



CENTRO DE INVESTIGACIONES
EN OPTICA, A.C.

“MEDICIÓN DE MICRO VARIACIONES EN LA PRESIÓN INTRAOCULAR A TRAVES DE LA CORNEA USANDO FD-OCT”



Tesis que para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Óptica)

Presenta: Angel Guillermo Cadena Hernandez

Director de Tesis: Dr. Manuel Humberto De la Torre Ibarra

“Versión Definitiva. Incluye cambios sugeridos por revisores”

León · Guanajuato · México
Junio de 2022

Resumen

En este proyecto se buscó analizar las variaciones mecánicas de la córnea al incrementar el líquido dentro de la cámara anterior del globo ocular por medio de un arreglo de tomografía de coherencia óptica (OCT). El sistema permite caracterizar el ancho de la córnea y obtener una señal tomográfica en 2D por medio de una sola exposición. Se diseñó un sistema de microinyección para variar el incremento de la presión en el ojo a medida que se registraba el evento. La cantidad de líquido ingresado al tejido es correlacionada con el desplazamiento que sufre la córnea.

Cabe señalar que este trabajo fue una prueba de principio para corroborar si la técnica de OCT es capaz de resolver estos pequeños cambios de forma no invasiva. Lo anterior podría ayudar a cuantificar los estados diferenciales de presión en el ojo como una posible alternativa en la detección temprana de glaucoma, una patología que ocurre al haber un aumento en la presión intraocular y que solo es perceptible cuando está avanzada.

Se realizaron pruebas en tres grupos de globos oculares para determinar la representatividad cuantitativa de aquellos grupos de acceso más fácil comparados con un grupo post mortem de pocos minutos. Los resultados obtenidos confirman que este sistema puede detectar y medir las diferencias mecánicas entre los tres grupos.

Agradecimientos

A mi familia, a mis padres Teresa y Salvador que me apoyaron en todo el proceso, que me instruyeron, me dieron los mejores consejos y su tiempo.

A mi asesor de tesis el Dr. Manuel Humberto De la Torre Ibarra, que me brindo del mejor conocimiento en el área. Agradezco por el tiempo que me dedico y el apoyo durante el proceso.

A mis compañeros que me apoyaron en todo el proceso, muchas gracias a Brenda mi compañera de laboratorio por los consejos que me brindo.

Por último, al Centro de Investigaciones en Óptica y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme la oportunidad de estudiar en el centro y haber apoyado mis estudios.

Índice

1. Introducción	1
2. Fundamentos teóricos	2
2.1 Tomografía de coherencia óptica.....	2
2.1.1 OCT temporal	8
2.1.2 OCT espectral	9
2.1.3 OCT en el dominio de Fourier	10
2.1.4 Procesamiento de fase.....	13
2.2 OJO	16
2.2.1 Composición anatómica del globo ocular.....	16
2.2.1.1Capa fibrosa	16
2.2.1.2Capa vascular	17
2.2.1.3Capa interna	17
2.2.2 Histología de la córnea.....	17
2.3 Microinyección	19
3 Desarrollo experimental.....	20
3.1 Sistema óptico.....	20
3.2 Soporte de globo ocular	21
3.3 Sistema de microinyección	22
3.4 Preparación de la muestra	22
3.5 Alineación y primeras imágenes	23
4. Resultados.....	27
4.1 Comparación de penetración en señal OCT por grupos	27
4.2 Fase óptica por grupo.....	28
4.2 Respuesta fisiológica al cambio de PIO.....	30
5 Discusión y conclusiones.....	33
6. Bibliografía	34
7 Anexo A.....	36

Lista de figuras

Figura 2.1 Diagrama de fase constructiva y destructiva	2
Figura 2.2 Patrón de interferencia.....	4
Figura 2.3 Interferómetro de Michelson	5
Figura 2.4 Patrón de interferencia 2D.....	6
Figura 2.5 Tipos de escaneo para sistemas OCT	7
Figura 2.6 Sistema OCT temporal	8
Figura 2.7 Sistema OCT espectral	9
Figura 2.8 Componentes de la señal de un A-scan	10
Figura 2.9 Sistema OCT en el dominio de Fourier para B-scan de una sola exposición.....	11
Figura 2.10 Configuración de lentes cilíndricas	11
Figura 2.11 Trazado de rayos para una rejilla de difracción.....	12
Figura 2.12 B-scan de un portaobjetos	13
Figura 2.13 Diagrama de procesado de imágenes para obtener su desplazamiento	15
Figura 2.14 Anatomía del globo ocular	16
Figura 2.15 Histología de la córnea	18
Figura 2.16 Sistema de microinyección básico.....	19
Figura 3.1 Sistema OCT en el dominio de Fourier para B-scan utilizado para las pruebas	20
Figura 3.2 Sistema de montura para globo ocular	21
Figura 3.3 Sistema de microinyección.....	22
Figura 3.4 a) Alineación de la muestra en arreglo óptico b) Zona de inyección	23
Figura 3.5 Gráfico de pasos de motor contra tiempo de inyección	24
Figura 3.6 Señal OCT de un globo ocular en estado basal	25
Figura 3.7 Gráfico de microlitros inyectados por pasos de motor	26
Figura 3.8 Pruebas de imágenes de fase envuelta.....	26
Figura 4.1 Señal OCT de cada grupo de estudio	27
Figura 4.2 Penetración de la señal de cada grupo	28
Figura 4.3 Señal de fase envuelta de los 3 grupos de estudio.....	29
Figura 4.4 Señal de fase desenvuelta de los 3 grupos de estudio	30
Figura 4.5 Señal de fase desenvuelta de los 3 grupos de estudio en 3D.....	31
Figura A1 Montura para montura (P1) para motor de pasos	36
Figura A2 Montura para montura (P1) para motor de pasos en 3D.....	36
Figura A3 Montura para J1 del sistema en 3D	37
Figura A4 Montura para J1 del sistema en 3D	38
Figura A5 Montura para J2 del sistema	39
Figura A6 Montura para J2 del sistema en 3D	40
Figura A7 Montura para el globo ocular.....	41
Figura A8 Montura para el globo ocular en 3D.....	42

1 Introducción

En el presente trabajo se desarrolla un sistema óptico junto a uno de micro inyección para analizar variaciones intraoculares en ojos porcinos in vitro. Este sistema se compone de un arreglo OCT en el dominio de Fourier single-shot, que permite grabar y procesar las imágenes tomográficas en tiempo real.

