



VII CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

16-18 junio 2016
Unidad de Seminarios, BUAP

"GENERACION DE NUEVAS TECNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO"



MICROSCOPIA DE FASE CUANTITATIVA PARA OBJETOS BIOLÓGICOS

Porras-Aguilar Rosario^{a,b}, Falaggis Konstantinos^{a,c}, Ramírez-San-Juan Julio César^a y Ramos-García Rubén^a

^aDepartamento de Óptica, Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica, Luis Enrique Erro No. 1, Sta. Ma. Tonantzintla Puebla, México CP 72840, Mexico, rporras@inaoep.mx, falaggis@inaoep.mx, jcram@inaoep.mx, rgarcia@inaoep.mx

^b Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Av. Insurgentes Sur 1582, 03940 México, D.F., México.

^c Instituto de Micromecánica y Fotónica, Universidad Politécnica de Varsovia, 8 Sw A. Boboli Str, 02-525 Varsovia, Polonia.

RESUMEN

Durante los últimos 5 años la tecnología de obtención de imágenes cuantitativas de fase en microorganismos y células ha contribuido con aplicaciones en citología, que van desde la medición cuantitativa de células rojas y las modificaciones en su morfología debido a diversas afectaciones, como la malaria; hasta la observación de conexiones interneuronales, entre muchas más.

En este trabajo se presentan algunas de las razones por las que la obtención de fase cuantitativa es de gran importancia en microscopía y se presentan tres sistemas para la obtención de esta información basados en la configuración de trayectoria común: a) sistemas basados en el uso de filtros de fase en el plano de Fourier, como los de contraste de fase; b) sistemas de filtrado espacial en amplitud; y c) sistemas basados en la ecuación de transferencia de irradiancia. Se revisan algunas de sus ventajas y desventajas y se presenta una alternativa que soluciona algunos de los inconvenientes en el sistema de contraste de fase cuantitativo, tanto experimentales como de post-procesamiento, que permiten la obtención de mediciones de fase más precisas.

1. INTRODUCCIÓN

En la última década se ha observado el surgimiento de técnicas de microscopía conocidas como imaginología de fase cuantitativa (QPI, por sus siglas en inglés). QPI es una alternativa a la microscopía que requiere teñir las muestras para facilitar su observación al aumentar su contraste, pero también ofrece otras ventajas: permite la obtención de mediciones cuantitativas, facilita el post-procesamiento de las imágenes obtenidas, permite estimar volúmenes, medir masas celulares en estado seco, etc.

El objetivo de este manuscrito es dar a conocer la técnica de QPI y sus alcances en microscopía, así como revisar algunas limitaciones de utilizar QPI en sistemas de trayectoria común basados en el uso de técnicas de interferometría convencional. Finalmente se mostrará que es posible superar esta limitación al usar materiales ópticos no lineales como se ha reportado en Ref. [1].

2. QPI EN MICROBIOLOGÍA

La observación de objetos transparentes es un tema ampliamente investigado en microscopía. Especialmente en el área de microbiología donde se requiere estudiar objetos tan delgados como células y otras muestras biológicas. La atenuación de luz en estos objetos es prácticamente nula,



por lo que es muy complicado visualizarlos en microscopía convencional (de campo brillante u oscuro). Sin embargo, estos objetos cambian la fase del haz de iluminación (perturban el frente de onda) y, por lo tanto, es posible utilizar técnicas ópticas para visualizar y cuantificar ese cambio en la fase. La Figura 1a muestra la diferencia entre objetos que pueden ser observados en microscopía convencional (objetos de amplitud, OA) y objetos de fase (OF). Mientras que la Figura 1b muestra el esquema de una célula (objeto de fase) que desfasa el frente de onda con que se ilumina de acuerdo a sus propiedades ópticas.

