



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

ESTUDIO DE IMAGENOLÓGÍA TRANSMITIVA DE LA EMISIÓN DE PAREJAS
DE FOTONES EN TENDONES PORCINOS

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (FÍSICA)

PRESENTA:
MÓNICA MALDONADO TERRÓN

TUTOR O TUTORES PRINCIPALES
DR. HÉCTOR CRUZ RAMÍREZ INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. ALFRED BARRY U'REN CORTES INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES

DR. JESÚS GARDUÑO MEJÍA INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y
TECNOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Al perseguir lo inaccesible volvemos imposible lo que no lo es.”

Jacques Michel Robert

Resumen

En el laboratorio de óptica cuántica del Instituto de Ciencias Nucleares (ICN-UNAM) se producen parejas de fotones en diversos medios como cristales con propiedades ópticas no lineales de segundo orden diferente de cero y fibras ópticas.

En este trabajo, se estudió la generación de parejas de fotones en muestras biológicas para su posible aplicación en el diagnóstico médico.

Desde hace varias décadas, se realiza diagnóstico médico en tejidos biológicos ricos en colágeno gracias a la susceptibilidad eléctrica de orden dos que presentan, y que permite la generación de segundo armónico haciendo posible la observación de las fibras de colágeno. De esta manera, se han estudiado enfermedades como tendinitis y cáncer de mama [1] [2].

En este proyecto, se reprodujo parte del trabajo que se lleva a cabo en otros laboratorios utilizando generación de segundo armónico [3], en dos muestras de tejido de tendón de porcino.

Además, se implementó la generación de parejas de fotones creados a partir de la conversión paramétrica descendente espontánea, utilizando como medio los tejidos biológicos y realizando un comparativo entre

los dos procesos, es decir, entre la generación de segundo armónico y proceso paramétrico descendente espontáneo, mediante el uso de tres métodos con los que usualmente se estudia la generación de segundo armónico [4].

Los resultados obtenidos y de acuerdo a los resultados reportados para tendones porcinos [1] nos indican que los tejidos estudiados podrían tener tendinitis.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi esposo Erasto Ortiz Ricardo por toda la paciencia y el apoyo que me ha brindado a lo largo de este proceso.

A mis padres Isaura Terrón y Sabás Maldonado, les agradezco el haberme enseñado el significado de una familia.

A mi hermana María Fernanda Maldonado porque a pesar de todas nuestras diferencias, hemos permanecido unidas.

A mis abuelos Cristina Nieto y Miguel Ángel Terrón por su infinito amor.

De manera muy especial quiero agradecer a mi tutor el Dr. Héctor Cruz y a mi comité tutor conformado por el Dr. Afred U'Ren y el Dr. Jesús Garduño por estar al pendiente de la evolución de este trabajo cada semestre y por sus oportunos comentarios que ayudaron al progreso de este trabajo.

Además, agradezco a los sinodales, al Dr. Raúl Josué Hernández Hernández, al Dr. Roberto Ramírez Alarcón, al Dr. Ángel Sánchez Cecilio y al Dr. Héctor Alva por su tiempo y contribución a este trabajo.

De igual manera, agradezco al instituto de Física (IF-UNAM) por darme la oportunidad de continuar con mis estudios y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme apoyado a lograr una meta más.

Por último gracias a mis compañeros de laboratorio por hacer amable el lugar de trabajo.

A mi esposo Erasto
A mis padres Isaura y Sabas

Glosario

Aminoácido	Molécula orgánica que cuenta con un grupo amino (NH_2) y uno carboxilo ($COOH$).
Enlace peptídico	Enlace originado entre los grupos (NH_2) y ($COOH$) de dos aminoácidos distintos
Cadena polipeptídica	Estructura lineal de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos.
Glicina	Aminoácido cuya fórmula química es NH_2CH_2COOH .
Lisina	Aminoácido con fórmula molecular $C_6H_{14}N_2O_2$
Prolina	Aminoácido con fórmula molecular $C_5H_9NO_2$
Codón	Secuencia de tres nucleótidos que corresponden a un aminoácido específico.
Hidroxiprolina	Aminoácido derivado de la prolina.
Residuo	Aminoácidos derivados de cadenas polipeptídicas largas
Monómero	Molécula fundamental de las moléculas orgánicas
Tetrámero	Molécula formada por cuatro monómeros.

Índice general

1. Marco Teórico	11
1.1. Generación de segundo armónico	11
1.2. Conversión paramétrica descendente espontánea (SPDC) .	14
1.3. Óptica no lineal de segundo orden en moléculas orgánicas	15
1.4. Origen del efecto de segundo orden en moléculas orgánicas	19
1.5. Colágeno	20
1.6. Biosíntesis del colágeno	21
1.7. Tipos de colágeno en los vertebrados	25
1.8. Tendinitis	26
2. Montaje experimental	28
2.1. Generación de segundo armónico	29
2.2. Generación de SPDC	31
2.3. Detección de pares en coincidencia	32
3. Resultados	35

3.1. Generación de Segundo armónico	35
3.2. Conversión paramétrica descendente espontánea.	37
3.3. Detección de pares en coincidencia	39
4. Análisis de Datos	41
4.1. Método 1. Medición directa	42
4.1.1. Generación de Segundo Armónico	42
4.1.2. Conversión paramétrica descendente espontánea. .	45
4.2. Método 2. Transformada de Fourier	47
4.2.1. Generación de Segundo Armónico	48
4.2.2. Conversión paramétrica descendente espontánea. .	50
4.3. Método 3. Área completa.	52
4.3.1. Generación de Segundo Armónico	53
4.3.2. Conversión paramétrica descendente espontánea. .	57
4.4. Discusión de Resultados	59
5. Conclusiones	63
6. Apéndices	65
6.1. Apéndice A	65
6.2. Apéndice B	66

Capítulo 1

Marco Teórico

1.1. Generación de segundo armónico

La primera vez que se observó la generación de segundo armónico fue en 1961 cuando Franken hizo pasar la línea de 694.3 nm del láser de rubidio por un cristal de cuarzo en cuya salida pudo detectar fotones con una longitud de onda de 347.15 nm aunque de poca intensidad.

El origen de la generación de segundo armónico se debe a la respuesta no lineal de segundo orden que algunos materiales tienen ante un campo eléctrico externo [5].

Cuando tenemos un sólido en presencia de un campo eléctrico externo (\vec{E}) se produce una separación de cargas en los átomos que componen el sólido y por ende la polarización electrónica del mismo (\vec{P}).

Así, podemos expresar ésto matemáticamente como se muestra en la ecuación 1.1

$$\vec{P} = \epsilon_0(\chi^{(1)}\vec{E} + \chi^{(2)}\vec{E}\vec{E} + \chi^{(3)}\vec{E}\vec{E}\vec{E} + \dots) \quad (1.1)$$

donde ϵ_0 es la permitividad del vacío y $\chi^{(1)}$ es la susceptibilidad eléctrica lineal y $\chi^{(2)}$ y $\chi^{(3)}$ son los coeficientes ópticos no lineales de segundo y tercer orden respectivamente [6].

Para materiales ordinarios \vec{P} varia linealmente con el campo \vec{E} aplicado, pero para algunos otros materiales dicha variación es no lineal.

Específicamente, para la generación de segundo armónico se emplean materiales no lineales que tengan un coeficiente $\chi^{(2)}$ distinto de cero. Entonces de la ecuación 1.1 se tiene que:

$$\vec{P} = \epsilon_0(\chi^{(1)}\vec{E} + \chi^{(2)}\vec{E}\vec{E}). \quad (1.2)$$

Considerando que el campo eléctrico aplicado corresponde a un haz de luz con una frecuencia angular $\omega = 2\pi\nu$ entonces $\vec{E} = E_0 \sin(\omega t)$.

Sustituyendo en 1.2 se tiene que:

$$\vec{P} = E_0(\chi^{(1)} E_0 \sin(\omega t) + \chi^{(2)} E_0 E_0 \sin^2(\omega t)) \quad (1.3)$$

pero $\sin^2(\omega t) = \frac{1}{2}(1 - \cos(2\omega t))$, por lo que

$$\vec{P} = \chi^{(1)} \epsilon_0 E_0 \sin(\omega t) + \frac{1}{2} \chi^{(2)} \epsilon_0 E_0 E_0 (1 - \cos(2\omega t)). \quad (1.4)$$

El segundo sumando de la ecuación anterior tiene una velocidad de propagación 2 veces mayor a la original, es decir, la luz correspondiente a ese término tiene una doble frecuencia de propagación con respecto a la luz original. Debido a que las dos longitudes de onda viajan a diferentes velocidades se pueden tener pérdidas en la intensidad de la señal producida por la generación de segundo orden por interferencia destructiva. Sin embargo, experimentalmente se puede resolver este problema cumpliendo con las condiciones de *phase-matching* con las que es posible elegir una dirección en el cristal a la que ambas longitudes de onda viajan a la misma velocidad [11].

1.2. Conversión paramétrica descendente espontánea (SPDC)

El SPDC (por sus siglas en inglés) es un proceso cuántico que también explota la no linealidad de los materiales con $\chi^{(2)}$ diferente de cero. En este proceso, se hace incidir un haz de bombeo (*pump*) sobre un medio no lineal (por ejemplo un cristal de β Borato de Bario, conocido como BBO) y con cierta probabilidad un fotón del bombeo se aniquila dando lugar a dos fotones de menor frecuencia, conocidos como señal (*signal*) y acompañante (*idler*) [8], tal y como se muestra en la Figura 1.1.

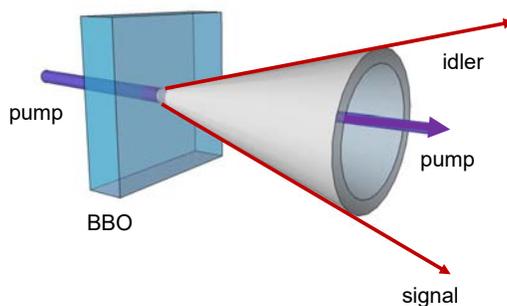


Figura 1.1: Proceso paramétrico descendente espontáneo tipo I.

Los fotones generados están en función de las ecuaciones de *phase-matching* que se refieren a la conservación del momento \vec{k} y la energía ω .

$$\omega_p = \omega_i + \omega_s; \quad (1.5)$$

$$\vec{k}_p = \vec{k}_i + \vec{k}_s; \quad (1.6)$$

donde los índices p , s e i se refieren a los fotones bombeo, señal y acompañante, respectivamente.

Existen dos tipos de SPDC que son los más utilizados, el tipo I, en el que los dos fotones generados poseen la misma polarización entre sí, pero perpendicular al bombeo y están contenidos en un cono concéntrico.

En el SPDC tipo II los fotones producidos tienen polarizaciones perpendiculares entre sí y se generan en una distribución de dos conos concéntricos.

1.3. Óptica no lineal de segundo orden en moléculas orgánicas

Al hacer incidir un haz de luz láser a un átomo o molécula, se pueden producir transiciones entre dos niveles de energía dentro del átomo o

molécula, cuya separación corresponde a la energía de los fotones emitidos durante la transición [10].

Un átomo en presencia de una onda de luz, se ve afectado tanto por su campo eléctrico como el magnético, pero considerando que la fuerza magnética sobre los electrones que conforman el láser con magnitud de velocidad v es menor que la fuerza eléctrica por un factor $\frac{v}{c}$, entonces, se pueden despreciar los efectos magnéticos sobre el átomo. Como resultado de la interacción entre el campo eléctrico del láser y el átomo, se induce una polarización eléctrica en éste. La relación entre el campo eléctrico aplicado con una frecuencia ω_i (proveniente de la onda electromagnética del láser) y la polarización inducida en el átomo está dada por [11]:

$$\begin{aligned}
 P_i(\omega_1) = & \sum_j \alpha_{ij}(-\omega_1, \omega_2) E_j(\omega_2) + \sum_{jk} \beta_{ijk}(-\omega_1, \omega_2, \omega_3) E_j(\omega_2) E_k(\omega_3) \\
 & + \sum_{jkl} \gamma_{ijkl}(-\omega_1, \omega_2, \omega_3, \omega_4) E_j(\omega_2) E_k(\omega_3) E_l(\omega_4) + \dots
 \end{aligned} \tag{1.7}$$

donde $P_i(\omega_i)$ es la polarización inducida en un medio macroscópico por un campo eléctrico a una frecuencia ω_i , a lo largo del i -ésimo eje, α_{ij} es la polarizabilidad lineal, β_{ijk} es la primera hiperpolarizabilidad y γ_{ijkl} es la segunda hiperpolarizabilidad, E_i es el campo eléctrico aplicado a lo largo de la dirección i -ésima.

Mientras que la polarización macroscópica inducida en el medio es :

$$\begin{aligned}
 P_i(\omega_1) = & \sum_j \chi_{ij}^{(1)}(-\omega_1, \omega_2) E_j(\omega_2) + \sum_{jk} \chi_{ijk}^{(2)}(-\omega_1, \omega_2, \omega_3) E_j(\omega_2) E_k(\omega_3) \\
 & + \sum_{jkl} \chi_{ijkl}^{(3)}(-\omega_1, \omega_2, \omega_3, \omega_4) E_j(\omega_2) E_k(\omega_3) E_l(\omega_4) + \dots
 \end{aligned} \tag{1.8}$$

donde $\chi_{ij}^{(1)}$, $\chi_{ijk}^{(2)}$ y $\chi_{ijkl}^{(3)}$ corresponden a la susceptibilidad óptica no lineal de primer, segundo y tercer orden, respectivamente.