El desarrollo de técnicas ópticas no destructivas como OCT ha permitido caracterizar desde fibras ópticas hasta estructuras biológicas complejas. Esta técnica puede recuperar información en profundidad desde un solo punto en la muestra, hasta un volumen [1]. Es un método no invasivo que permite realizar una biopsia óptica (analiza el interior sin un corte) y puede examinar axialmente la información. Actualmente OCT es utilizada en el área de oftalmología para determinar varias patologías y llevar a cabo seguimiento de pacientes [2]. También se ha explorado diversas configuraciones de OCT enfocadas a detectar propiedades mecánicas como son deformaciones. Esto es posible gracias a la alta resolución y sensibilidad de la técnica que puede detectar pequeños desplazamientos en la córnea [3,4,5]. En estas pruebas se pueden analizar pequeñas deformaciones de la córnea debidas al incremento de la presión intraocular (PIO).

El trabajo propuesto toma como punto de partida la realización de una montura ad-hoc que emule la cavidad orbital del cráneo que aloja el globo ocular y que permita colocar las muestras durante las pruebas del sistema óptico. Las muestras de globos oculares son porcinas, dado que se ha demostrado que son un modelo muy parecido al ojo humano [6,7,8]. Además, se desarrolla un sistema de microinyección para introducir de forma controlada variaciones en el PIO modificando la velocidad, cantidad y duración de la micro inyección.

El trabajo analiza tres diferentes grupos de muestra para el estudio. Cada uno de ellos presenta distintas condiciones de conservación a fin de poder determinar cuál de ellos tiene una respuesta más cercana al grupo de control. El sistema OCT graba de forma continua sobre la córnea durante la inyección del líquido, los patrones de franjas son convertidos a imágenes tomográficas en donde por medio de la fase óptica se pueden obtener los mapas de desplazamiento.

Los resultados para estas pruebas hacen patente la existencia del mecanismo de drenado en los globos oculares post-mortem de 30 minutos comparados a los que habían sido refrigerados y escaldados. Con este sistema es posible detectar desplazamientos a partir de unas cuantas decenas de micrómetros, por lo que la sensibilidad permitirá generar mapas de deformación diferenciales.

La descripción del trabajo se organiza y presenta en 4 capítulos, el capítulo 2 presenta los fundamentos ópticos y la teoría básica para OCT y anatomía del globo ocular. En el capítulo 3 se hace la descripción del arreglo experimental OCT, así como del diseño de las monturas para las muestras, el sistema de microinyección y la metodología empleada en las pruebas que se llevaron a cabo. En el capítulo 4 se presentan los resultados de las pruebas en los tres grupos y, por último, en el capítulo 5 se encuentra una discusión y las conclusiones del trabajo desde una perspectiva de estudio de materiales.

2 Fundamentos teóricos

2.1 Tomografía de coherencia óptica

La técnica de tomografía de coherencia óptica (OCT) permite obtener imágenes de alta resolución de las diferentes capas de profundidad de una muestra. Los objetos utilizados por excelencia son aquellos que tienen una baja dispersión de la luz, es decir, que las partículas que los conforman permiten que todos los fotones (puntos de luz) que inciden sobre ellos, puedan regresar por el mismo camino [9]. Para caracterizar los modelos se utiliza la interferencia óptica que parte de la superposición de dos o más ondas. La superposición de ondas puede ser constructiva o destructiva (figura 2.1). La interferencia constructiva se conforma por la suma de su amplitud, dado que ambas se encuentran en fase. Mientras que la destructiva presenta un desfase, donde las crestas de una concuerdan con los valles de la otra.

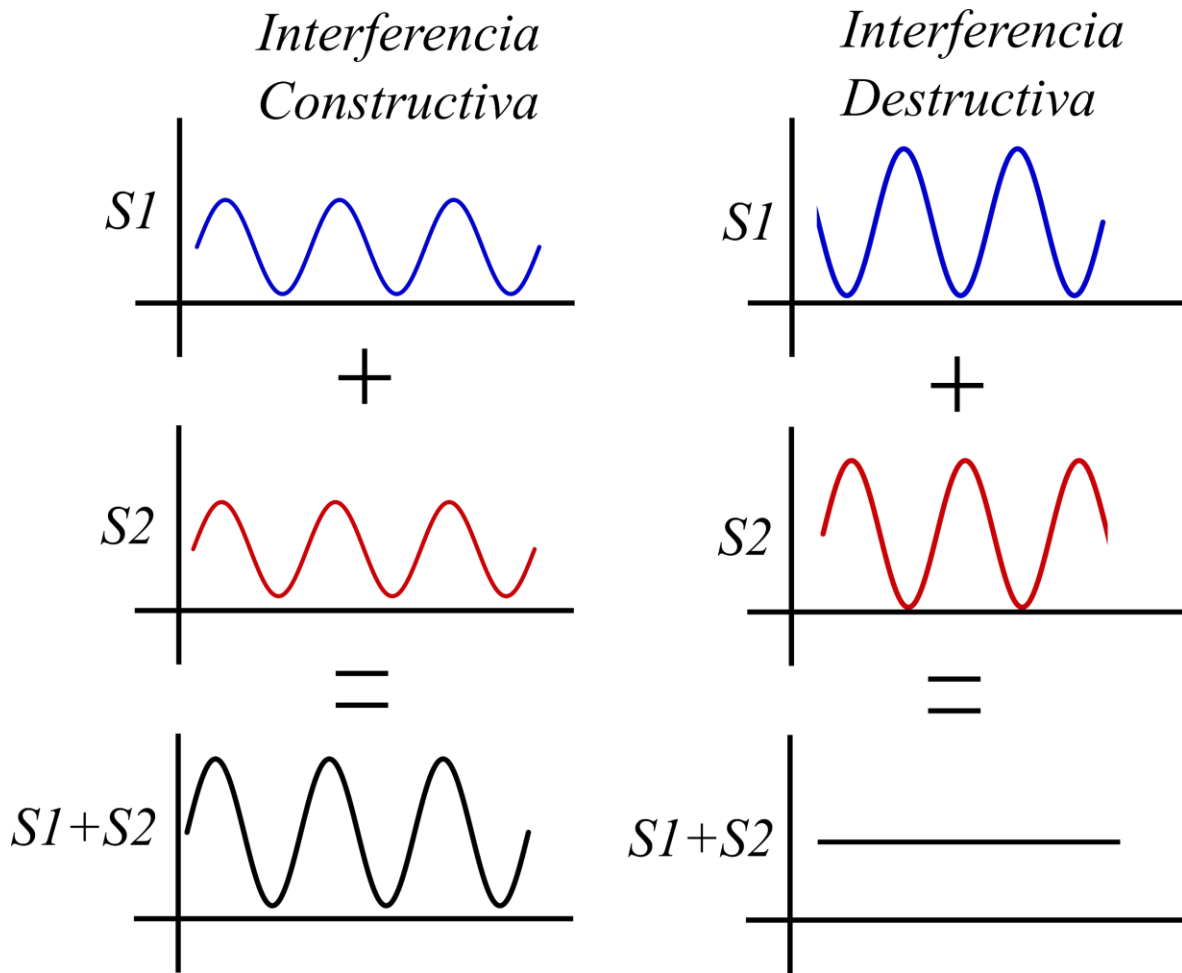


Figura 2.1 Diagrama de interferencia constructiva y destructiva. Del lado izquierdo se tiene la suma de dos ondas que se encuentran en fase y la suma de ellas crea una onda con mayor amplitud. En la derecha esta la interferencia destructiva donde ambas ondas están en desfase y su suma es una resta de sus amplitudes.