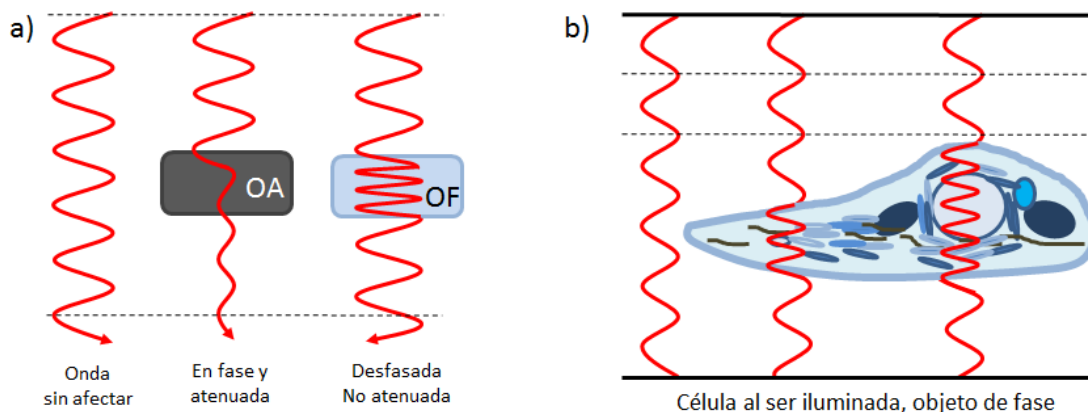


Fig. 1. Las ondas representan la iluminación utilizada. a) Muestra una onda que viaja libremente y dos ondas que atraviesan un objeto de amplitud (OA) y un objeto de fase (OF). Puede observarse que en el caso del OA la onda fue atenuada. Para el caso de OF la onda no fue atenuada pero ha sido retardada al atravesar OF, es decir, que está desfasada con respecto a la onda sin alterar. b) Presenta el caso de una célula que es iluminada por un frente de onda representado por tres ondas. Cada una de estas ondas viaja diferentes caminos ópticos, es decir que las propiedades ópticas de la célula son diferentes en cada punto. Los desfases de cada onda pueden ser detectados y utilizados para estimar propiedades de la célula, como masa, volumen, etc.

Una solución directa para la observación de objetos de fase en microscopía es la coloración de las muestras, que aumenta el contraste para facilitar la visualización. Sin embargo, este método tiene desventajas: 1) es invasiva ya que puede alterar el comportamiento natural del objeto bajo estudio, 2) se requiere de un tiempo determinado para la preparación de la muestra, 3) en el caso de que se requiera colocar colorante fluorescente, la muestra tiene un tiempo de vida determinado antes de fotoblanquearse.

La propuesta de QPI es obtener sistemas que no son invasivos, es decir, que no requieren la aplicación de colorantes, y que al realizar un procesamiento óptico y una serie de cálculos matemáticos, es posible recuperar los desfases en el frente de onda utilizado para iluminar al objeto. Varios autores han reportado resultados de QPI en el estudio de diversos objetos biológicos [2–6]. La Ref. [7] ha reportado que la medición cuantitativa de fase integrada de una célula es proporcional a la masa celular en estado seco, lo que permite el estudio de crecimiento de masa celular. Además de que las mediciones dinámicas de fase cuando se conoce el índice de refracción o el grosor (mediante la preparación de muestras que contengan pequeños objetos inocuos de índice de refracción y grosores conocidos), es posible medir fluctuaciones de densidad o de la membrana. QPI puede ser incluso combinada con otras técnicas y obtener tomografía en 3D en células vivas [7].



3. QPI EN CONFIGURACIÓN DE TRAYECTORIA COMÚN

Esta sección se centrará a describir las diferentes configuraciones de sistemas QPI que están basados en el uso del interferómetro de trayectoria común y que usan técnicas en interferometría convencional para el procesamiento, tanto óptico como matemático para el cálculo de la fase. Existen principalmente tres diferentes técnicas que pueden utilizarse en trayectoria común [7]: a) el esquema de contraste de fase que aplica un filtrado en fase en el plano de Fourier [3,8], b) utiliza una rejilla de difracción y un filtro de amplitud para permitir la visualización de la interferencia entre frecuencia 0 y +1, [9]; y c) la observación de la intensidad del objeto en diferentes planos, por ejemplo, al desplazar la cámara a lo largo del eje z. Este último método es conocido como fase cuantitativa utilizando la ecuación de transferencia de irradiancia [10,11].