La no linealidad de segundo orden macroscópico $\chi_{ijk}^{(2)}$ y microscópica β_{ijk} se relacionan mediante la siguiente función.

$$\chi_{ijk}^{(2)} = N \beta_{ijk} f_i f_j f_k \tag{1.9}$$

donde N es la densidad de moléculas y f_s son los factores de campo local debido a las interacciones intermoleculares. Entonces, para conocer la susceptibilidad óptica no lineal de segundo orden $\chi_{ijk}^{(2)}$, basta con conocer los valores de la no linealidad de segundo orden microscópico β_{ijk} , los cuales pueden ser calculados haciendo uso de la teoría de perturbaciones dependientes del tiempo y cuyo resultado es el siguiente (ver apéndice A):

$$\beta_{ijk}(-2\omega; \omega, \omega) = -\frac{e^3}{8\hbar^2} \sum_{n'=g} \sum_{n=g} \left[\begin{aligned} & (r_{gn'}^j r_{n'n}^i r_{gn}^k + r_{gn'}^k r_{n'n}^i r_{gn}^j) \times \left(\frac{1}{(\omega_{n'g}-\omega)(\omega_{ng}+\omega)} + \frac{1}{(\omega_{n'g}+\omega)(\omega_{ng}-\omega)} \right) \\ & + (r_{gn'}^j r_{n'n}^i r_{gn}^k + r_{gn'}^i r_{n'n}^k r_{gn}^j) \times \left(\frac{1}{(\omega_{n'g}+2\omega)(\omega_{ng}+\omega)} + \frac{1}{(\omega_{n'g}-2\omega)(\omega_{ng}-\omega)} \right) \\ & + (r_{gn'}^j r_{n'n}^k r_{gn}^i + r_{gn'}^k r_{n'n}^j r_{gn}^i) \times \left(\frac{1}{(\omega_{n'g}-\omega)(\omega_{ng}-2\omega)} + \frac{1}{(\omega_{n'g}+\omega)(\omega_{ng}+2\omega)} \right) \end{aligned} \right]$$

donde r_{gn}^i y $r_{n'n}^j$ son los elementos de matriz de los componentes i -ésimal del operador dipolo para la molécula que se encuentra entre el estado fundamental $|g\rangle$ y el estado excitado $|n\rangle$ y entre los dos estados excitados $|n\rangle$ y $|n'\rangle$, respectivamente.

La primera hiperpolarizabilidad se puede escribir como:

$$\beta = \beta_{xxx} + \beta_{xyy} + \beta_{xzz} \quad (1.10)$$

por lo que el coeficiente de segundo orden no lineal d_{ijk} para moléculas orgánicas está dado por:

$$d_{ijk}(-2\omega, \omega, \omega) = \frac{1}{2} \chi_{ijk}^{(2)}(-2\omega, \omega, \omega) \quad (1.11)$$

y la polarización es $\vec{P}_i^{2\omega} = d_{ijk}(-2\omega, \omega, \omega) E_j(\omega) E_k(\omega)$. Si se intercambian los índices j y k en la ecuación de arriba, se puede reemplazar kj y jk por los índices contraídos, de tal manera que $xx = 1$, $yy = 2$, $zz = 3$, $yz = zy = 4$, $xz = zx = 5$ y $xy = yx = 6$, entonces se obtiene

$$\begin{pmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} d_{11} & d_{12} & d_{13} & d_{14} & d_{15} & d_{16} \\ d_{21} & d_{22} & d_{23} & d_{24} & d_{25} & d_{26} \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & d_{34} & d_{35} & d_{36} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_x^2 \\ E_y^2 \\ E_z^2 \\ 2E_z E_y \\ 2E_z E_x \\ 2E_x E_y \end{pmatrix}$$

La relación entre la no linealidad de segundo orden microscópico β_{ijk} y el coeficiente de segundo orden no lineal es:

$$d_{ijk}(-2\omega; \omega, \omega) = N f_i(2\omega) f_j(\omega) f_k(\omega) b_{ijk}(-2\omega; \omega, \omega) \quad (1.12)$$

donde $b_{ijk}(-2\omega; \omega, \omega) = \frac{1}{N_g} \sum_{ijk} \left(\sum_{j=1}^N \cos \theta_i^s \cos \theta_j^s \cos \theta_k^s \right) \beta_{ijk}(-2\omega; \omega, \omega)$ con N_g es el número de la posición equivalente en la celda unitaria molecular (perteneciente a los cristales moleculares), y b_{ijk} es la celda unitaria no lineal por molécula [12].

1.4. Origen del efecto de segundo orden en moléculas orgánicas

Las interacciones intermoleculares fuertes entre el donador y el receptor son responsables de los efectos de segundo orden no lineal.

Las moléculas aromáticas dipolares contienen un grupo donador y el receptor de electrones que produce una transferencia intramolecular de carga que es la responsable de producir una hiperpolarizabilidad molecular generando un valor diferente de cero de no linealidad de segundo orden.

1.5. Colágeno

El colágeno es la proteína estructurada más abundante en los vertebrados, tan sólo en los humanos, comprende un tercio del total de las proteínas, constituyendo piel, hueso y dientes. Su importancia radica, en que su presencia en los tejidos determina las propiedades estructurales y mecánicas de éstos, de tal manera que variaciones tanto en la distribución como la cantidad de colágeno en los tejidos es indicador de algunos padecimientos [13].

El colágeno consiste de cadenas polipeptídicas, llamadas cadenas α . Una cadena α es una secuencia de polipéptidos unidos mediante puentes de hidrógeno. En la actualidad se conocen 28 tipos de colágeno diferentes con alrededor de 46 cadenas de polipéptidos distintas, la mayoría de ellas comparten la propiedad de que cada tres aminoácidos se localiza una glicina, mientras que los aminoácidos que los suceden y preceden, llamados X_{aa} y Y_{aa} respectivamente, pueden ser cualquier

aminoácido, aunque, por lo general, en el colágeno que está presente en los vertebrados, dichos aminoácidos son en ese orden prolina y lisina (figura 1.2).

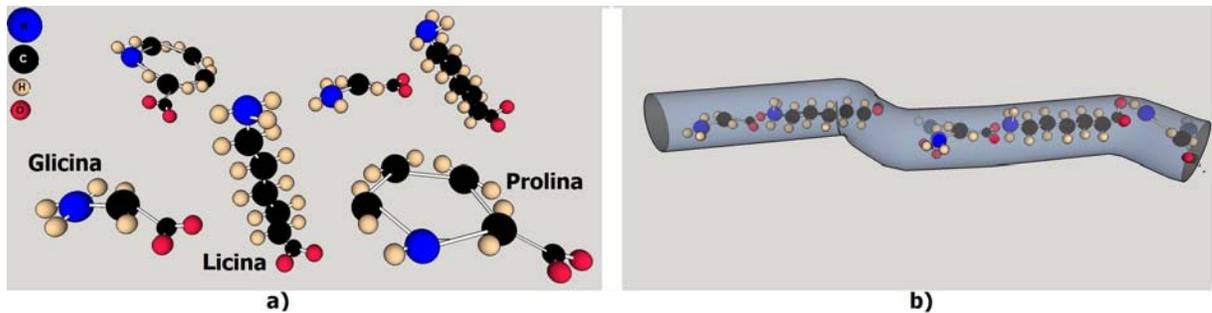


Figura 1.2: a) Moléculas de Glicina, Lisina y Prolina. b) Cadena alpha.

La glicina es esencial en la molécula de colágeno porque al no presentar cadena lateral, es ideal como aminoácido debido a espacio reducido en las cadenas α , además, al tener un enlace NH es la responsable de crear las puentes de Hidrógeno y por si fuera poco, los codones (secuencia de tres nucleótidos que corresponden a un aminoácido específico) de codificación del colágeno siempre inician con glicinas.

1.6. Biosíntesis del colágeno

Consiste de dos etapas [9]. El proceso inicia con la biosíntesis de 2 cadenas α de distintos aminoácidos a las que se les denomina α_1 y α_2 con el fin de identificarlas, cada una con alrededor de 1300 residuos.

Algunos de los residuos de prolina y lisina de ambas cadenas se oxidan co-traslacionalmente gracias a la vitamina C, formando hidroxiprolina (figura 1.3 a). Un déficit de vitamina C da por resultado una enfermedad conocida como escorbuto cuyos síntomas se deben a la incapacidad de crear colágeno. La importancia de la oxidación radica en que la combinación de la hidroxiprolina y la prolina le proporcionan al colágeno una estructura fuerte.

Después, los residuo de hidroxiprolina se asocian a azúcares tales como GAL-GLC (galactosa-glucosa) o GAL (figura 1.3 b). Una vez modificadas las cadenas α de esta manera, se adhiere un globulo C-terminal y N-terminal a cada extremo de la secuencia de aminoácidos (figura 1.3 c). A continuación, dos cadenas α_1 y dos cadenas α_2 se asocian formando un tetrómero (figura 1.3 d). Una de las cadenas α_2 se degrada, mientras que se crean enlaces S-S entre las terminales globulares del resto de las cadenas, formando procolágeno (figura 1.3 e).

A continuación tiene lugar la fibrilogénesis que es la etapa en la que el procolágeno se convierte en fibras y a su vez, consiste de dos procesos, el de nucleación y el de crecimiento de fibra.

El proceso de nucleación tiene lugar cuando las tres cadenas α de la molécula de procolágeno se enrollan entre sí mediante enlaces transversales y haciendo que la triple hélice se mantenga unida gracias a los

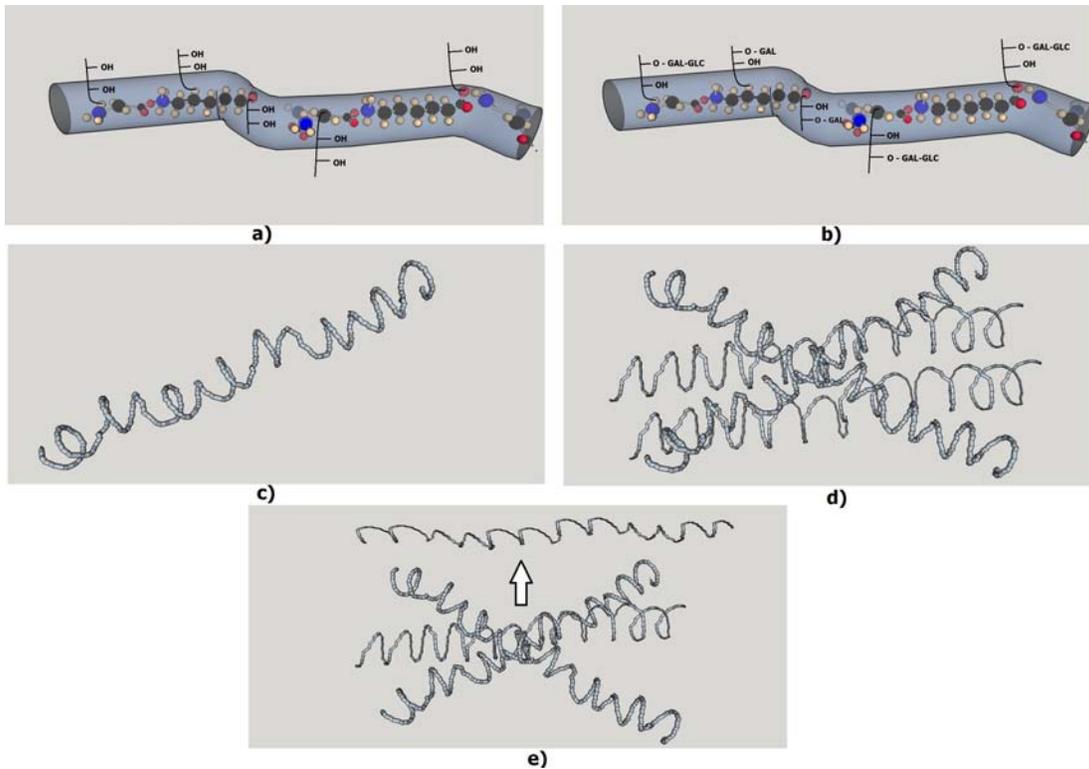


Figura 1.3: Etapa inicial. a) Oxidación de algunos residuos de Prolina y Lisina. b) Residuos de hidroxiprolina asociados a azúcares. c) Cadena alpha final. d) Tetrómero formado por cadenas alpha. e) Degradación de una cadena alpha.

puentes de hidrógeno representados químicamente por $N - H_{Gly} \dots O = C_{Xaa}$. A esta última molécula se le conoce como molécula de tropocolágeno, que se refiere a un colágeno maduro (figura 1.4 a). En este proceso, los propéptidos N-terminales y C-terminales toman el nombre de telopéptidos. El resto del procolágeno es secretado al espacio extracelular (figura 1.3 b). Las partes globulares de la triple hélice se unen.