A la fecha no existe dispositivo que nos permita capturar las variaciones de un campo electromagnético (superposición de ondas), por lo que se utilizan detectores capaces de captar la irradiancia (flujo de energía por unidad de área). Esta irradiancia es proporcional a la norma del cuadrado de una magnitud:

$$I = |E_T|^2 = E_T E_T^* \quad (\text{ec. 2.1})$$

El campo magnético de una onda se determina por:

$$A_0 e^{i\phi_0} \quad (\text{ec. 2.2})$$

donde A_0 es la amplitud de la onda y ϕ_0 es su fase.

La fase cuenta con información del camino óptico a lo largo de la trayectoria del haz. El camino óptico esta dado por la multiplicación de la distancia geométrica, el índice de refracción del medio (n) y el número de onda (k). El índice de refracción esta dado por la diferencia de velocidad que tiene la onda en el vacío comparada con la del medio al que entra. El número de onda ($k = \frac{2\pi}{\lambda}$) dado por la longitud de onda de la fuente utilizada (λ).

La interferencia de dos ondas captadas por un sensor está representada como:

$$I = |A_1 e^{i\phi_1} + A_2 e^{i\phi_2}|^2 \quad (\text{ec. 2.3})$$

donde se cuenta con diferente amplitud y fase. Expandiendo la (ec. 2.3) siguiendo el principio de la (ec. 2.1) obtenemos:

$$I = A_1 e^{i\phi_1} * A_1 e^{-i\phi_1} + A_2 e^{i\phi_2} * A_2 e^{-i\phi_2} + A_1 e^{i\phi_1} * A_2 e^{-i\phi_2} + A_1 e^{-i\phi_1} * A_2 e^{i\phi_2} \quad (\text{ec. 2.4})$$

Ahora multiplicando cada término y simplificándolos se tiene:

$$I = A_1^2 + A_2^2 + A_1 * A_2 e^{i(\phi_2 - \phi_1)} + A_1 * A_2 e^{-i(\phi_2 - \phi_1)} \quad (\text{ec. 2.5})$$

Continuamos con los dos últimos términos los cuales tienen la misma base:

$$I = A_1^2 + A_2^2 + A_1 * A_2 [e^{i(\phi_2 - \phi_1)} + e^{-i(\phi_2 - \phi_1)}] \quad (\text{ec. 2.6})$$

Utilizando la entidad de Euler y de cosenos $[\cos \theta = \frac{e^{i\theta} + e^{-i\theta}}{2}]$ reescribimos la ecuación anterior:

$$I = A_1^2 + A_2^2 + 2 * A_1 * A_2 \cos (\phi_2 - \phi_1) \quad (\text{ec. 2.7})$$

donde los primeros 2 términos son considerados como término de fondo (DC, por sus siglas en inglés) y el ultimo con la multiplicación de las amplitudes (contraste de franjas) y término de interferencia [10]. Como ejemplo vamos a definir $A_1^2 + A_2^2 = 128$, $2 * A_1 * A_2 = 127$ y con el termino coseno que va de -1 a 1 dependiendo de la diferencia de fase, se genera un patrón de interferencia como el de la figura 2.2, donde los valores van de 1 a 255.

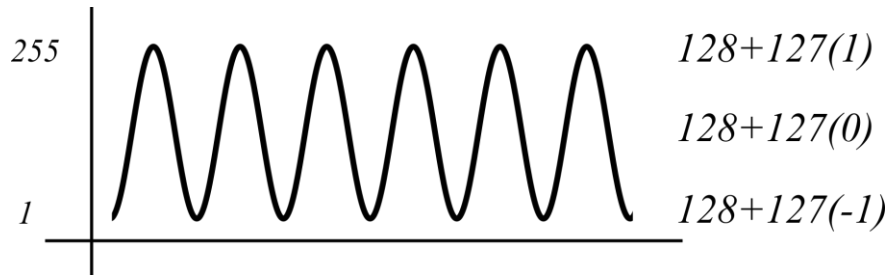


Figura 2.2 Patrón de interferencia a 8 bits

Ahora considerando no solo la interferencia de ondas, sino de frentes de onda (conjunto de varias ondas), podemos caracterizar su diferencia de camino óptico y nos permitiría obtener información sobre dos señales. Suponiendo que este se direcciona a una superficie especular, es decir, sin alguna imperfección. Y el otro cuenta con un perfil circular, es posible recopilar la diferencia entre ambas superficies.

La (ec. 2.7) cuenta con el término de diferencia de fase [$\Delta\phi = (\phi_2 - \phi_1)$], que contienen la información de diferencia de camino óptico de dos ondas. Si definimos $\phi_0 = kz_0 - wt$ y definiendo la diferencia de camino geométrico ($z_2 - z_1$) obtenemos:

$$\Delta\phi = kz_2 - kz_1 = k(z_2 - z_1) \quad (\text{ec. 2.8})$$

De esta manera podemos obtener la diferencia entre dos puntos.

Existen las fuentes de luz que son coherentes, es decir, que tienen una sola longitud de onda (λ). Estas fuentes son utilizadas para generar patrones de interferencia para caracterizar dos frentes de onda, donde la diferencia de distancia entre ellas no sea mayor a la longitud de coherencia de esa fuente. La ecuación para la longitud de coherencia de una fuente está dada por:

$$L = \frac{\lambda^2}{n\Delta\lambda} \quad (\text{ec. 2.9})$$

donde L es la longitud de coherencia de la fuente, λ es la longitud de onda de la fuente, n el índice de refracción del medio y $\Delta\lambda$ es el rango de las longitudes de onda de la fuente. Si $\Delta\lambda$ es mayor a uno podemos ver que la longitud de coherencia tiene un menor valor [11].