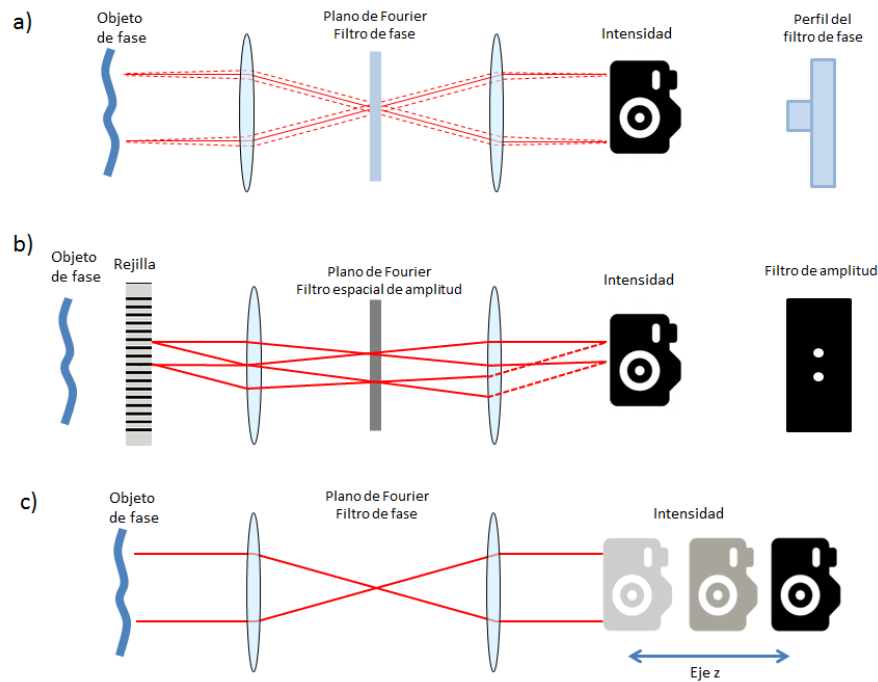


Fig. 2. Sistemas de QPI en configuración de trayectoria común. a) Sistema que combina las técnicas de contraste de fase con desplazamiento de fase. b) Sistema que utiliza una rejilla de difracción y filtraje en amplitud para obtener un patrón de interferencia que puede ser analizado de manera convencional. c) Sistema basado en la ecuación de transferencia de irradiancia.

Para obtener fase cuantitativa cada técnica realiza un procesamiento óptico y/o cálculo matemático diferente. En el esquema de contraste de fase [8], se introducen n cambios a la fase del filtro y se obtienen n imágenes que son procesadas utilizando la bien conocida técnica de desplazamiento de franjas de interferometría convencional [12,13]. Para el caso del esquema representado en la Fig. 2b, la imagen que se obtiene es un patrón de interferencia que puede ser analizado con el método de Takeda [14], aplicando la transformada Hilbert [15,16], o mediante cualquier otro algoritmo para el análisis de franjas. Para el esquema de la Fig. 2c, la idea es muestrear frecuencias espaciales del objeto a diferentes planos de observación. En otras palabras, capturar imágenes del objeto a diferentes distancias [17]. Estas imágenes pueden ser analizadas utilizando algoritmos de propagación de ondas de tal manera que es posible obtener la fase del objeto de interés [18,19].



Los tres métodos mencionados tienen la gran ventaja de ser robustos y estables, gracias a la configuración de trayectoria común. Sin embargo, además de esto cada uno de ellos tiene ciertas ventajas y desventajas que se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Ventajas y desventajas que se observan al emplear técnicas para obtener fase cuantitativa en sistemas de trayectoria común