Posteriormente, se da lugar al proceso de crecimiento de fibra o de autoensamblaje, en donde las moléculas de tropocolágeno se alinean cabeza con cola dejando un espacio entre sí en hileras que se superponen formando triples super hélices y dando lugar a microfibrillas individuales (figura 1.3 c). Este proceso de autoensamblaje es dirigido por los telopéptidos gracias a la interacción que existe entre éstos con lugares específicos de unión en monómeros de la triple hélice.

Finalmente, estas microfibrillas se ensamblan gracias a que las cadenas laterales de la lisina se reticulan produciendo enlaces cruzados de hidroxiliprinolina y lisis piridolina, formando segmentos de fibrillas de tamaño intermedio con una fuerza y estabilidad proveniente del proceso de reticulación (figura 1.3 d).

Cabe destacar que las hélices de colágeno son sensibles a la temperatura y de hecho, a una temperatura que depende de la proporción entre la prolina y la hidroxiprolina pero que es superior a los $55^{\circ}C$ [14], se derriten. Generalmente, la temperatura a la cual se derriten las hélices es superior que la temperatura de los vertebrados calientes que varía entre $32^{\circ}C$ y $44^{\circ}C$ [14].

La biosíntesis del colágeno es sensible a producir mutaciones que causan enfermedades tales como el síndrome de Ehler-Danlos, conocido coloquialmente como el síndrome del hombre de goma, en el que una sustitución de un aminoácido impide la formación de fibras de co-

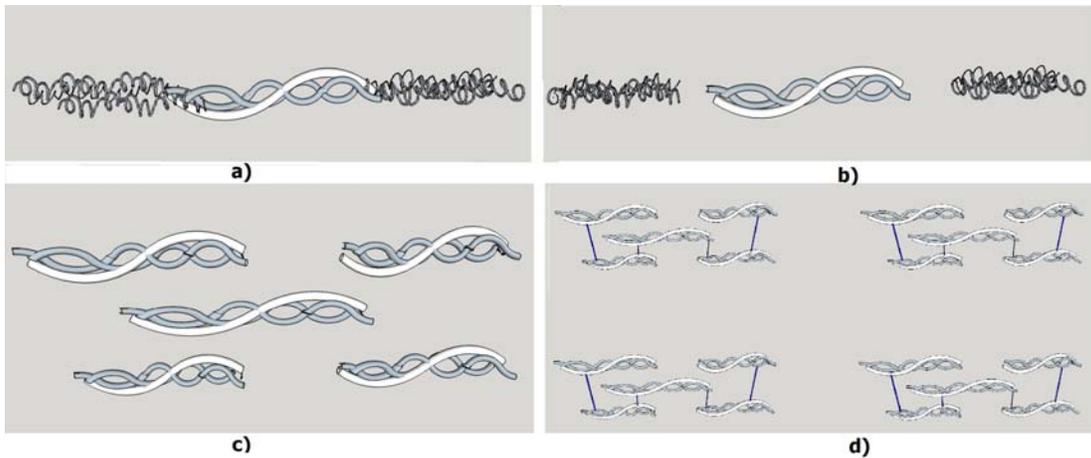


Figura 1.4: Proceso de nucleación. a) El tropocolágeno se desrrolla en el centro del procolágeno. b) El procolágeno es secretado al espacio extracelular. c) Autoensamblaje de las moléculas de tropocolágeno. d) Formación de fibrillas.

lágono provocando hiperelasticidad de la piel.

1.7. Tipos de colágeno en los vertebrados

En los vertebrados las fibrillas de colágeno tipo I forman los tejidos fibrosos, mientras que las fibras de colágeno tipo II son responsables de la formación de cartílago.

Los monómeros TC (que son monómeros de temperatura de transición cristalina) de colágeno tipo I son muy inestables a la temperatura corporal, sin embargo, a partir de estas proteínas inestables se

pueden formar estructuras estables de tejido debido al proceso de autoensamblaje descrito en la sección anterior, así para que las fibrillas de colágeno en el cuerpo de los vertebrados soporte el estrés en tres dimensiones, se requiere de un adecuado proceso de autoensamblaje entre las estructuras macromoleculares.

Como ejemplo, se puede decir que una triple hélice individual de colágeno tipo I es menor a 2 nm de diámetro y mide 300 nm de largo, mientras que una fibrila tiene una longitud de hasta 1cm de longitud y alrededor de 500 nm de diámetro. Por otro lado, el módulo de Young es de 33 MPa en fibras deshidratadas. Es importante destacar que conforme el tendón envejece, el proceso de reticulación se hace excesivo produciendo fibras frágiles.

1.8. Tendinitis

Es la enfermedad más común entre los deportistas, pero también puede afectar a cualquier persona de la población. Entre los primeros, la razón principal por la que se presenta la enfermedad es por un mal entrenamiento o un mal uso de los aparatos y cabe destacar que algunos deportes tienen mayor incidencia del padecimiento, tal es el caso del tenis, que reporta el 40 del total de enfermos. Por otro lado, en el resto de la población, las razones pueden ir desde un calzado inadecuado, hasta un accidente.

La tendinitis se presenta como una inflamación del músculo y el tendón acompañado por dolor al moverse. Se cree que el origen de la tendinitis es un esfuerzo repetitivo sobre el tendón que produce micro lesiones en el mismo. Si el esfuerzo sobrepasa el proceso de curación del tendón, entonces estas microlesiones da lugar a una lesión severa en el mismo. Sin embargo, aún no se ha determinado las causas por la que se produce la inflamación característica del padecimiento.

Según estudios realizados previamente, es posible determinar si los tejidos que componen el tendón sufren de tendinitis o no. Para esto, se hace uso de las propiedades ópticas no lineales mostradas anteriormente, ya que al hacer incidir un haz pulsado de 810 nm es posible producir generación de segundo armónico (405 nm) en las fibras de colágeno y haciendo visible las fibras.

La orientación de las fibras nos proporciona información acerca de si el tejido está sano o en su defecto qué tan enfermo se encuentra. Así, en los tejidos sanos presentan fibras de colágeno tienen una bien organizadas y con una orientación bien definida, mientras que las fibras de los tejidos enfermos no presentan una orientación bien definida y muestran notable una desorganización de sus fibras. Los tejidos que se analizaron en el presente trabajo son tendones de porcino.

Capítulo 2

Montaje experimental

A continuación se muestran los diferentes montajes experimentales que se realizaron para la observación de la generación de segundo armónico, de la conversión paramétrica descendente espontánea, así como la detección de parejas de fotones, en los tejidos.

Es importante señalar que a lo largo de todo el experimento se trabajó con dos muestras de tejido porcino, estos tejidos son tendones de porcino encapsulados en un portaobjetos con un espesor de algunas micras. Estas muestras fueron proporcionadas por un grupo de trabajo ajeno al laboratorio de Óptica Cuántica en donde se realizó el trabajo, por lo que no se participo en la preparación de las mismas.

2.1. Generación de segundo armónico

El arreglo experimental para la generación de segundo armónico en las fibras de colágeno se muestra en la figura 2.1.

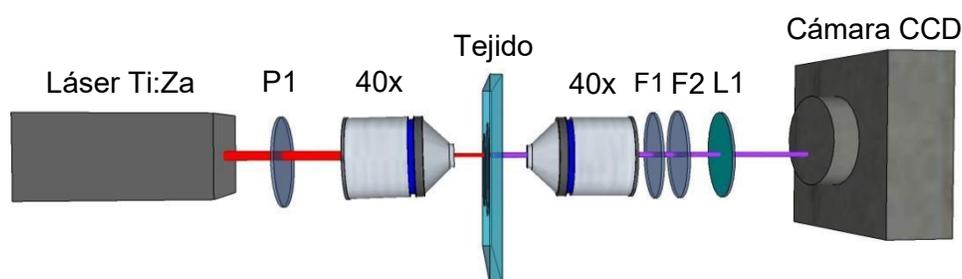


Figura 2.1: Arreglo experimental para obtener la generación de segundo armónico. Detalles explicados en el texto

Se utilizó un láser de Titanio-Zafiro (Ti:Za, fabricado en el laboratorio de óptica cuántica) en femtosegundos centrado en 810 nm con un ancho espectral de 20 nm aproximadamente, con una frecuencia de repetición de 90 MHz y una potencia promedio de 220 mW. A la salida del mismo, se coloca una placa retardadora de fase (P1) de un cuarto de onda con el fin de generar un haz con polarización circular.

El láser incide en un objetivo de apertura numérica de 0.65 con una amplificación de 40x cuya función es enfocar la luz del láser sobre la muestra de tal manera que incida en un área muy pequeña de la mis-

ma. La apertura numérica representa la capacidad del objetivo para coleccionar la luz, su valor varía de 0.5 a 0.85 en objetivos comerciales, de tal manera que entre más grande sea la apertura numérica de un objetivo, mayor será su capacidad de recolección de luz.

Dentro de la muestra es en dónde se produce la generación de segundo armónico, haciendo visibles las fibras de colágeno. Es importante garantizar la polarización del bombeo sea circular para que no se favorezca ninguna orientación particular en la observación de las fibras, ya que experimentalmente se ha observado [13] que al incidir un haz linealmente polarizado, las fibras con una orientación ortogonal al estado de polarización no son visibles.

La luz proveniente de dicho proceso es recolectada por otro objetivo de iguales características que el anterior, que colima la luz. Posteriormente, a la salida del segundo objetivo, se coloca un filtro de color, que bloquea el remanente del haz de bombeo en 810 nm, y un par de filtros pasabanda que restringen la detección de fotones cerca de 400 nm.

La luz proveniente del proceso de SHG es enfocada con una lente de 5 cm de distancia focal (L1) que funciona como ocular, a una cámara CCD a color con un rango de 350 a 830 nm que recupera la imagen. Cabe destacar, que el ocular amplía la imagen del objetivo, pero no aumenta la resolución del sistema.

Con este arreglo experimental se realizó un escaneo de las muestras, con lo que fue posible, hacer varias fotografías de distintas zonas de cada una de las muestras.

2.2. Generación de SPDC

El montaje experimental para producir la conversión paramétrica descendente espontánea en las fibras de colágeno se puede observar en la figura 2.2.

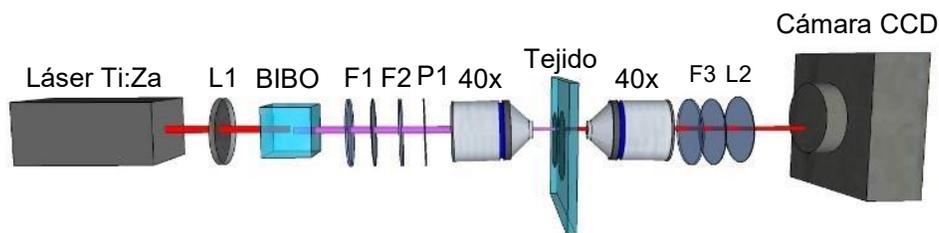


Figura 2.2: Arreglo experimental para obtener SPDC. Detalles explicados en el texto.

Mediante el empleo de una lente (L1) se enfoca el laser (Ti:Za) descrito en la sección anterior, en un cristal no lineal (BBO) que dobla la frecuencia del láser para obtener un haz centrado en 405 nm con una potencia promedio de 10 mW medida después de colocar un par de filtros de color (F1) y pasabanda centrados en 400 nm (F2) que bloquean el remanente del haz de bombeo. Tal y como en el caso anterior, se colo-

ca una placa de un cuarto de onda (P1) para generar luz circularmente polarizada.

La luz resultante se enfoca en la muestra con el objetivo de apertura numérica de 0.65 mientras que con el otro objetivo se colecta la luz proveniente del proceso de *SPDC* que tiene lugar dentro de la muestra.

En esta ocasión, se usó un par de filtros pasabanda centrados en 810 nm con un ancho espectral de 40 nm (F3) para filtrar sólo aquellos fotones provenientes de un posible proceso de *SPDC*. Para esta parte del experimento se colocaron dos filtros iguales debido a que un solo filtro no fue suficiente para filtrar los fotones remanentes.

La luz resultante es captada por la cámara CCD con la ayuda de una lente de 5 cm de distancia focal (L2) que hace las veces de ocular, para la reconstrucción de la imagen. Al igual que en el caso anterior, se hace un barrido de la muestra con el fin de obtener fotografías de varias zonas de una misma muestra.

2.3. Detección de pares en coincidencia

Ya que se trabajó con *SPDC*, es importante comprobar que se tienen coincidencias entre las parejas de fotones creadas. El arreglo experimental para tal fin, se muestra en la figura 2.3

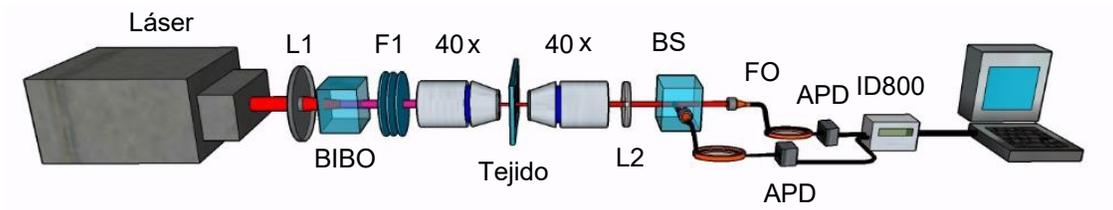


Figura 2.3: Arreglo experimental para obtener SPDC. Detalles explicados en el texto

En esta etapa del experimento, se hace el mismo montaje que en el apartado anterior, con algunas diferencias en el montaje del tejido y el sistema de detección.