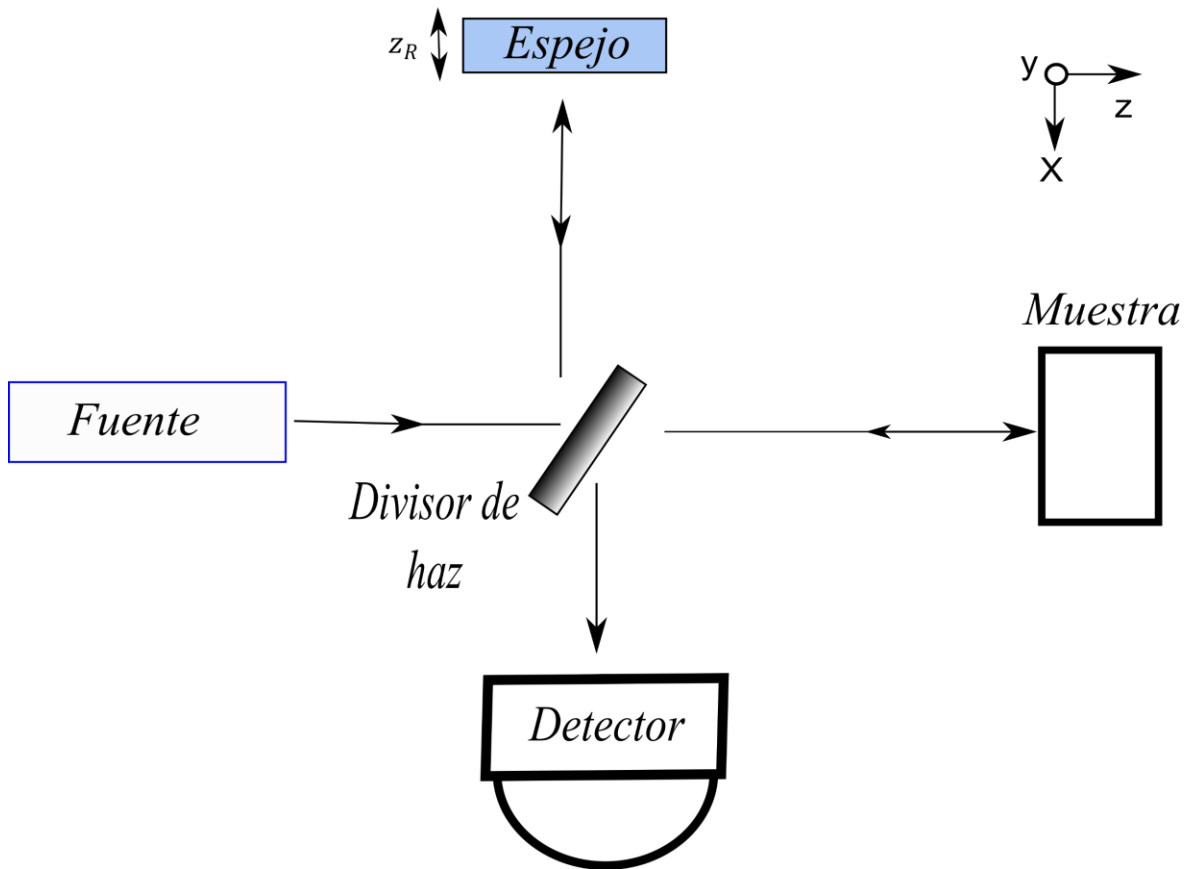


Figura 2.3 Interferómetro de Michelson donde el espejo de referencia se desplaza en la distancia z_R para modificar la diferencia de camino óptico.

Para poder explicar el fenómeno de interferometría, se utiliza un interferómetro de Michelson (figura 2.3). Este cuenta con un divisor de haz 50/50 (haz refractado/haz transmitido) donde cada brazo tiene la mitad de la intensidad de la fuente inicial. La diferencia de camino óptico entre ambos brazos no puede ser mayor la longitud de coherencia de la fuente, sino se perdería la interferencia. La intensidad recombinada por ambos haces es captada por un sensor como un patrón de interferencia (figura 2.4). Donde a mayor cantidad de franjas (claras y oscuras), se obtiene una mayor diferencia de distancia o camino óptico.

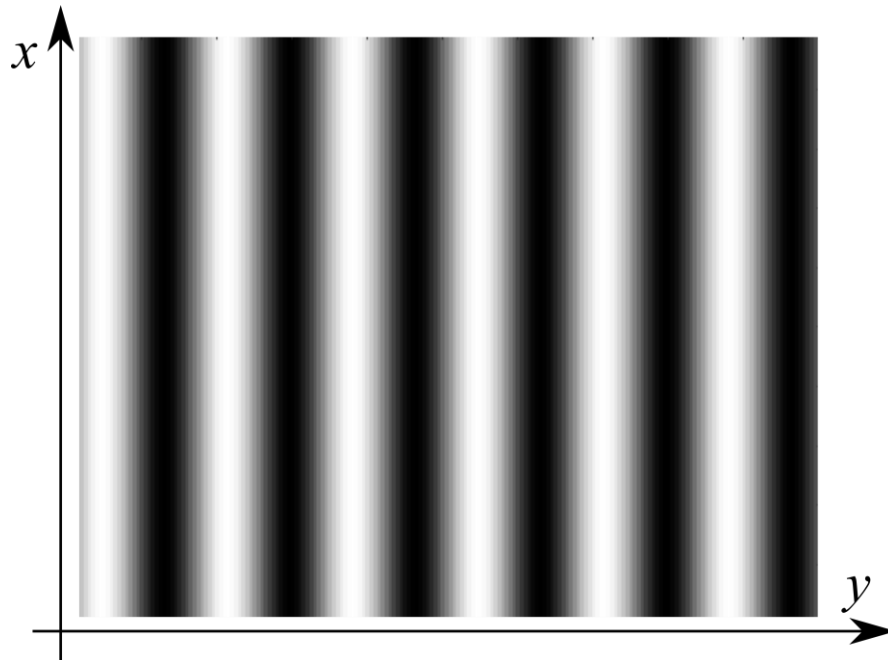


Figura 2.4 Patrón de interferencia cosenoidal creado por la superposición de dos frentes de onda.