| Técnica de obtención de fase cuantitativa en configuración de trayectoria común | Ventajas | Desventajas |
|--|--|---|
| Contraste de fase + desplazamiento de fase | <ul style="list-style-type: none"> • Sistema robusto y estable con respecto a vibraciones externas • Requiere pocas imágenes • Es relativamente rápido | <ul style="list-style-type: none"> • Los dispositivos comerciales usan costosos moduladores de luz • El tamaño del filtro limita la precisión de las mediciones • La alineación no es sencilla • El algoritmo para calcular la fase que se emplea, regularmente, es válido para la interferencia de dos haces y no para la configuración de trayectoria común. • El cálculo requiere de al menos 3 imágenes • Cuantificación de fase no es en tiempo real • El área de iluminación debe ser al menos 10 veces mayor al área del objeto |
| Filtros de amplitud + análisis de franjas | <ul style="list-style-type: none"> • Sistema robusto y estable con respecto a vibraciones externas • Requiere solo una imagen • Económico • Sistema rápido | <ul style="list-style-type: none"> • Debido a que la baja visibilidad de las franjas los resultados no son precisos • La alineación no es sencilla • Se requiere un algoritmo de análisis de franjas robusto |
| Ecuación de transporte de irradiancia + algoritmos de propagación | <ul style="list-style-type: none"> • Sistema robusto y estable con respecto a vibraciones externas • Implementación experimental sencilla • Es posible implementarlo sin lentes • Se puede adaptar fácilmente a microscopios comerciales | <ul style="list-style-type: none"> • Los algoritmos de recuperación de fase pueden ser computacionalmente costosos • Sistema costoso económicamente. Se requiere ya sea de una plataforma de movimiento muy precisa, o de un modulador de luz. • Sistema lento |



Al día de hoy es posible encontrar sistemas QPI comerciales basados en el esquema de contraste de fase + desplazamiento de fase (contraste de fase cuantitativo). La razón es que a pesar de ser un sistema costoso, requiere pocas imágenes, es más preciso que el segundo esquema y el post-procesamiento es relativamente rápido, a diferencia del tercer esquema que requiere de mucho tiempo de procesamiento. Sin embargo, el sistema de contraste de fase cuantitativo puede ser mejorado. Algunas modificaciones que pueden contribuir a la optimización del sistema experimental y a aumentar la precisión de las mediciones de fase se presentan en la siguiente sección.

4. MEJORAS A SISTEMAS DE QPI BASADOS EN EL MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASE CUANTITATIVO

Recientemente se han publicado modificaciones que pueden mejorar algunas de las desventajas del sistema basado en el microscopio de contraste de fase + desplazamiento de fase que se mencionan en la Tabla anterior. Estas modificaciones se refieren tanto a parámetros experimentales (por ejemplo: al ancho del filtro de fase), como a algunas mejoras al algoritmo para calcular la fase. Las referencias [20,21] reportan que un sistema de contraste de fase optimizado debe cumplir con ciertos requerimientos experimentales: la relación entre el ancho del filtro y el ancho del primer lóbulo del disco de Airy en el plano de Fourier no debe ser mayor de 0.6 ni menor de 0.4. Este problema se resuelve al emplear materiales no lineales donde el filtro de fase es auto-inducido y auto-alineado. Los cristales líquidos pueden usarse para inducir este filtro, gracias a que tienen además una propiedad que permite que el filtro no sea nunca más grande que la distribución de intensidad [22]. Este efecto se debe a la transición de Fredericz [23], predice que las moléculas de cristal líquido solo rotarán cuando la intensidad alcance un cierto umbral. De tal manera que al aumentar la intensidad en el plano de Fourier, las moléculas que estén ubicadas en el centro del disco de Airy rotarán un cierto ángulo y las moléculas en los bordes no rotarán. Este ángulo de rotación provocará una modulación en el índice de refracción y por lo tanto será posible obtener un microscopio de contraste de fase [24]. Adicionalmente, los cristales líquidos que han sido dopados con colorantes azo, pueden ser usados para controlar el índice de refracción mediante polarización. Con todo esto es posible obtener las 4 imágenes necesarias para calcular la fase del objeto de estudio, por ejemplo: una célula.

Sin embargo, es también posible mejorar un poco más la precisión del sistema al desarrollar un algoritmo de desfaseamiento de fase para la configuración de trayectoria común, como se describe en la Ref. [1,25].

Cabe mencionar que el uso de cristales líquidos dopados para controlar el índice de refracción del filtro de fase representa un reto importante. Como se reporta en Ref. [1], es necesario implementar un algoritmo de desfaseamiento de fase para pasos de fase arbitrarios [26].

La figura 3 muestra la comparación entre un sistema optimizado de QPI en trayectoria común que emplea algoritmos de desplazamiento de fase convencionales (de dos haces) y el mismo sistema que emplea el algoritmo de desplazamiento de fase desarrollado para configuración de trayectoria común (un solo haz).