Por un lado, la muestra se coloca en un sistema de dos motores con recorridos de 2.5 cm y pasos mínimos de 1 micra, que permiten la movilidad de la misma en dos ejes. Se definió el eje y como la dirección ortogonal a la mesa óptica (lo que permite variar la altura de la muestra.), mientras que el eje x corresponde a la dirección perpendicular al eje óptico y al eje z.

Por otro lado, el sistema de detección es distinto que en el caso anterior, ya que a la salida del segundo objetivo se coloca una lente de 5 cm (L2) frente a la cuál se encuentra un divisor de haz (BS) que separa a los fotones en dos caminos perpendiculares entre sí.

En cada salida del divisor de haz, se coloca un filtro pasabanda cen-

trado en 810 nm con un ancho espectral de 10 nm y una fibra óptica de 105 μ m de diámetro y 0.22 NA que conduce a los fotones hasta un fotodiodo de avalancha (*APD* por sus siglas en inglés) en donde cada fotón que arriva al dispositivo es convertido en un pulso eléctrico que es enviado por cable a un etiquetador de tiempos (ID800) que contabiliza los pulsos que llegan en una ventana de tiempo dada por el usuario y que en este caso se eligió de 100 ps; finalmente los resultados de este conteo son mostrados en la computadora.

De esta manera se realizan escaneos de áreas específicas de la muestra y en cada punto se van adquiriendo el número de fotones en coincidencia.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Generación de Segundo armónico

En la figura 3.1 se muestra una serie de imágenes pertenecientes a algunas zonas de la muestra 1 y que fueron adquiridas mediante el arreglo experimental mostrado en la Figura 2.1.

En las imágenes del lado izquierdo (rojas) se observa la imagen de la muestra iluminada por el haz de bombeo en 810 nm, mientras que en las imágenes del lado derecho (azules) se puede observar el proceso de SGH gracias a que se coloca, entre el objetivo y la cámara, un filtro que bloquea el remanente del bombeo.

La comparación entre las imágenes de una misma zona muestra una diferencia entre la estructura del tejido al sólo ser iluminada por el

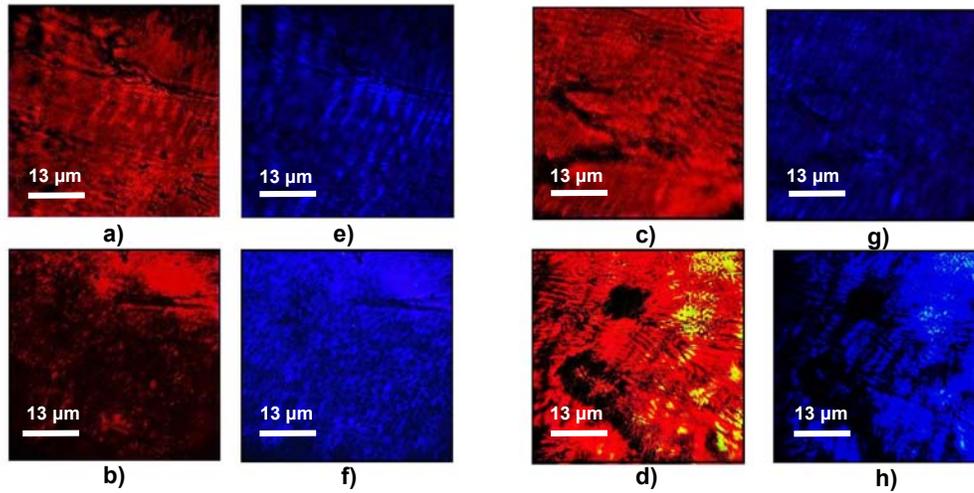


Figura 3.1: Secciones de la muestra 1 tomadas con la cámara CCD.(a-d) Iluminando con el bombeo,(e-h)usando filtros pasabandas en 400 nm.

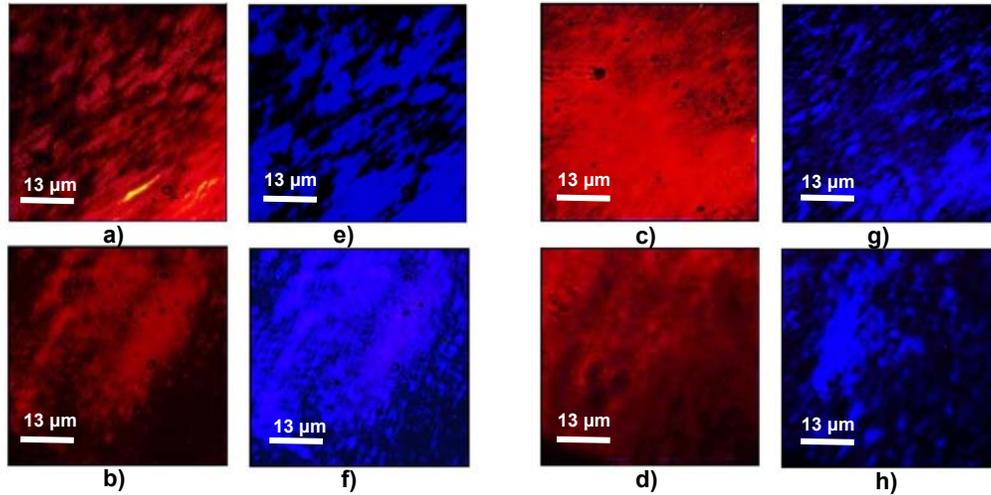


Figura 3.2: Secciones de la muestra 2 tomadas con la cámara CCD.(a-d) Iluminando con el bombeo,(e-h)usando filtros pasabandas en 400 nm.

bombeo y al producir la generación de segundo armónico.

Análogamente al caso anterior, en la figura 3.2 se muestran las imágenes pertenecientes a zonas de la muestra 2.

3.2. Conversión paramétrica descendente espontánea.

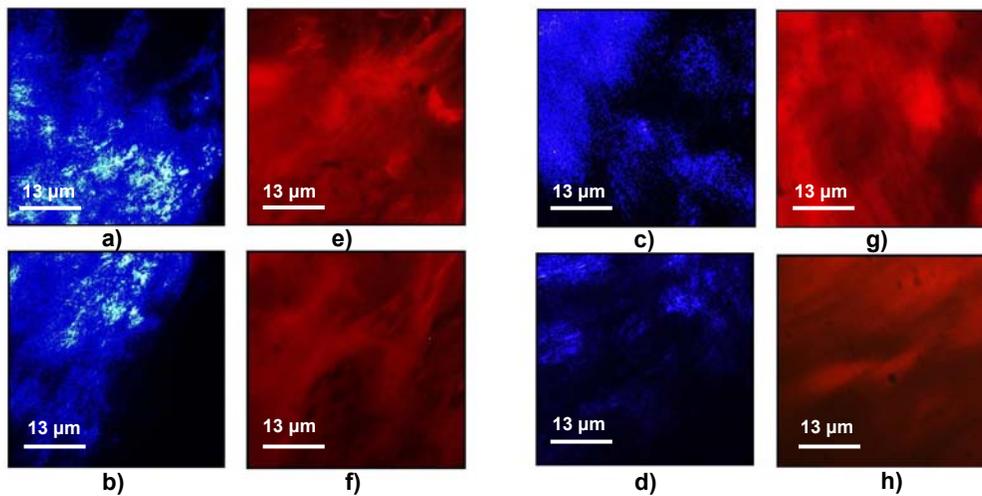


Figura 3.3: Secciones de la muestra 1 tomadas con la cámara CCD.(a-d) Iluminando con el bombeo,(e-h)usando filtros pasabandas en 800 nm.

En la figura 3.3 se muestra una serie de imágenes correspondientes a la muestra 1 obtenidas mediante el arreglo experimental mostrado en

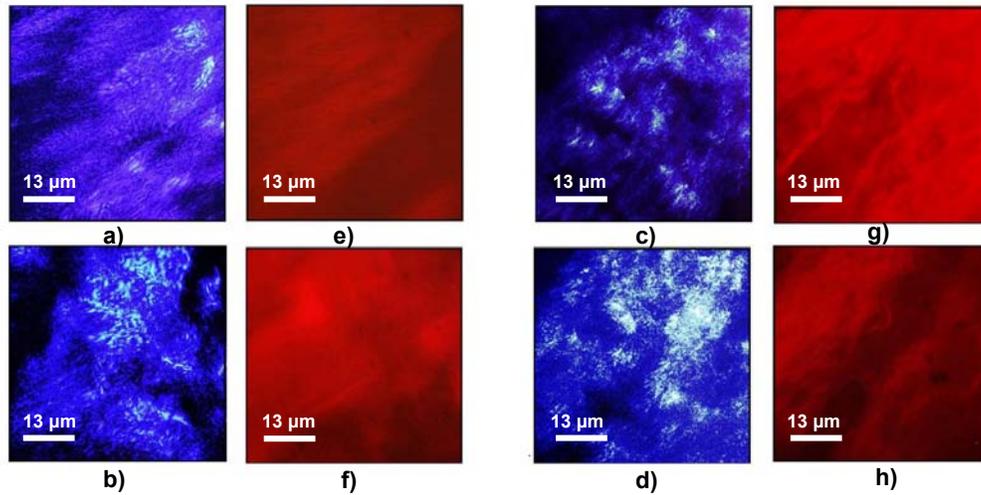


Figura 3.4: Secciones de la muestra 1 tomadas con la cámara CCD.(a-d) Iluminando con el bombeo,(e-h)usando filtros pasabandas en 400 nm.

la Figura 2.2.

Del lado izquierdo se observa el tejido iluminado por el haz de bombeo centrado en 405 nm. Del lado derecho se observó la muestra al producir SPDC.

En la figura 3.4 se presentan las imágenes de las zonas de la muestra 2.

3.3. Detección de pares en coincidencia

Las coincidencias realizadas con el tercer arreglo experimental, se muestran en la figura 3.5.

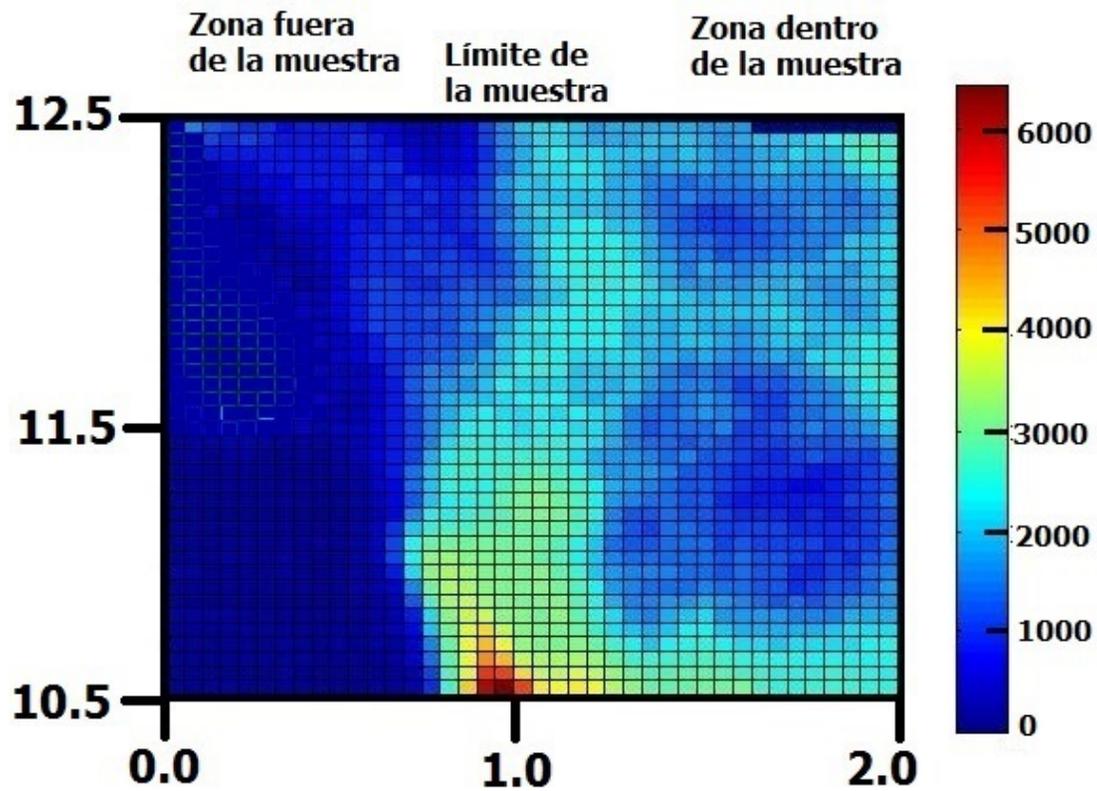


Figura 3.5: Escaneo 2D en micras de un área del portaobjetos que contiene una zona con muestra y otra sin presencia de tejido.

Para este caso, se hizo un escaneo de 2×12.5 micrometros que abarca zonas dentro de la muestra y fuera de ella.