Los sistemas OCT utilizan fuentes de baja coherencia, con un amplio ancho de banda, es decir, está conformada por diferentes longitudes de onda. Un ejemplo de estas es los diodos superluminiscentes (SLED, por sus siglas en inglés). El principio de estos es una unión p-n donde al tener una polarización hacia adelante se genera una emisión amplificada espontánea con un ancho de banda de 5 hasta 750nm. [12]. Por otro lado, la caracterización de muestras se divide en 3 tipos de escaneo (figura 2.5). El A-scan es considerado como el escaneo de una muestra en un solo punto. Por ejemplo, se escanea un punto de la muestra a profundidad para obtener información de sus diferentes capas (figura 2.5 A). El segundo caso es el B-scan, en este la muestra es analizada en dos ejes, donde se tiene la profundidad y el ancho de la muestra. Se puede obtener un perfil de profundidad en diferentes puntos de la muestra a lo largo de un eje (figura 2.5 B). El último, es el C-scan, para este se recopila información en los 3 ejes cartesianos. Se realiza un barrido (reconstrucción) de la muestra a su profundidad, ancho y altura. Para esto se utiliza por ejemplo un espejo móvil para redireccionar el haz de incidencia y es captado por el sensor (figura 2.5 C) [13].

OCT permitió cubrir un espacio entre los sistemas de escaneo como lo son el ultrasonido y microscopia óptica y confocal. El primero cuenta con una resolución axial de entre 0.1-1mm, mientras que los microscopios tienen resoluciones menores a 1 micra.

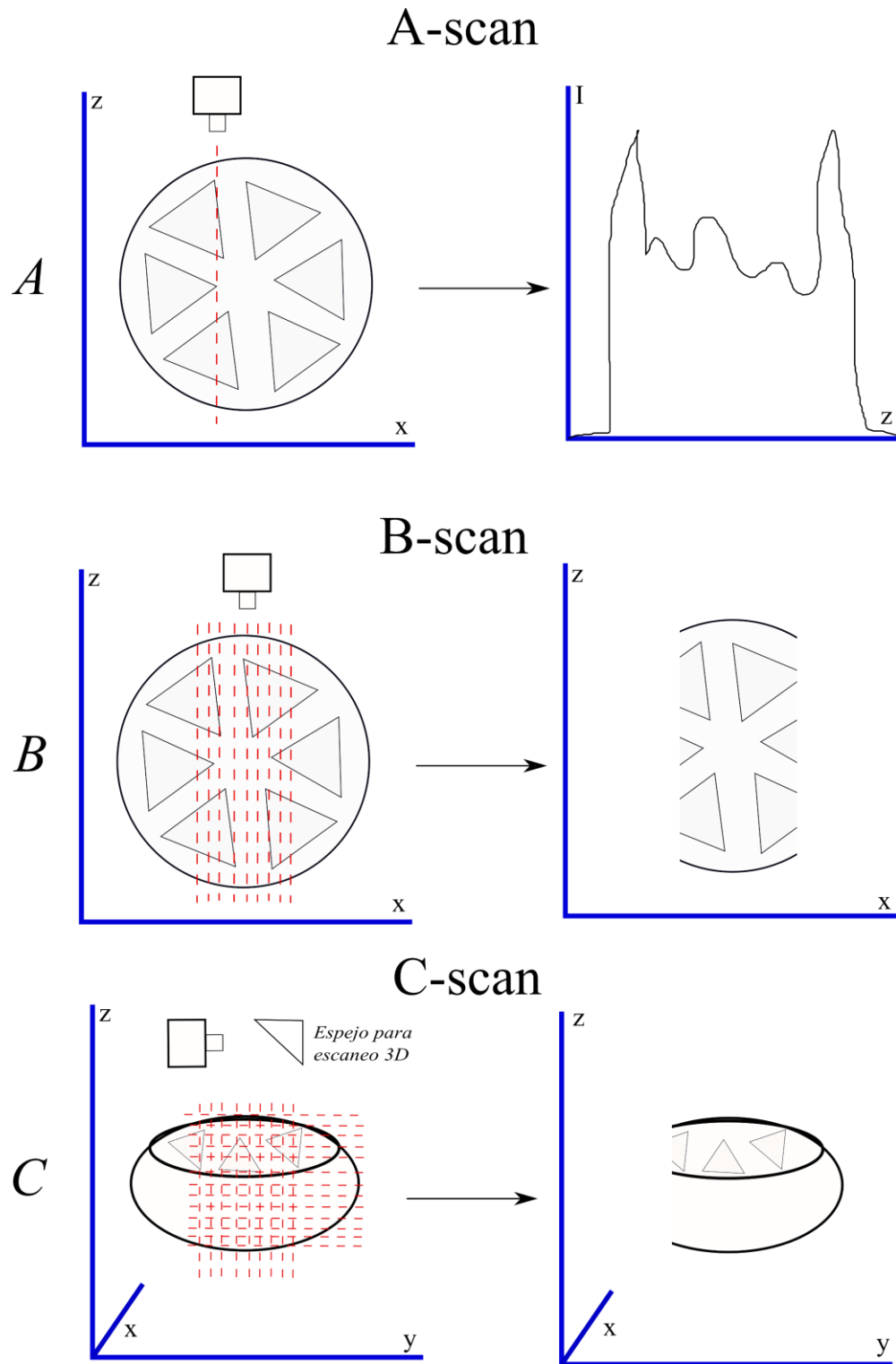


Figura 2.5 Tipos de escaneo para sistemas OCT.

Las técnicas de OCT cuentan con una resolución entre 1-10 micras y una penetración de 2 a 3mm. La única limitación de la técnica es la retrodispersión de la luz, pues en muestras con alta dispersión se pierde la mayor cantidad de fotones dentro de la muestra de regreso al sistema. Esto lleva a una atenuación de la intensidad inicial de la fuente [14,15].

2.1.1 OCT temporal

El primer sistema utilizado para las aplicaciones médicas (específicamente oftalmología), fue el creado en los años 90 [16], pues fue el primero en poder caracterizar las estructuras internas del ojo, como la retina y la esclera. Por medio del espejo de referencia es posible analizar a profundidad la muestra. Se recupera un perfil de reflectancia a una profundidad diferente en cada exposición. Al tener una fuente con una longitud de coherencia corta, esta se compone de diferentes λ s. Con ello la penetración de la muestra tendrá una mayor cantidad de puntos, porque cada λ se aúna a una cierta profundidad. En la figura 2.6 se tiene un sistema OCT temporal basado en un interferómetro de Michelson acoplado por fibras ópticas hacia el espejo de referencia y la muestra. El espejo de referencia (*ER*) cambia de distancia para recuperar cada una de las capas de muestra. Mientras que un segundo espejo (*EM*) frente a la muestra permite redireccionar el haz, y capturar información en un segundo eje en la muestra. Ambos haces son recombinados en el acoplador de fibras y finalmente es captado por un sensor. Esta técnica consta de diferentes escaneos en profundidad y otro lateral. Por ello, el tiempo de duración de exposición de la técnica es proporcional al tiempo de barrido del sistema.