Para la realización de esta simulación se utilizó la imagen estándar de Matlab 'hestain' como información de objeto de fase. Se calcularon las distribuciones de intensidades (en el plano de la cámara) correspondientes a la configuración de contraste de fase con diferentes valores de fase en el filtro ($0, \pi/2, \pi, 3\pi/2$), utilizando las ecuaciones para un sistema de contraste de fase optimizado descritas en Ref. [21]. El ancho del filtro utilizado en las simulaciones corresponde a un sistema de contraste de fase optimizado (ancho del filtro/ancho del primer lóbulo de la función de Airy = 0.5).



Las distribuciones de intensidad calculadas se usan para calcular la fase: i) utilizando el algoritmo de desplazamiento de fase convencional, Fig. 3a; y ii) utilizando el algoritmo propuesto en Ref. [1], que corresponde a la configuración de trayectoria común, Fig. 3b. Las Fig. 3c y d muestran la diferencia entre la fase original y la fase calculada en 3a y b, respectivamente. Se puede observar que el empleo del algoritmo que corresponde al sistema experimental contribuye a mejorar la precisión en la medición de la fase.

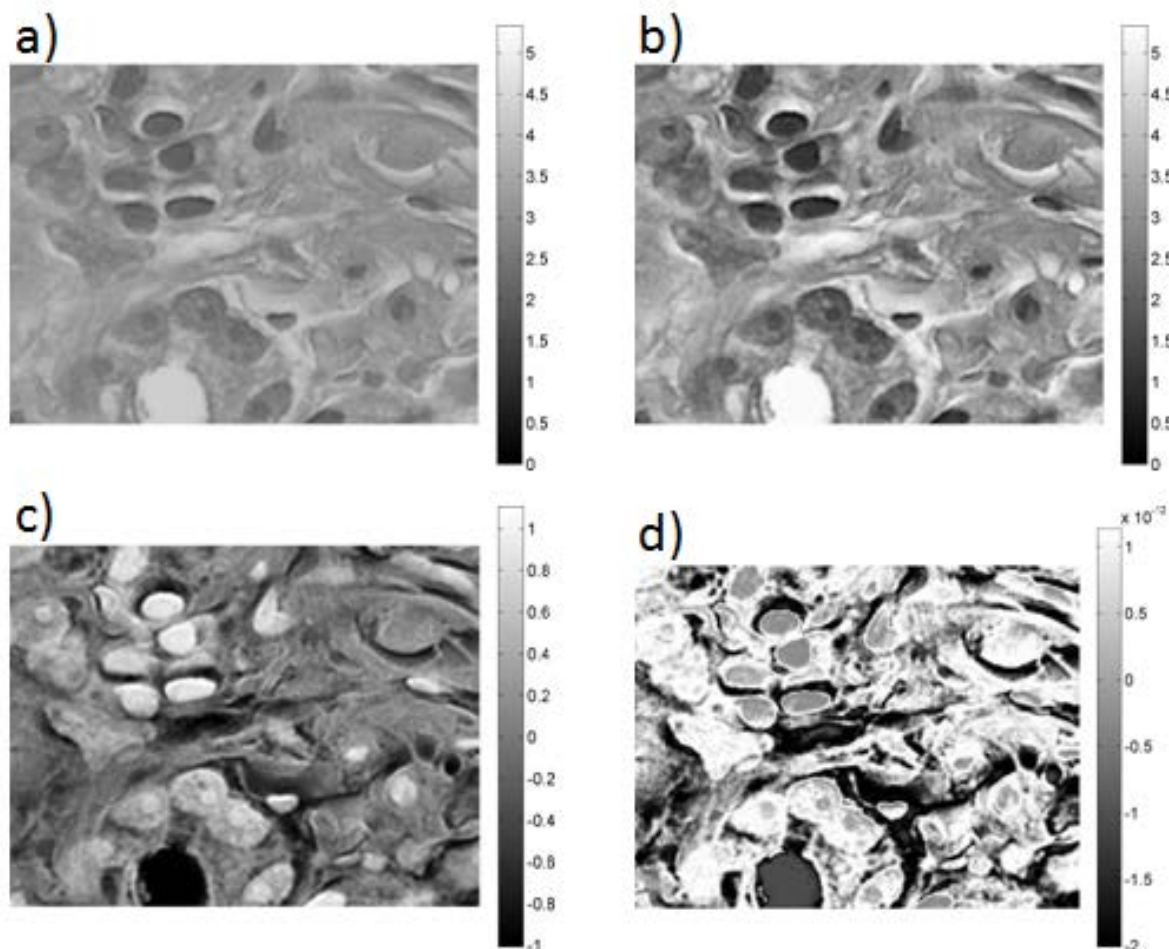


Fig. 3. Resultados de las simulaciones de la obtención de fase. Todos los resultados fueron calculados empleando distribuciones de intensidad obtenidos en contraste de fase cuantitativo. Las figuras a, b) muestran el mapa de QPI obtenido utilizando el algoritmo de desplazamiento de fase convencional (de dos haces) y el algoritmo de desplazamiento de fase para trayectoria común, respectivamente. Figuras c, d) muestran el error obtenido con cada uno de los algoritmos, respectivamente. Todos los resultados están en radianes. Nótese que la figura 3d que corresponde al segundo algoritmo tiene una escala que va hasta 10^{-12} .



5. CONCLUSIONES

QPI es una poderosa herramienta que provee preciada información relacionada con procesos celulares, como crecimiento, movilidad, transporte de masa, etc. La información de la fase puede ser usada en post-procesamiento digital ya que facilita la umbralización de segmentos, permita la implementación de contraste de fase diferencial para la observación de relieves, entre otras cosas. Esta es una técnica económica, que al día de hoy puede ser implementada como un dispositivo externo que se instala a microscopios convencionales Ref. [27]. Sin embargo, QPI continúa desarrollando tanto técnicas como algoritmos que permitirán la obtención de mediciones de fase cada vez más precisas y rápidas (como es el caso de las mejoras propuestas en la Ref. [1]). Con el constante desarrollo de técnicas de QPI, procesamiento óptico y algoritmos de post-procesamiento será posible la visualización en 3D y de imágenes tomográficas de células vivas en tiempo real.