Se puede observar que fuera de la muestra las cuentas en coincidencia son muy cercanas a 0, en el contorno de la muestra son de 2500, llegando a 6000 en algunas zonas dentro de la muestra, lo que indica una mayor concentración de fibras de colágeno. Entonces, al haber dos órdenes de magnitud en el número de cuentas dentro y fuera de la muestra, podemos asegurar que la muestra produce parejas de fotones.

Capítulo 4

Análisis de Datos

Para el análisis de datos de las imágenes obtenidas con ambos procesos se reprodujeron los tres análisis de imágenes más utilizados en el estudio de la generación de segundo armónico en tejidos biológicos que buscan ser cuantitativos con el fin de proporcionar una mayor precisión al diagnóstico médico realizado. [1] [3] [15].

La muestra al ser analizada no tiene ninguna orientación preferencial, ya que de hecho, los procesos generados en la muestra se irradian en todas direcciones. De acuerdo a trabajos previos en tendones de porcinos [1], los ángulos de orientación de las muestras se determinan entre 0 y 180 grados con respecto a la horizontal, sin embargo, los rangos que delimitan si el tejido está enfermo o sano son complementarios en el sentido de ser útiles sin importar la posición del tejido en el sistema. Así, si el tejido está sano, la orientación preferencial de los tejidos

será de 70 a 110 grados, y si el tejido está enfermo, su orientación estará en los rangos de 0 a 70 grados y de 110 a 180 grados.

4.1. Método 1. Medición directa

Las imágenes obtenidas de la cámara CCD se colorean con ayuda de un software en escala de grises para evidenciar los detalles. De esta imagen, se seleccionan al azar ciertas de zonas de $13 \mu m$ que contengan una muestra representativa de las fibras contenidas en la muestra y se convierten a una imagen binaria. Posteriormente, las imágenes se analizan en un programa que busca los dos contornos más largos de las fibras, se obtiene el ángulo de inclinación y se promedian (ver apéndice B).

4.1.1. Generación de Segundo Armónico

En las figuras 4.1 y 4.2 se observan las imágenes obtenidas para cada muestra con la cámara CCD de la generación de segundo armónico en escala de grises. Los recuadros en rojo representan las zonas elegidas, mientras que los recuadros a la derecha son la imagen binaria de cada una de las zonas en rojo.

Utilizando este método se analizaron 100 zonas tomadas de diferen-

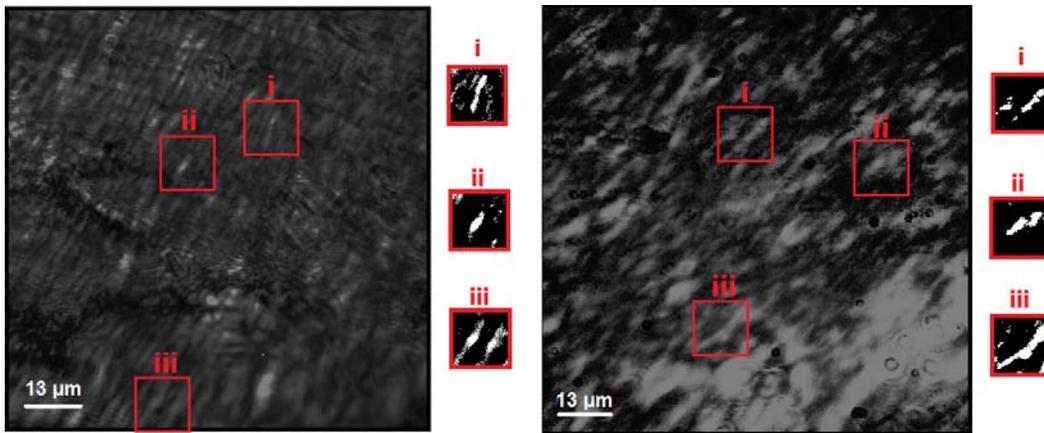


Figura 4.1: SGH en la muestra 1 e imágenes binarias de las zonas elegidas. Figura 4.2: SGH en la muestra 2 e imágenes binarias de las zonas elegidas.

tes áreas para cada una de las muestras. En las gráficas 4.3 y 4.4 se muestran las gráficas de frecuencia de las orientaciones de las fibras para las muestras 1 y 2 respectivamente.

De los histogramas, se observa que el rango de las orientaciones en la muestra 1 va de 30 a 70 grados, mientras que para la muestra 2 es de 30 a 0 grados, principalmente. A estos histogramas se les realiza un ajuste gaussiano, ya que el ancho de la gaussiana esta directamente relacionada con el grado de organización de las fibras de colágeno, de esta manera, si el ancho de la curva ajustada es menor a 10 grados, se puede hablar de organización en las fibras y entre más grande sea el ancho de la gaussiana significa que hay un mayor grado de desorganización en las fibras [4]. En las gráficas 4.5 y 4.6 se observan los ajustes gaussianos que se hicieron a los histogramas 1 y 2.

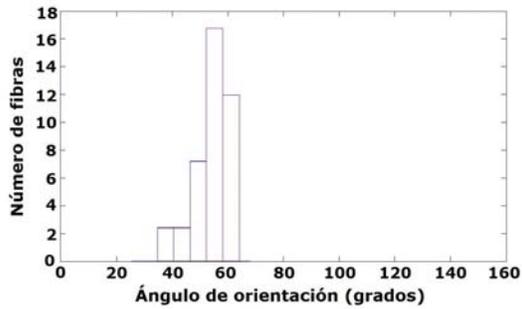


Figura 4.3: Histogramas de orientación para la muestra 1.

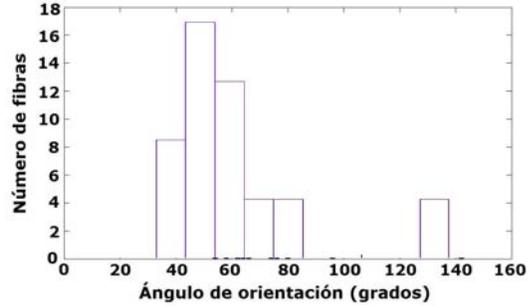


Figura 4.4: Histogramas de orientación para la muestra 2.

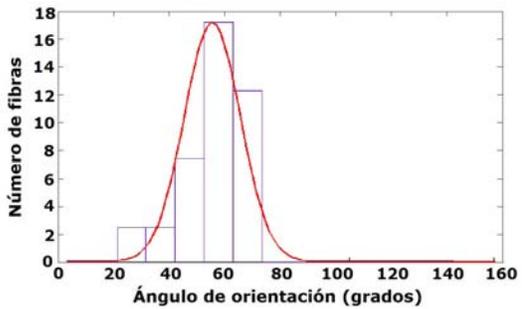


Figura 4.5: Histogramas de orientación para la muestra 1.

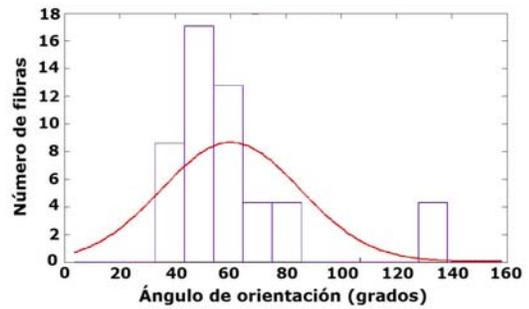


Figura 4.6: Histogramas de orientación para la muestra 2.

El ajuste correspondientes a la muestra 1 evidencia que el centro de la curva se encuentra en 53 grados con una desviación estándar de 10 y para la muestra 2 el centro está en 56 con un ancho de 24.

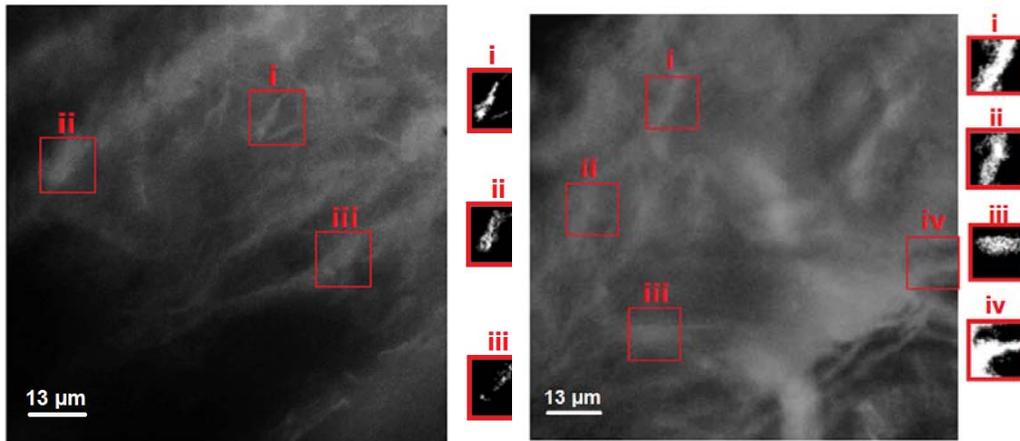


Figura 4.7: SPDC en la muestra 1 e imágenes binarias de las zonas elegidas. Figura 4.8: SPDC en la muestra 2 e imágenes binarias de las zonas elegidas.

4.1.2. Conversión paramétrica descendente espontánea.

Se siguió el mismo procedimiento que para la generación de segundo armónico. Así las imágenes 4.7 y 4.8 muestran la imagen de la muestra 1 y la muestra 2 respectivamente en escala de grises con las zonas elegidas marcadas en rojo y sus correspondientes imágenes binarias del lado derecho.

Los histogramas correspondientes a las imágenes 4.7 y 4.8 son las figuras 4.9 y 4.10 respectivamente.

De los histogramas observamos que el rango de orientación prefe-

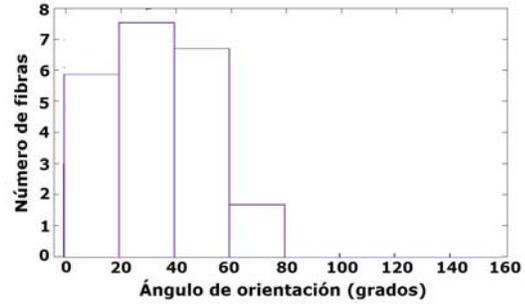
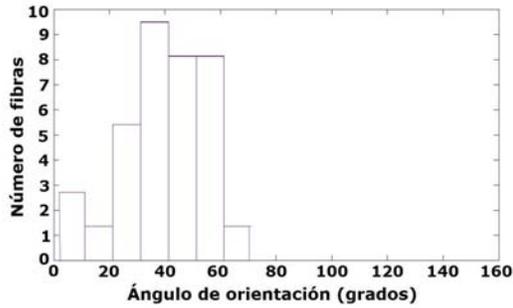


Figura 4.9: Histogramas de orientación para la muestra 1.

Figura 4.10: Histogramas de orientación para la muestra 2.

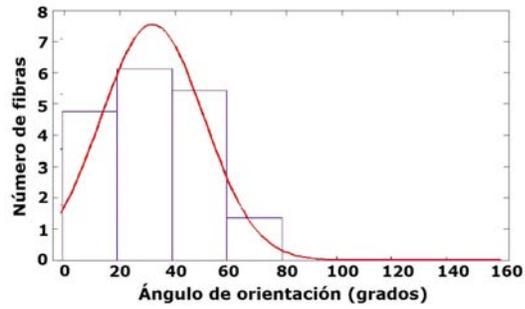
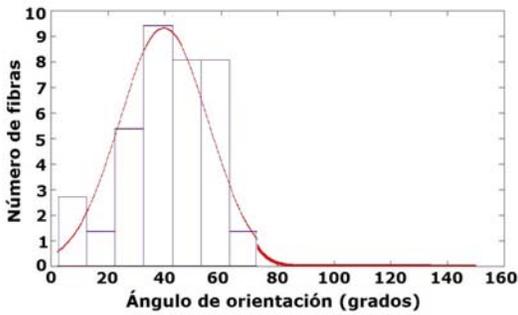


Figura 4.11: Histogramas de orientación para la muestra 1.

Figura 4.12: Histogramas de orientación para la muestra 2.

rencial de las fibras en la muestra 1 es de 0 a 70 y para la muestra 2 de 0 a 80 grados. Los ajustes gaussianos se observan en la figura 4.1.2.

El ajuste para el histograma de orientaciones de las fibras de la muestra 1 da como resultado que el centro está en 37 grados con un ancho de 15 y para la muestra 2 en 33 con una desviación estándar de 19.

Comparando estos resultados con los obtenidos con el proceso de SHG notamos que para ambas muestras la orientación preferencial es distinta para ambos procesos.

De acuerdo con el criterio de orientación mostrado en [1] las fibras sanas para este tipo de tejido se encuentran a una orientación de entre 85 a 125 grados. Por lo tanto, de acuerdo a este método ambos tejidos están enfermos.

4.2. Método 2. Transformada de Fourier

Tomando en cuenta el post procesamiento de datos del método de medición directa, se retoman las imágenes binarias. De estas imágenes binarias se obtiene la transformada de Fourier de la imagen que nos proporciona la orientación de los promedios de los bordes de la imagen original.