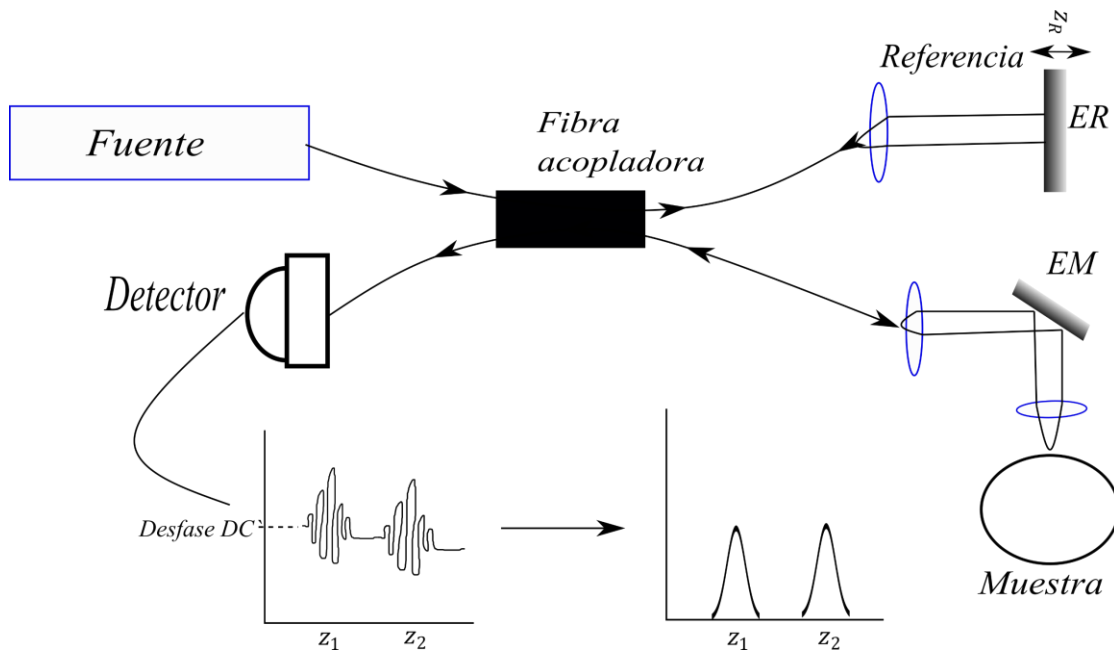


Figura 2.6 Sistema OCT temporal para caracterizar muestras en 2D por medio del espejo de escaneo lateral (EM).

2.1.2 OCT espectral

El primer OCT espectral aplicado en el área médica fue el creado por Wojtkowski y colegas en el año de 2001 [17] y se utilizó para caracterizar una uña. En aquellos tiempos la técnica era rápida, pero su procesamiento era muy lento. Al siguiente año el grupo mejoró su procesamiento y en 20 segundos obtuvo una imagen de 500x500 píxeles lo que permitió considerarse para aplicaciones médicas.

Estos sistemas constan de una fuente de baja coherencia con un ancho de banda amplio. Se utiliza un interferómetro de Michelson acoplado por medio de fibras y un espectrómetro que capta la señal de ambos brazos por un sensor 1D, el cual registra la información a profundidad de un punto en la muestra. Es posible añadir un espejo para escanear la muestra, como en el caso del OCT temporal, para obtener un B-scan. La ventaja de este método con el anterior es que no es necesario modificar el espejo de referencia, sino que todo el espectro de la fuente es separado en sus diferentes λ s, y estas contienen información de cada capa interna.

En la figura 2.7 podemos apreciar este arreglo donde se tiene el espejo de referencia estático (ER) en un brazo y en el otro la muestra de interés. Se obtiene información de ambos brazos y se hace interferir entre ellos para luego llegar un espectrómetro y captar la señal. Las longitudes de onda captadas dependerán del espectrómetro. Ya que estos cuentan con un filtro para ciertas longitudes de onda.

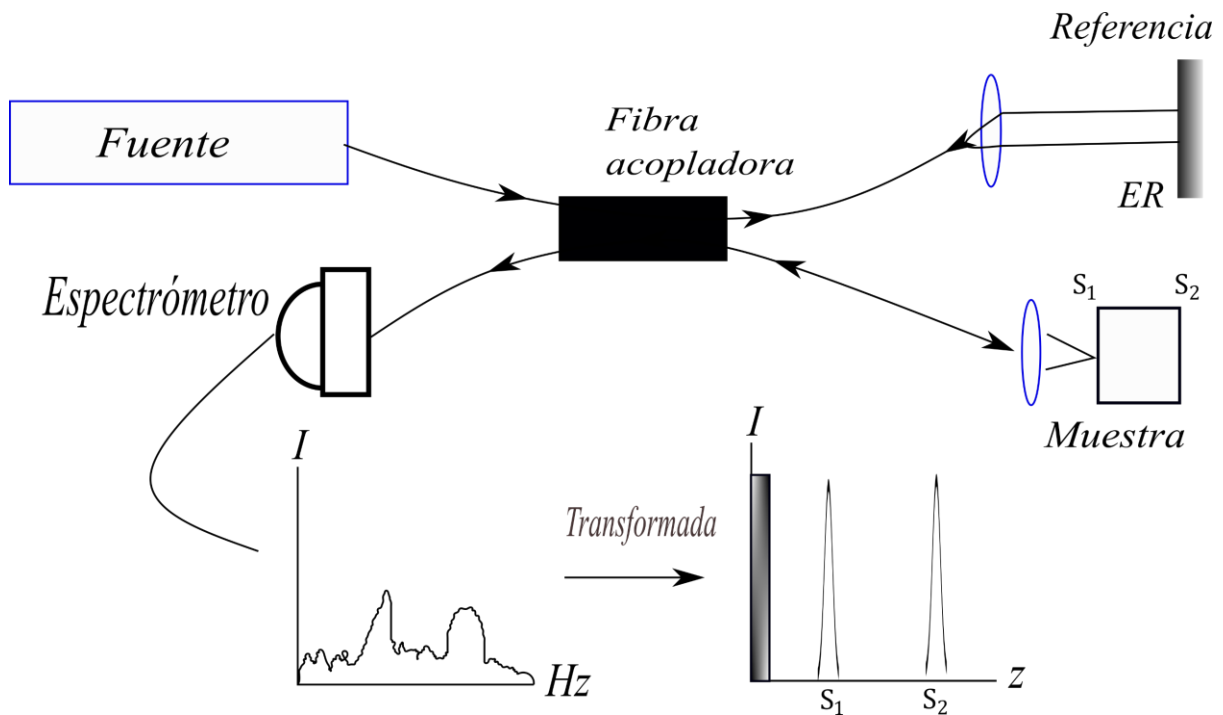


Figura 2.7 Sistema OCT espectral acoplado con fibras donde en la parte inferior se tiene una señal (A-scan). Luego de la transformación al dominio de frecuencias, es posible ver las dos superficies de la muestra.

