.*, 32(7):811–813, 2006.
- [52] Mustafa Mir, Zhuo Wang, Krishnarao Tangella, and Gabriel Popescu. Diffraction Phase Cytometry: blood on a CD-ROM. *Opt. Express*, 17(4):2579–2585, 2009.
- [53] Chris Edwards, Steven J. McKeown, Jerry Zhou, Gabriel Popescu, and Lynford L. Goddard. In situ measurements of the axial expansion of palladium microdisks during hydrogen exposure using diffraction phase microscopy. *Opt. Mater. Express*, 4(12):2559, 2014.
- [54] Shamira Sridharan Hassaan Majeed Freddy Monroy Gabriel Popescu Silvia Ceballos, Mikhail E. Kandel. Active intracellular transport in metastatic cells studied by spatial light interference microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 20:20 – 20 – 6, 2015.
- [55] Yongjin Sung, Wonshik Choi, Christopher Fang-Yen, Kamran Badizadegan, Ramachandra R Dasari, and Michael S Feld. Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging. *Optics express*, 17(1):266–277, 2009.
- [56] Wonshik Choi, Christopher Fang-Yen, Kamran Badizadegan, Seungeun Oh, Niyom Lue, Ramachandra R Dasari, and Michael S Feld. Tomographic phase microscopy. *Nature methods*, 4(9):717–719, 2007.
- [57] Basanta Bhaduri, Krishnarao Tangella, and Gabriel Popescu. Fourier phase microscopy with white light. *Biomed. Opt. Express*, 4(8):1434–1441, 2013.
- [58] Chris Edwards, Amir Arbabi, Gabriel Popescu, and Lynford L Goddard. Optically monitoring and controlling nanoscale topography during semiconductor etching. *Light: Science & Applications*, 1(9):e30, 2012.
- [59] Gabriel Popescu, Lauren P Deflores, Joshua C Vaughan, Kamran Badizadegan, Hidenao Iwai, Ramachandra R Dasari, and Michael S Feld. Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics. *Optics letters*, 29(21):2503–2505, 2004.
- [60] Hoa Pham, Huafeng Ding, Nahil Sobh, Minh Do, Sanjay Patel, and Gabriel Popescu. Off-axis quantitative phase imaging processing using CUDA: toward real-time applications. *Biomedical optics express*, 2(7):1781–1793, 2011.
- [61] David E. Wolf. The Optics of Microscope Image Formation. 72:11–42, 2007.
- [62] Greenfield Sluder and Joshua J. Nordberg. Microscope basics. *Methods in Cell Biology*, 114:1 – 10, 2013. Digital Microscopy.
- [63] Max Born and Emil Wolf. *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*. Elsevier, 2013.
- [64] H. Nyquist. Certain Topics in Telegraph Transmission Theory. *Trans. Am. Inst. Electr. Eng.*, 47(2):617–644, 1928.

- [65] Edmund Optics 110 grooves/mm, 25mm sq, transmission grating beamsplitter. <https://www.edmundoptics.com/optics/defense-optics/cots-testing/3-x-3-positive-1951-usaf-resolution-targethttps://www.edmundoptics.com/optics/gratings/110-groovesmm-25mm-sq-transmission-grating-beamsplitter>.  
Accedido: 2017-10-14.
- [66] Edmund Optics 0.35mm dia, 670-1550nm, 0.0mm wd, uncoated, grin lens. <https://www.edmundoptics.com/optics/optical-lenses/aspheric-lenses/0.35mm-dia-670-1550nm-0.0mm-wd-uncoated-grin-lens>. Accedido: 2017-10-14.
- [67] Gabriel Popescu, YoungKeun Park, Wonshik Choi, Ramachandra R Dasari, Michael S Feld, and Kamran Badizadegan. Imaging red blood cell dynamics by quantitative phase microscopy. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 41(1):10–16, 2008.