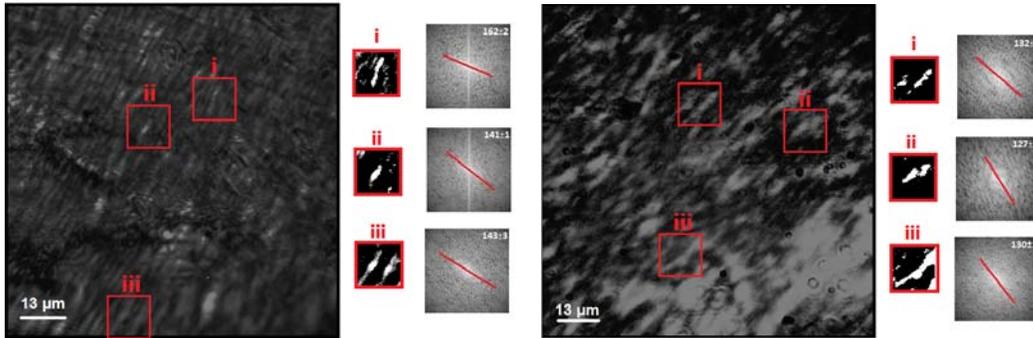


Figura 4.13: SGH, imágenes binarias y transformadas de Fourier en la muestra 1. Figura 4.14: SGH, imágenes binarias y transformadas de Fourier en la muestra 2.

4.2.1. Generación de Segundo Armónico

En las figuras 4.13 y 4.14 se observa un ejemplo de las imágenes binarias con sus respectivas transformadas y una línea de tendencia que se obtiene de tomar la zona de mayor intensidad central de la transformada. De esta línea de tendencia sólo nos interesa la pendiente que está estrechamente relacionada con el ángulo de inclinación. En la imagen, se observa el ángulo de orientación con su incertidumbre calculada por el programa que traza la línea de tendencia.

Debido a que la transformada da la orientación perpendicular que buscamos, se hizo una corrección a los datos (restandoles 90 grados) para obtener la orientación real de las fibras. En las imágenes 4.15 y 4.16 se muestran los histogramas de ambas muestras.

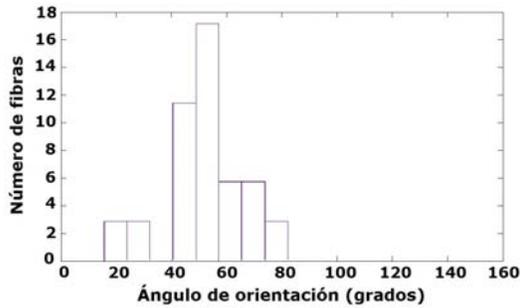


Figura 4.15: Histogramas de orientación para la muestra 1.

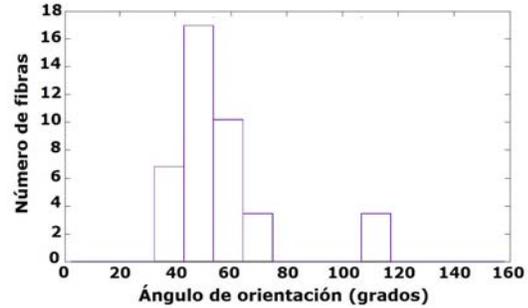


Figura 4.16: Histogramas de orientación para la muestra 2.

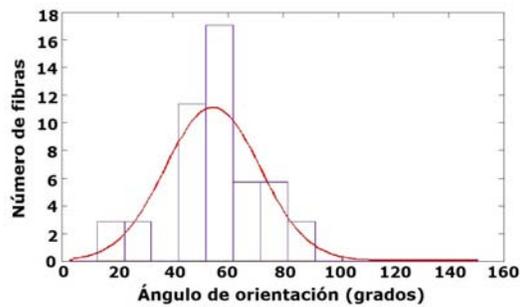


Figura 4.17: Histogramas de orientación para la muestra 1.

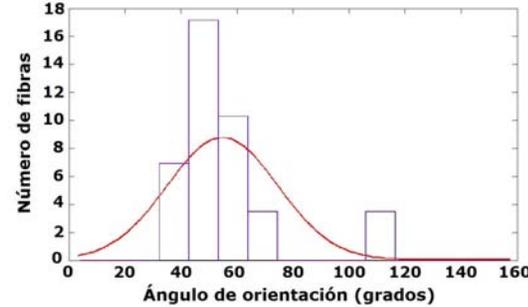


Figura 4.18: Histogramas de orientación para la muestra 2.

Para la muestra 1 se tiene un rango de orientación de 15 a 80 grados mientras que para la muestra 2 de 36 a 70 grados principalmente. A estos gráficos también se les hizo un ajuste que puede verse en la gráfica 4.2.1.

El ajuste de la distribución gaussiana de la muestra 1 señala un máximo de 52 con una desviación estándar de 17 y la muestra 2 señala

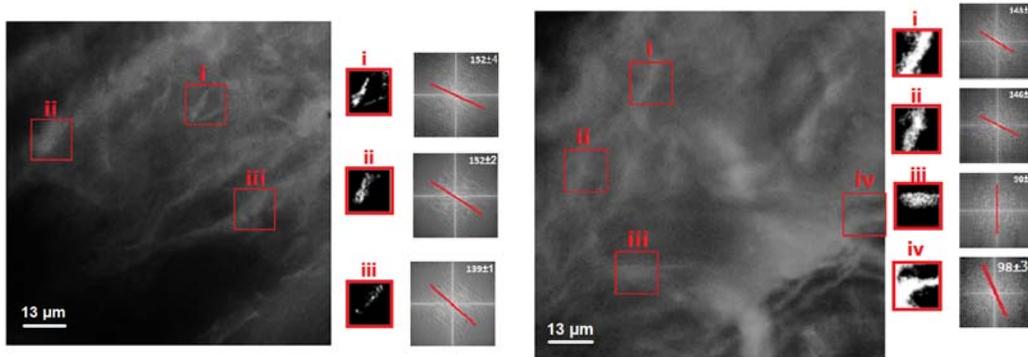


Figura 4.19: SPDC en la muestra 1 e Figura 4.20: SPDC en la muestra 2 e imágenes binarias de las zonas elegidas. imágenes binarias de las zonas elegidas.

un ajuste gaussiano con un máximo en 51 y un ancho de 19.

4.2.2. Conversión paramétrica descendente espontánea.

Se utilizó la misma metodología mostrada anteriormente. Así, las figuras 4.19 y 4.20 representan una área específica de cada una de las muestras, las imágenes binarias de las zonas elegidas al azar, las transformadas de Fourier de dichas zonas binarias y el ajuste lineal de la transformada de Fourier.

Los histogramas que resumen el análisis de este método para las mismas 100 zonas (por tejido) elegidas que se decidieron en el método 1 se observan en las gráficas 4.21 y 4.22.

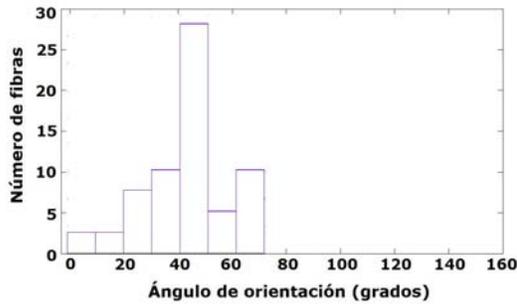


Figura 4.21: Histogramas de orientación para la muestra 1.

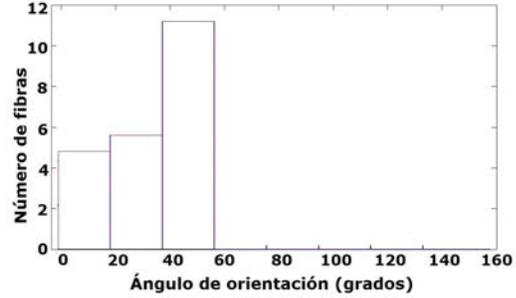


Figura 4.22: Histogramas de orientación para la muestra 2.

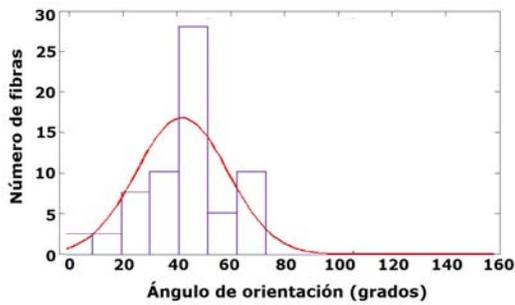


Figura 4.23: Histogramas de orientación para la muestra 1.

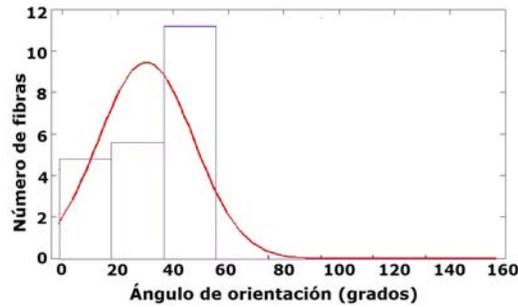


Figura 4.24: Histogramas de orientación para la muestra 2.

La orientación preferencial para a muestra 1 está entre 0 y 70 grados mientras que para la muestra 2 es de 0 grados a 60 grados. Los ajustes correspondientes a estos gráficos están en las figuras 4.23 y 4.24.

El primer ajuste muestra una gaussiana con centro en 41 y ancho de 16, mientras que la segunda tiene un máximo en 33 con una des-

viación estándar de 18.

Comparando estos resultados con los obtenidos para SHG tenemos que aunque los máximos, en el caso de la muestra 1, están en 52 y 41 grados, quedan dentro de la incertidumbre. Lo mismo sucede para la muestra 2, pues para los dos métodos, los máximos se encuentran en 51 y 33 grados respectivamente. En conclusión y de acuerdo a trabajos reportados anteriormente [3] se podría decir que los dos tejidos analizados mediante este método están enfermos.

Una comparación entre estos dos métodos nos dice que el ángulo de orientación de una misma zona analizada por los dos métodos tiene una discrepancia menor al 5% en 43.9% del total de las zonas, menor al 10% en 63.2% de las zonas y mayor al 30% en 9.5% del total de las zonas analizadas, lo cual nos indica que ambos métodos para una misma zona nos dan valores del ángulo cercanos con una discrepancia de a lo más 6 grados. Las discrepancias se deben a las características de las zonas elegidas.

4.3. Método 3. Área completa.

El último método consiste en tomar la fotografía completa y cuadrangular con cuadros de 13 micras de lado (por congruencia con los dos

métodos anteriores). Cada zona obtenida es analizada de manera independiente y puede caer en alguna de las tres categorías que se explican a continuación.

1. Zona oscura: Es una zona en la que no se detecta luz proveniente del proceso que se está llevando a cabo y se debe a la poca o nula presencia de fibras de colágeno.

2. Zona isotrópica: Es una zona en la que se observan fibras de colágeno con distintas orientaciones pero no hay una orientación preferencial.

3. Zona anisotrópica: Es una zona en la que las fibras de colágeno tienen una orientación bien definida.

Utilizando este método y de acuerdo a trabajos anteriores [2] los tejidos sanos deben tener mayoritariamente zonas isotrópicas y en contraste, los tejidos enfermos deben tener más zonas anisotrópicas.

4.3.1. Generación de Segundo Armónico

En las imágenes 4.25 y 4.26 se muestran dos imágenes de la muestra 1 con los diferentes tipos de zona a las que pertenecen. En la imagen, las zonas oscuras están representadas con una cruz roja, las zonas

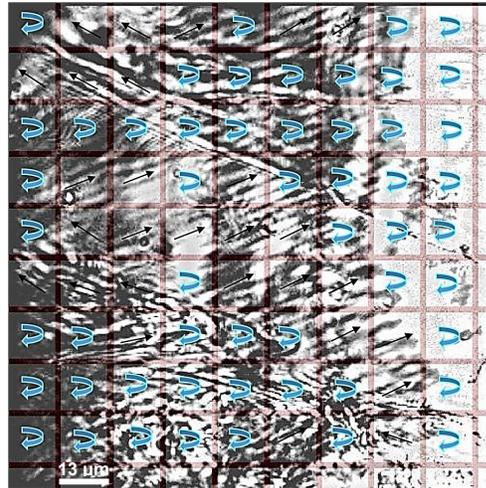
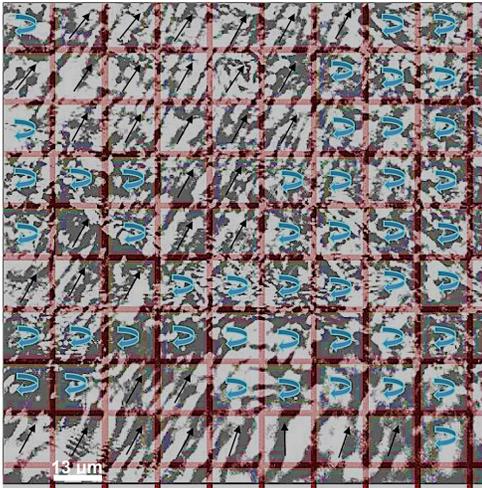


Figura 4.25: SGH en la muestra 1. Figura 4.26: SGH en la muestra 2.

isotrópicas con una flecha redonda y las anisotrópicas con flechas que además llevan la orientación de las fibras en esa zona.