La señal captada está compuesta por diferentes elementos. En la figura 2.8 se observa un A-scan donde se tiene el término DC, los términos de autocorrelación ($S1S2$) y los de correlación cruzada ($rS1$ y $rS2$). El primero está dado por el término de fondo de la señal. El segundo es la interacción entre cada una de las capas de la muestra. El ultimo, describe la relación o diferencia entre el espejo de referencia y cada una de las superficies de la muestra, por ello se encuentran divididas entre sí. $rS1$ es considerado como la comparación de la primera capa de la muestra con el espejo de referencia. Para poder obtener el punto de mayor sensibilidad en un sistema (zero delay line), es posicionada generalmente cerca de la primera superficie del objeto de análisis [18].

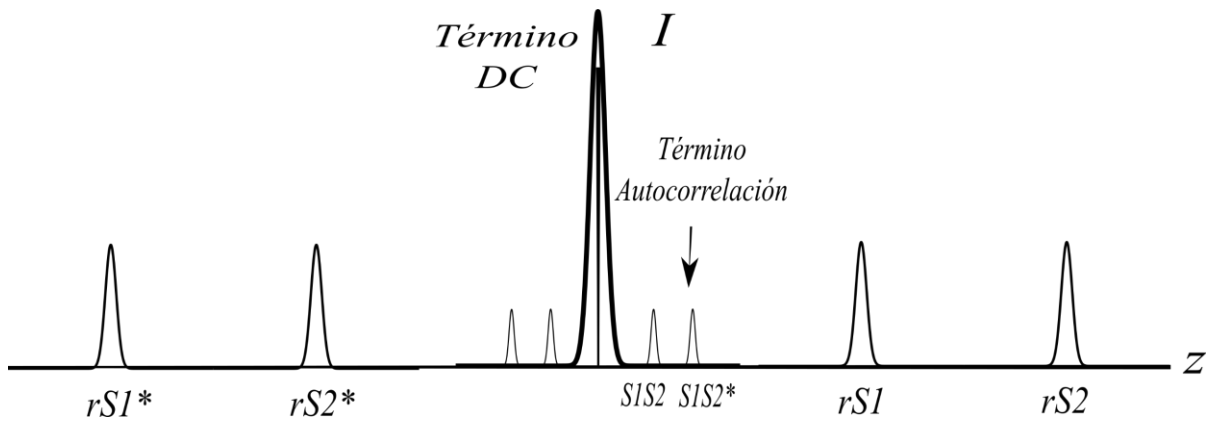


Figura 2.8 A-scan de una estructura con dos capas donde se tienen los términos de correlación cruzada en cada extremo y los términos de autocorrelación cercanos al término DC.

2.1.2.1 OCT en el dominio de Fourier

Dentro de los sistemas OCT espectrales se tiene el del dominio en Fourier. Tiene la peculiaridad de utilizar un sistema de rejillas de difracción y lentes que enfocan la señal interferométrica a un sensor 1D. Este arreglo óptico funciona como un espectrómetro, pero la ventaja es que no se limita las longitudes de onda por el espectrómetro. Sino que se utiliza todo el ancho de banda y además es posible utilizar diferentes sensores para cubrir todo el espectro de la fuente. Para captar esta señal se utilizan normalmente sensores 1D [19]. Con esto se registran A-scans y por medio de un espejo frente a la muestra se redirecciona el haz de incidencia para crear B-scans.

Existen los sistemas con una sola exposición donde se obtiene un B-scan por cada cuadro grabado. Tal es el caso del sistema propuesto por Teramura [20] que se encuentra en la figura 2.9. El arreglo experimental consta de una fuente con ancho de banda amplio, un interferómetro de Michelson, lentes cilíndricas y una rejilla de difracción que permite generar un patrón de interferencia y es captado por un sensor 2D. Las lentes cilíndricas contienen su potencia en un solo eje, es decir, que en el momento que la luz pasa por ellos, la potencia de enfoque se reduce a un eje, mientras que en el otro eje continua su trayectoria sin cambio alguno. La figura 2.10 explica el sistema de lentes, la distancia focal y su trazado de rayos.