AGRADECIMIENTOS

R. Porrás-Aguilar agradece el financiamiento del CONACyT mediante la Cátedra-2066, y K. Falaggis agradece a CONACyT (No. Propuesta: 265211). Esta investigación fue llevada a cabo en el marco del proyecto CONACyT 247851.

BIBLIOGRAFÍA

1. R. Porrás-Aguilar, K. Falaggis, J. C. Ramírez-San-Juan, and R. Ramos-García, "Self-calibrating common-path interferometry," *Opt. Express* **23**, 3327 (2015).
2. C. L. Curl, C. J. Bellair, P. J. Harris, B. E. Allman, A. Roberts, K. a Nugent, and L. M. D. Delbridge, "Quantitative phase microscopy: a new tool for investigating the structure and function of unstained live cells.," *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31**, 896–901 (2004).
3. L. Camacho, V. Micó, Z. Zalevsky, and J. García, "Quantitative phase microscopy using defocusing by means of a spatial light modulator," *Opt. Express* **18**, 6755 (2010).
4. G. Popescu, K. Park, M. Mir, and R. Bashir, "New technologies for measuring single cell mass.," *Lab Chip* **14**, 646–52 (2014).
5. H. Majeed, T. Nguyen, M. Kandel, V. Macias, M. Do, K. Tangella, A. Balla, and G. Popescu, "Automatic tissue segmentation of breast biopsies imaged by QPI," **9718**, 971817 (2016).
6. V. Tychinsky, A. V. Kretushev, I. V. Klemyashov, V. D. Zverzhkhovskiy, T. V. Vyshenskaya, and A. A. Shtil, "Quantitative phase imaging of living cells: application of the phase volume and area functions to the analysis of "nucleolar stress.,"" *J. Biomed. Opt.* **18**, 111413 (2013).
7. R. Z. and Mustafa Mir, Basanta Bhaduri, Ru Wang and G. Popescu, "Quantitative Phase Imaging," in *Progress in Optics* (2012), pp. 167–217.
8. Z. Wang, L. Millet, M. Mir, H. Ding, S. Unarunotai, J. Rogers, M. U. Gillette, and G. Popescu, "Spatial light interference microscopy (SLIM)," *Opt. Express* **19**, 1016–26 (2011).
9. Z. Wang, D. L. Marks, P. S. Carney, L. J. Millet, M. U. Gillette, A. Mihi, P. V Braun, Z. Shen, S. G. Prasanth, and G. Popescu, "Spatial light interference tomography (SLIT).," *Opt. Express* **19**, 19907–18 (2011).
10. J. Martínez-Carranza, K. Falaggis, and T. Kozacki, "Optimum phase retrieval using the transport of intensity equation," in C. Gorecki, A. K. Asundi, and W. Osten, eds. (2014), Vol. 9132, p. 91320T.
11. J. Martínez-Carranza, K. Falaggis, M. Jozwik, and T. Kozacki, "Comparison of phase retrieval techniques based on the transport of intensity equation using equally and unequally spaced plane separation criteria," **9204**, 92040G (2014).
12. S. Neto and C. Sperb, "Generalization of Carre algorithm," **6**, 213–227 (2009).
13. M. Servin and A. Gonzalez, "Linear analysis of the 4-step Carré phase shifting algorithm : spectrum , signal-to-noise ratio , and harmonics response," **21881**, 10692–10697 (2011).