Para la imagen 4.25 no hay zonas oscuras, pero hay 47 zonas isotrópicas y 34 anisotrópicas, mientras que para la imagen 4.26 hay 51 zonas isotrópicas 28 anisotrópicas sin presencia de zonas oscuras.

A grandes rasgos, esto nos indica que el tejido 1 está enfermo. Para hacer una comparación con los métodos previos, se realizó la gráfica de frecuencias de orientación de las zonas anisotrópicas para ambos casos (gráficas 4.27 y 4.27).

Los ajustes arrojan que los centros están en 60 y 36 grados con an-

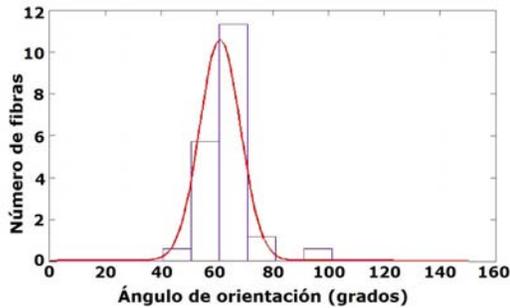


Figura 4.27: Histogramas de orientación para la muestra 1.

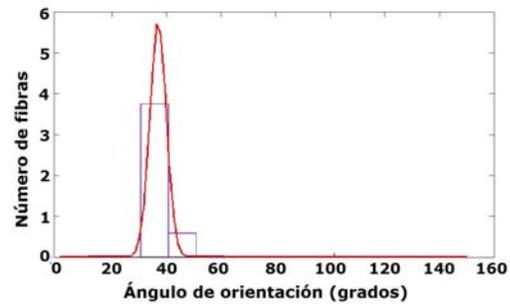


Figura 4.28: Histogramas de orientación para la muestra 1.

chos de 7 y 3 grados respectivamente y cuyo promedio es consistente con lo reportado en el método 1 y 2. En las imágenes 4.29 y 4.30 se observan las imágenes correspondientes a la muestra 2.

De la imagen 4.29 se tienen 42 zonas isotrópicas y 40 anisotrópicas, mientras que la imagen 4.30 presenta 46 zonas isotrópicas y 35 anisotrópicas, sin zonas oscuras en los dos casos. Los histogramas y sus ajustes se muestran en la figura 4.31 y la figura 4.32.

Los ajustes indican que se tienen centros en 41 y 47 con una desviación estándar de 10 y 6 grados respectivamente. Lo que es consistente con lo anteriormente reportado. Por lo tanto, el tejido 2 también está enfermo.

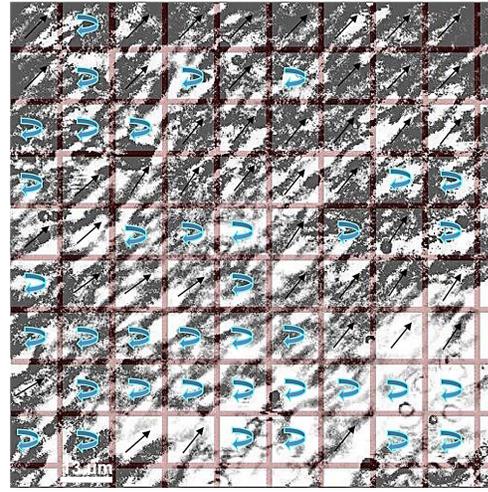
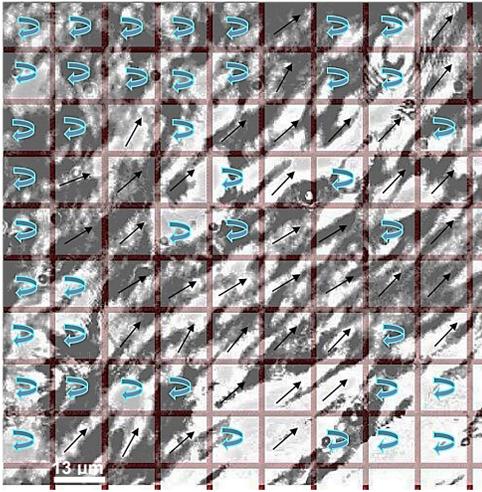


Figura 4.29: Histogramas de orientación para la muestra 1.

Figura 4.30: Histogramas de orientación para la muestra 2.

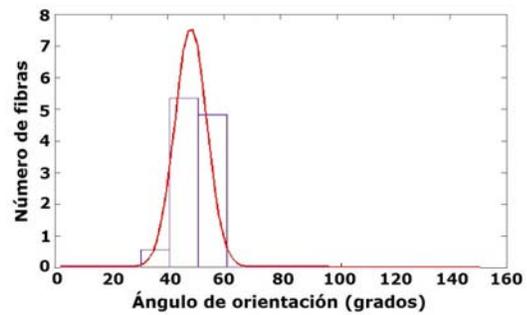
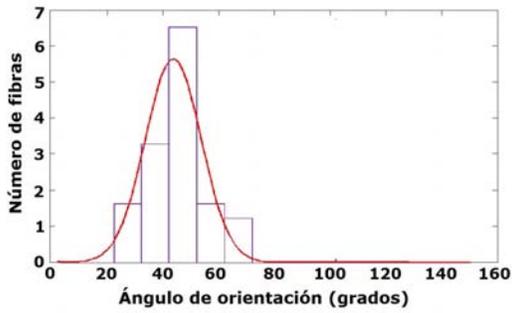


Figura 4.31: Histogramas de orientación para la muestra 1.

Figura 4.32: Histogramas de orientación para la muestra 2.

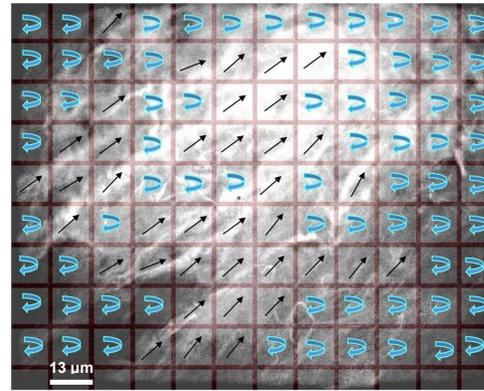
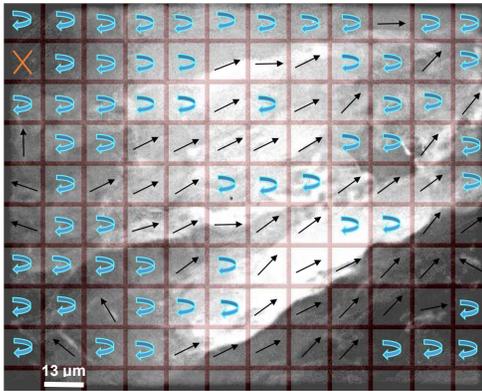


Figura 4.33: Histogramas de orientación para la muestra 1.

Figura 4.34: Histogramas de orientación para la muestra 2.

4.3.2. Conversión paramétrica descendente espontánea.

Las imágenes se observan en las figuras 4.33 y 4.34.

La imagen 4.33 tiene 1 zona oscura, 57 isotrópicas y 50 anisotrópicas, y la imagen 4.34 tiene 70 zonas isotrópicas y 38 anisotrópicas. Los histogramas están en 4.35 y 4.36 respectivamente.

En el primer caso el máximo es 41 grados con una desviación de 29 y en el segundo caso es de 39 con un ancho de 9. Ambos datos concuerdan con lo obtenido previamente.

Las figuras 4.37 y 4.38 tiene las imágenes de la muestra 2.

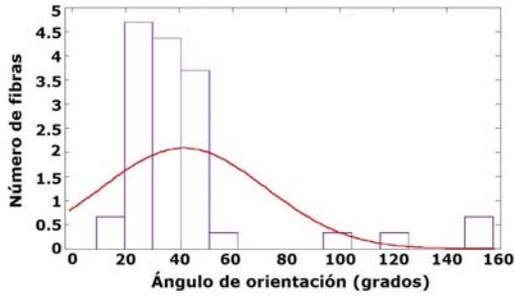


Figura 4.35: Histogramas de orientación para la muestra 1.

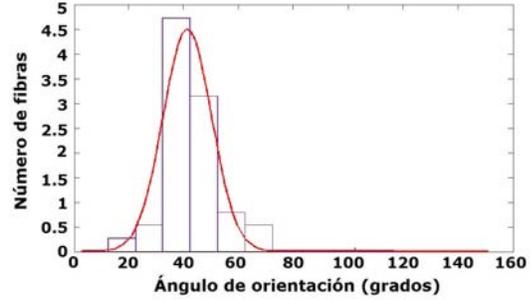


Figura 4.36: Histogramas de orientación para la muestra 2.

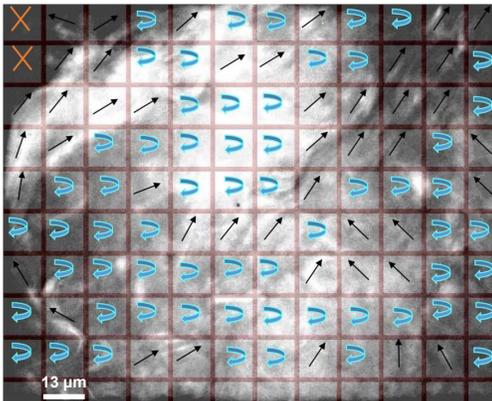


Figura 4.37: Histogramas de orientación para la muestra 1.

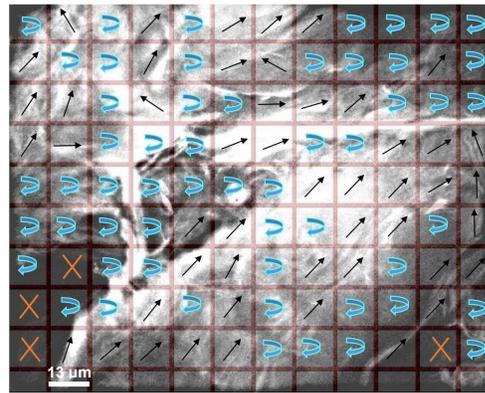


Figura 4.38: Histogramas de orientación para la muestra 2.

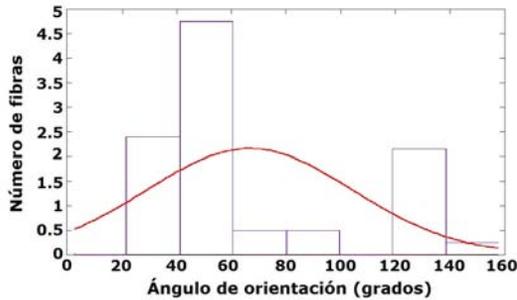


Figura 4.39: Histogramas de orientación para la muestra 1.

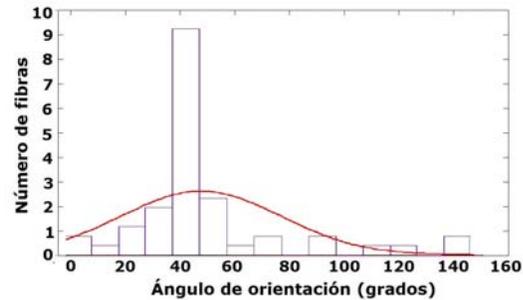


Figura 4.40: Histogramas de orientación para la muestra 2.

La imagen 4.37 presenta 2 zonas oscuras, 61 isotrópica y 45 anisotrópicas, mientras que la imagen 4.38 tiene 4 zonas oscuras, 54 isotrópicas y 50 anisotrópicas. Los histogramas se pueden ver en las figuras 4.39 y 4.40.

Para este caso las gaussianas ajustadas tienen máximos en 66 y 38 con anchos de 39 y 29 respectivamente.

4.4. Discusión de Resultados

A continuación, se muestra un 4.1 con una recopilación de los resultados obtenidos del ajuste de las gaussianas y su desviación estándar para cada caso. Cabe destacar que en el caso del método 3, se promediaron los resultados obtenidos para las dos imágenes de cada muestra.

Tipo de Proceso	Número de Muestra	Método		
		Método 1	Método 2	Método 3
SHG	1	53 ± 10	52 ± 17	48 ± 13
	2	56 ± 24	51 ± 19	44 ± 16
SPDC	1	37 ± 15	41 ± 16	40 ± 35
	2	33 ± 19	33 ± 18	58 ± 40

Cuadro 4.1: Compenio de resultados.

Los dos primeros métodos tienen la desventaja de necesitar varias zonas de la misma muestra para poder realizar el análisis. Aunque tienen la ventaja de ser cuantitativos y decir con precisión cuál es la orientación preferencial de las zonas elegidas.

Por su parte, el último método, aunque cualitativo, tiene la ventaja de poder analizar cada zona de manera independiente y al hacer una estadística local y en su caso, detectar irregularidades en áreas específicas del tejido, lo que indicaría la presencia de microheridas locales que son el antecedente de la tendinitis.

Por si fuera poco, este último método no necesita valores exactos de orientación de las fibras, lo que lo convierte en un método más simple y eficiente.

El método de la Transformada de Fourier por su parte, presenta máximos locales mayores que se deben al promedio de orientaciones que

hacen de todas las fibras en una misma zona, por lo que varias áreas pueden caer en el mismo valor de orientación.