- [68] Ichirou Yamaguchi, Jun-ichi Kato, Sohgo Ohta, and Jun Mizuno. Image formation in phase-shifting digital holography and applications to microscopy. *Applied Optics*, 40(34):6177–6186, 2001.
- [69] Pascal Picart and Julien Leval. General theoretical formulation of image formation in digital fresnel holography. *JOSA A*, 25(7):1744–1761, 2008.
- [70] Myung K. Kim. Principles and techniques of digital holographic microscopy. *SPIE Reviews*, 1:1 – 1 – 51, 2010.
- [71] Basanta Bhaduri and Gabriel Popescu. Derivative method for phase retrieval in off-axis quantitative phase imaging. *Opt. Lett.*, 37(11):1868–1870, jun 2012.
- [72] Takahiro Ikeda, Gabriel Popescu, Ramachandra R Dasari, and Michael S Feld. Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent systems. *Opt. Lett.*, 30(10):1165–1167, may 2005.
- [73] Myung K. Kim, Lingfeng Yu, and Christopher J. Mann. Interference techniques in digital holography. *J. Opt. A Pure Appl. Opt.*, 8(7), 2006.
- [74] Joseph W. Goodman, editor. *Introduction to Fourier Optics*. Stanford University, The McGraw-Hill Companies, INC., 1996.
- [75] W Schnars, U; Jueptner. *Digital Holography: Digital Hologram Recording, Numerical Reconstruction, and Related Techniques*. Springer, 1965.
- [76] Ulf Schnars and Werner Juptner. Digital recording and numerical. *Inst. Phys. Publ.*, 13:17, 2002.
- [77] Jürgen Schnekenburger Ilona Bredebusch Marcus Schäfer Wolfram Domschke Gert von Bally Björn Kemper, Daniel D. Carl. Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 11:11 – 11 – 8, 2006.

- [78] Darina Roitshtain, Lauren Wolbromsky, Evgeny Bal, Hayit Greenspan, Lisa L Satterwhite, and Natan T Shaked. Quantitative phase microscopy spatial signatures of cancer cells. *Cytometry Part A*, 91(5):482–493, 2017.
- [79] Ficoll-Paque PLUS. Cell preparation for *in vitro* isolation of lymphocytes. [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314729545976/litdoc71716700\\_20161013221551.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314729545976/litdoc71716700_20161013221551.pdf). Último Acceso: 2017-10-14.
- [80] Monica Diez-Silva, Ming Dao, Jongyoon Han, Chwee-Teck Lim, and Subra Suresh. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bull.*, 35(5):382–388, 2010.
- [81] The Histology Guide: White Blood Cells. [http://www.histology.leeds.ac.uk/blood/blood\\_wbc.php](http://www.histology.leeds.ac.uk/blood/blood_wbc.php). Último Acceso: 2017-11-23.
- [82] Ermai Xie, T.M. McGinnity, and QingXiang Wu. Automatic Extraction of Shape Features for Classification of Leukocytes. *2010 Int. Conf. Artif. Intell. Comput. Intell.*, pages 220–224, 2010.
- [83] David Dannhauser, Domenico Rossi, Pasquale Memmolo, Filippo Causa, Andrea Finizio, Pietro Ferraro, and Paolo A. Netti. Label-free analysis of mononuclear human blood cells in microfluidic flow by coherent imaging tools. *J. Biophotonics*, 10(5):683–689, 2017.
- [84] YongKeun Park, Monica Diez-Silva, Gabriel Popescu, George Lykotrafitis, Wonshik Choi, Michael S Feld, and Subra Suresh. Refractive index maps and membrane dynamics of human red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(37):13730–13735, 2008.
- [85] Ficoll-Paque Plus: For invitro isolation of lynphosytes. [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314729545976/litdoc71716700\\_20161013221551.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314729545976/litdoc71716700_20161013221551.pdf). Último Acceso: 2017-11-20.