VII

CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD
 "GENERACION DE NUEVAS TECNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO"

16-18
 junio 2016
 Unidad de Seminarios, BUAP



14. M. Takeda, H. Ina, and S. Kobayashi, "Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computer-based topography and interferometry," *J. Opt. Soc. Am.* **72**, 156 (1982).
15. M. Bahich, M. Afifi, and E. Barj, "Optical phase extraction algorithm based on the continuous wavelet and the Hilbert transforms," **2**, 1–5 (2010).
16. S. Amar, M. Bahich, and M. Afifi, "Extraction of the interferometric phase by Hilbert Huang Transform method from a single uncarrier Image," (2014).
17. J. Martinez-Carranza, K. Falaggis, and T. Kozacki, "Optimum plane selection for transport-of-intensity-equation-based solvers," *Appl. Opt.* **53**, 7050 (2014).
18. K. Falaggis, T. Kozacki, M. Jozwik, and M. Kujawinska, "Accurate and quantitative phase retrieval methods for a series of defocused images with application to in-line Gabor microscopy," in J. Schmit, K. Creath, C. E. Towers, and J. Burke, eds. (2012), Vol. 8493, p. 84930X–84930X–11.
19. K. Falaggis, T. Kozacki, and M. Kujawinska, "Accelerated single-beam wavefront reconstruction techniques based on relaxation and multiresolution strategies," *Opt. Lett.* **38**, 1660 (2013).
20. J. Glückstad and P. C. Mogensen, "Optimal Phase Contrast in Common-Path Interferometry," *Appl. Opt.* **40**, 268 (2001).
21. J. Gl, J. Glückstad, and D. Palima, *Generalized Phase Contrast*, Springer Series in Optical Sciences (Springer Netherlands, 2009), Vol. 146.
22. I.-C. Khoo, *Liquid Crystals* (John Wiley & Sons, Inc., 2007).
23. N. V Tabiryán, "Fredericks transitions induced by light fields," **3**, 32–37 (1982).
24. R. Porras-Aguilar, M. D. Iturbe-Castillo, J. C. Ramirez-San-Juan, O. Baldovino-Pantaleon, D. Sanchez de la Llave, R. Ramos-Garcia, and L. Arroyo-Carrasco, "Polarization-dependent nonlinear phase contrast by using dye-doped nematic liquid crystals," in *Photonic Devices + Applications*, I. C. Khoo, ed. (International Society for Optics and Photonics, 2008), pp. 705006–705006–7.
25. R. G. Porras Aguilar and K. Falaggis, "Common Path Phase Shifting Interferometry with Arbitrary Phase Steps," in *Latin America Optics and Photonics Conference (OSA, 2014)*, p. LTh2B.3.
26. Z. Wang and B. Han, "Advanced iterative algorithm for phase extraction of randomly phase-shifted interferograms.," *Opt. Lett.* **29**, 1671–3 (2004).
27. K. Lee and Y. Park, "Quantitative phase imaging unit," *Opt. Lett.* **39**, 3630 (2014).