La SHG es un proceso bien conocido y explorado en el mundo desde hace varios años. En el caso de la generación de parejas de fotones por SPDC el montaje es complicado y delicado principalmente al medir coincidencias.

Debido al proceso de preparación de la muestra, ésta puede emitir luz en varias longitudes de onda, al observar con una cámara CCD la señal recolectada, ésta observar todos los fotones que le llegan, sin discriminar el proceso de origen. Sin embargo, al realizar SPDC los fotones generados se hacen pasar por fotodiodos de avalancha y un etiquetador de tiempos con el fin de discriminar a las parejas de fotones provenientes de un mismo proceso. Así, al tener coincidencias, se garantiza que los fotones detectados provienen de SPDC no importando que haya presencia de fotones originarios de otro tipo de procesos.

Otra diferencia importante, es que los rangos de orientaciones preferenciales de las fibras son compactas en el caso de SHG ya que el rango máximo es de 50 grados, mientras que los rangos de SPDC son más extensos siendo mayores a 60 grados. Esto, puede ser un indicador de que con SPDC es más fácil detectar tejidos enfermos, ya que se puede observar una mayor desorganización en las orientaciones de las fibras, lo que además tiene como consecuencia que no haya máximos

elevados en las curvas que se presentaron en este trabajo.

Cómo resultado del análisis realizado, se puede asegurar que las fibras de colágeno observadas en las dos muestras presentan una orientación preferencial, y aunque los valores de estas orientaciones son distintos para *SHG* y *SPDC* ambos caen en los rangos reportados para tendones enfermos [1]. Por otro lado, el ancho de las gaussianas ajustadas a los histogramas de orientaciones son mayores a 10 grados, lo que indicaría que los tejidos están enfermos.

Capítulo 5

Conclusiones

1. Se diseñó un arreglo experimental que adoptó material utilizado en óptica cuántica para reproducir satisfactoriamente la generación de segundo armónico en fibras de colágeno presentes en muestras biológicas.

2. Aprovechando la susceptibilidad de segundo orden que presenta la muestra, se utilizó como medio no lineal para producir parejas de fotones mediante proceso paramétrico descendente espontáneo.

3. Fue posible asegurar que el colágeno de la muestra produce SPDC al hacer mediciones en coincidencia que arrojaron que hay una diferencia de 3 órdenes de magnitud en el número de cuentas en coincidencia

en zonas dentro de la muestra y fuera de ella.

4. Mediante el uso de 3 métodos distintos se analizaron las imágenes obtenidos para los dos procesos.

5. Se determinó que, de los tres métodos utilizados, el que mayor ventajas presenta es el tercero, ya que hace uso de un análisis cualitativo local permitiendo un caracterización detallada de cada tejido.

6. Como resultado del estudio realizado mediante SHG y SPDC analizando los resultados con tres métodos distintos, se puede concluir que las dos muestras analizadas presumiblemente presentan tendinitis. Como se mencionó en el capítulo 1, sección 1.3, se presenta el calculo de β_{ijk}

Capítulo 6

Apéndices

6.1. Apéndice A

Se muestra el cálculo de β_{ijk} haciendo uso de la teoría de perturbaciones.

Consideremos que el campo eléctrico \vec{E} de un láser a una frecuencia ω es:

$$\vec{E} = E_\omega \sin \omega t = \left(\frac{1}{2i} \right) E_\omega (e^{i\omega t} - e^{-i\omega t}) \quad (6.1)$$

y que el hamiltoniano perturbado es:

$$H' = -\frac{e\vec{r}}{2i} E_\omega (e^{i\omega t} - e^{-i\omega t}) \quad (6.2)$$

donde $e\vec{r}$ es el operador dipolo. La ecuación del dipolo inducido de segundo orden, dado por:

$$\delta_\mu^2 = -\langle \psi^+ | e\vec{r} | \psi^+ \rangle \quad (6.3)$$

donde \vec{r} representa la suma sobre todas las coordenadas electronicas.

De lo cual se obtiene:

$$\delta_i^2(2\omega) = \delta_{\mu i}^2(2\omega) e^{i\omega t} + \delta_{\mu i}^2(2\omega) e^{-i\omega t} \quad (6.4)$$

y debido a que

$$\delta_{\mu i}^2(2\omega) = \beta_{ijk}(-2\omega; \omega, \omega) E_j E_k \quad (6.5)$$

entonces

$$\begin{aligned} \delta_{\mu i}^2(2\omega_+) &= \beta_{ijk}(-2\omega; \omega, \omega) E_j E_k e^{i\omega t} + \beta_{ijk}(-2\omega; \omega, \omega) E_j E_k e^{-i\omega t} \\ &= 2\beta_{ijk}(-2\omega; \omega, \omega) E_j E_k \cos(2\omega t) \end{aligned} \quad (6.6)$$

$$= \beta_{ijk}^{SHG} E_j E_k \cos(2\omega t) \quad (6.7)$$

6.2. Apéndice B

A continuación se muestra el procedimiento para obtener los ángulos de orientación de las fibras de colágeno.

Una vez obtenida la imagen con la cámara CCD, se convierte a escala de grises utilizando la siguiente configuración, $\text{gray}=0.333 \text{ RED}+0.5 \text{ GREEN}+0.1666 \text{ BLUE}$ (imagen 6.1a) y a continuación se binariza (figura 2b) para lo cual se calcula el umbral de transformación de la función

que convierte la imagen a binaria.

Posteriormente, se reconocen el número de elementos dentro de la imagen binaria (los distintos elementos se muestran en la figura 6.1c con diferentes colores), se elige el elemento que sobresalga (ya que corresponde a una fibra de colágeno) y se obtienen sus propiedades como el área y el tamaño de las aristas que mejor se ajuste a la silueta de la fibra.

Después, se escogen las aristas más largas y se mide el ángulo que forma cada arista con la horizontal (figura 6.1d). Los dos ángulos resultantes se promedian (a y b en la figura 6.1d).

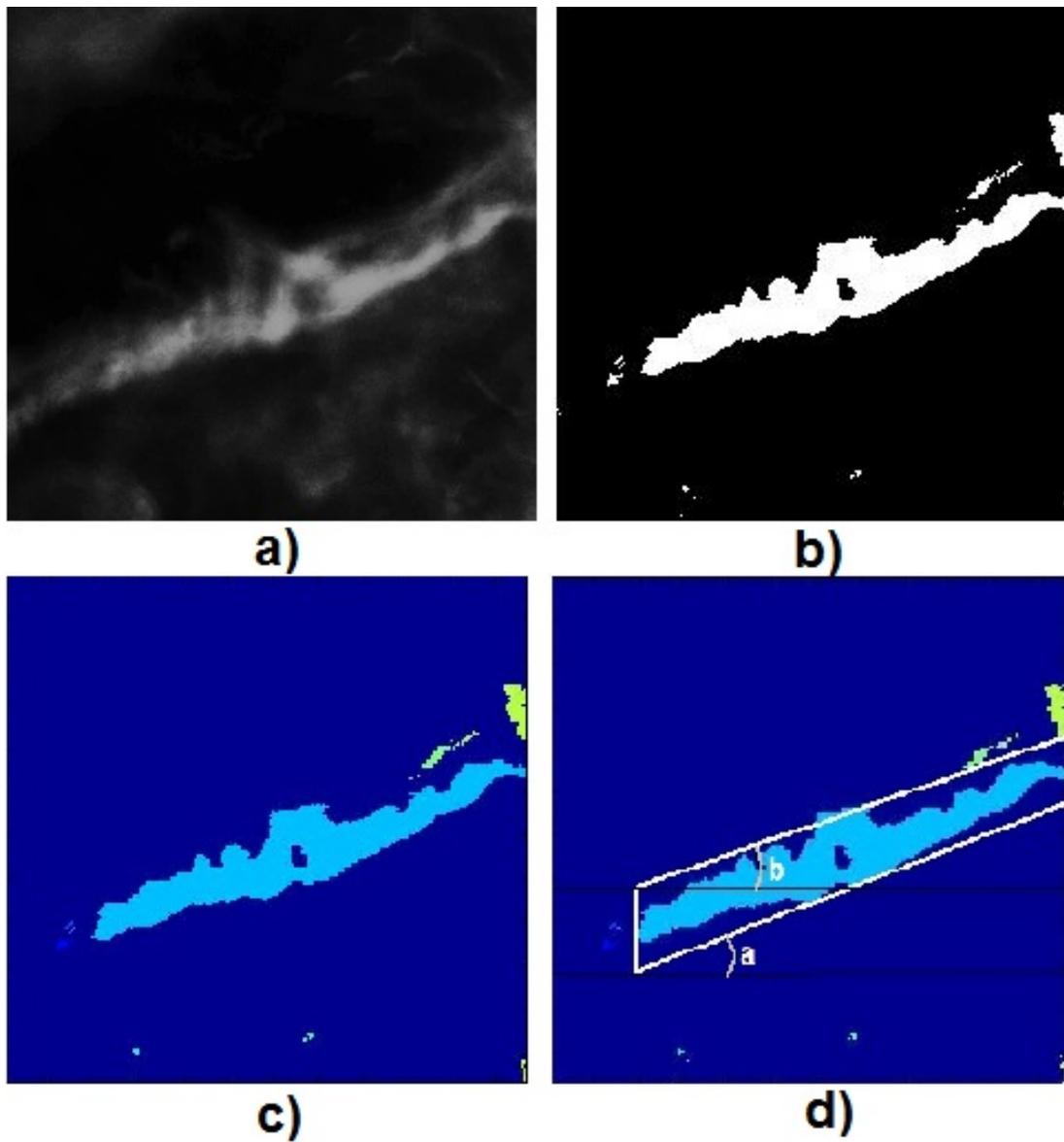


Figura 6.1: a) Imagen en escala de grises. b) Imagen binaria. c) Distintos elementos de la imagen. d) Aristas alrededor de la fibra de colágeno y los ángulos que hacen con respecto a la horizontal.

Bibliografía

- [1] MAYANDI SIVAGURU, SUSHMITHA DURGAM, RAGHU AMBEKAR, DAVID LUEDTKE, GLENN FRIED, ALLISON STEWART, AND KIMANI C. TOUSSAINT, JR. *Quantitative analysis of collagen fiber organization in injured tendons using Fourier transform-second harmonic generation imaging*. Opt. Express 24, 24983 (2010).
- [2] KEIKHOSRAVI, ADIB; BREFELDT, JEREMY; SAGAR, MD ABDUL KADER; ELICEIRI, KEVIN. *Second-harmonic generation imaging of cancer*. Methods in cell biology. 123C. 531-546. 10.1016/B978-0-12-420138-5.00028-8 (2014).
- [3] RAGHU AMBEKAR RAMACHANDRA RAO, MONAL R. MEHTA, AND KIMANI C. TOUSSAINT, JR. *Fourier transform-second-harmonic generation imaging of biological tissues*. Opt. Express 17, 14534 (2009).
- [4] S. G. STANCIU, F. J. ÁVILA, R. HRISTU, J. M. BUENO. *A study on image quality in polarization-resolved second harmonic generation microscopy*. Scientific reports, 7(1), 15476.

-
- [5] B.E.A SALEH, M.C. TEICH. *Fundamentals of photonics..* Wiley, 2007, Capítulo 12.
- [6] ALEXEI V. FINKELSTEIN, OLEG B. OTITSYN. *Protein Physics*. Academic Press, Rusia, 2002. Capítulo 2.
- [7] AHMED H. ZEWAİL. *Physical Biology. From atoms to medicine*. Ahmed H. Zewail (Caltech), (2008). Capítulos 1,2 y 3.
- [8] VALENTIN G. DMITRIV, G AGIK G. GURDZADYAN, AND DAVID N. NIKOGOSYAN. *Handbook of Nonlinear Optical Crystals*. Springer Series in Optical Sciences. Springer, Tercera edición, 1999.
- [9] MÓNICA MALDONADO TERRÓN *AVANCES EN LA TÉCNICA DE ADQUISICIÓN DE IMAGENES CON UNA CÁMARA SENSIBLE A DETECTAR FOTONES INDIVIDUALES*. Tesis de licenciatura, México, 2016.
- [10] DAVID Z. ALBERT. *Quantum Mechanics and experience*. Harvard University Press, 1994, Capítulo 4 y 5.
- [11] LESLIE E. BALLENTINE. *Quantum Mechanics. A modern development*. Simon Fraser University, 1998, Capítulo 19.
- [12] A. BEUTER, L. GLASS, M.C. MACKEY, M.S TITCOMBE. *Nonlinear Dynamics in Physiology and medicine*. Springer Science, (2008).
- [13] REBECCA M. WILLIAMS, WARREN R. ZIPFEL, AND WATT W. WEBB. *Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils*. Biophysical Journal, 1377–1386 (2005).

- [14] RICHARD W. HILL, GORDON A. WYSE, MARGARET ANDERSON. *Animal Physiology*. Editorial Medica Paramericana, Cuarta edición, 2016, Capítulo 8.
- [15] AIKATERINI ZOUMI, ALVIN YEH, AND BRUCE J. TROMBERG. *Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence*. PNAS 17, 11014–11019 (2004).