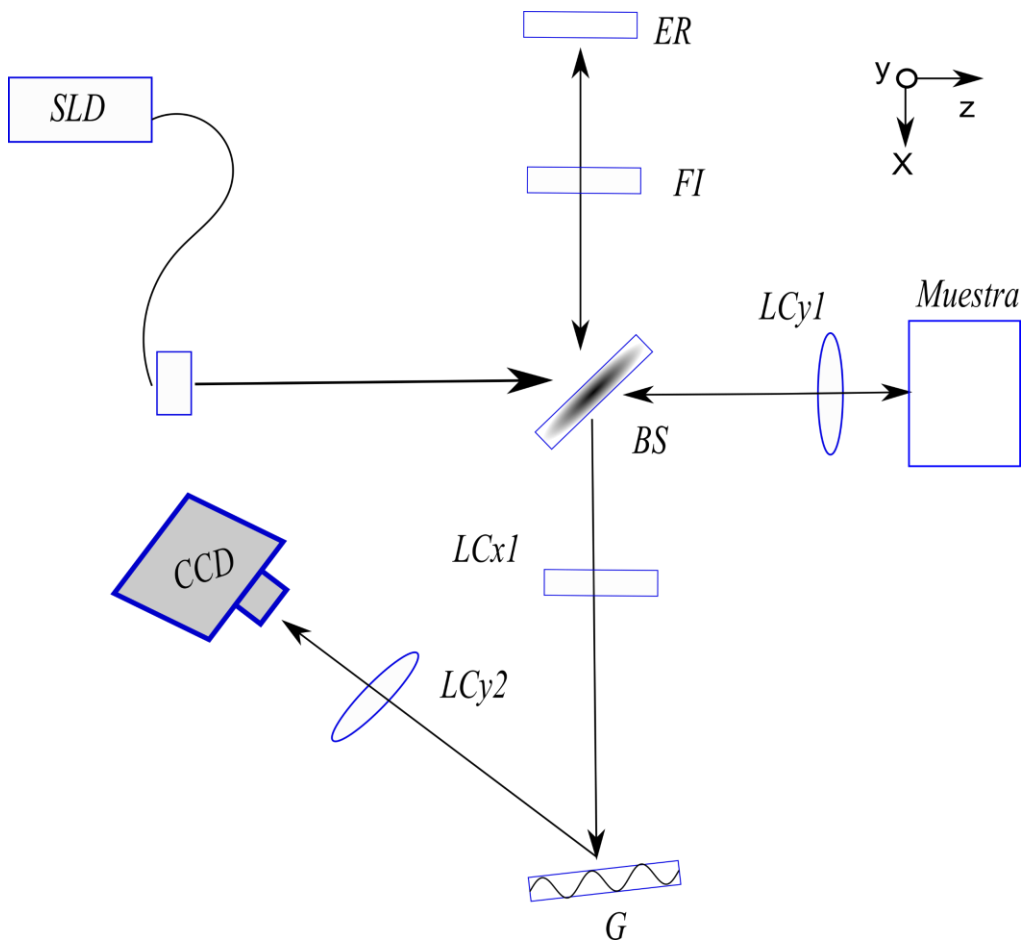


Figura 2.9 Sistema OCT en el dominio de Fourier que permite obtener un B-scan por medio de un sensor 2D.

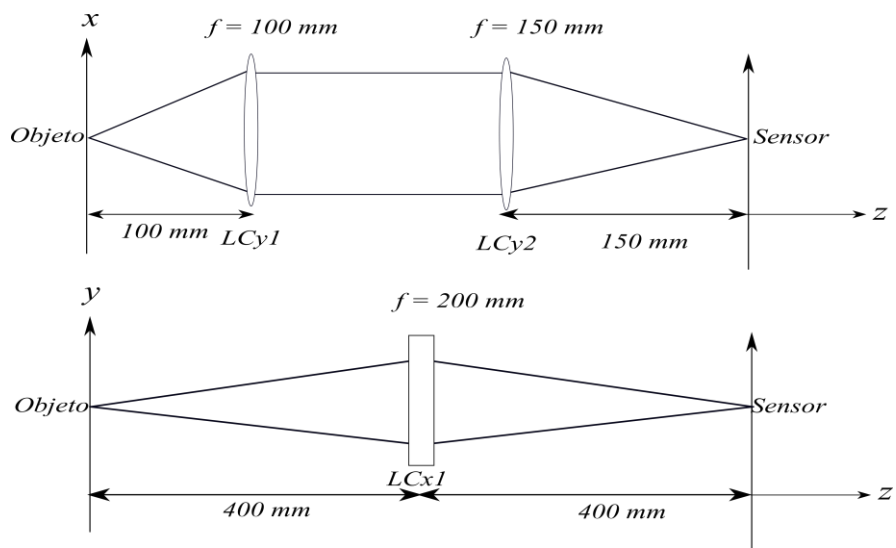


Figura 2.10 Configuración de lentes entre el objeto y el sensor enfocados en diferentes ejes.

El arreglo consta de una fuente *SLD* que es dividida por medio de un divisor de haz (*BS*, por sus siglas en inglés) en donde uno va hacia el espejo de referencia (*ER*) y el otro hacia la muestra. Esta es enfocada por medio de una lente cilíndrica *LCy1* (con potencia óptica en el eje “y”). A su distancia focal se logra obtener una línea delgada de luz paralela al eje “y” con la altura del diámetro del haz de luz inicial. El espejo de referencia es utilizado para colocar el “zero delay line” dentro del sistema y cerca del punto focal donde se encuentra la primera capa de la muestra, y por medio del FI (filtro atenuador de intensidad) se ajusta la potencia. Se recombinan los haces en el *BS* y continúan hacia una segunda lente cilíndrica (*LCx1*) la cual enfoca el sistema paralelo al eje “x”. El camino óptico continua hacia una rejilla de difracción (*G*), refleja y dispersa la luz en diferentes órdenes. Si el haz incide normal a la *G*, se regresa por el mismo camino. Por otro lado, a cierto grado de rotación, se tiene el orden 1,0 y -1, donde se tiene todo el contenido del haz dividido en sus diferentes lambdas (figura 2.11) ya sea en -1 o 1. Para optimizar la respuesta de la señal se utilizó una rejilla dentada donde el orden 1 contiene la máxima ganancia. El haz va hacia un tercer lente (*LCy2*) enfocado en el eje “y” que contiene el haz esparcido dentro del sensor (*CCD*) a su distancia focal. Este arreglo es considerado como $4f$, porque la distancia focal de *LCx1* es la que determina el tamaño del arreglo.

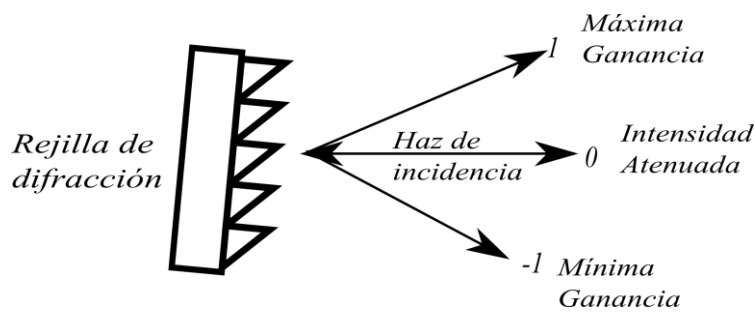


Figura 2.11 Rejilla de difracción la cual refracta en diferentes órdenes. El orden 1 contiene la máxima ganancia, el 0 una intensidad atenuada y -1 la mínima ganancia.

La ventaja de este arreglo es poder tener en una exposición un B-scan. Este se caracteriza por tener un mapa $y-\lambda$. Donde el eje “y” contiene el ancho de la muestra y “ λ ” las diferentes capas a profundidad. Para mejorar los resultados, es necesario un método de apodización el cual corrige la dispersión de la energía en los extremos del interferograma. Una vez obtenida la exposición es procesada digitalmente y es multiplicada por una de las ventanas conocidas como lo son gaussiana o welch, donde la selección de esta depende de la señal que tengamos y la respuesta final que se busca. La rejilla dispersa la luz diferente para cada longitud de onda, por lo tanto, por medio de una conversión al sistema k (vector de onda), es posible corregirlo y también la no linealización.

En la figura 2.12 se tiene una señal OCT de un cubreobjetos capturada con el sistema anterior. Se tienen las dos capas del objeto reflejadas en cada uno de sus extremos debido a la naturaleza de la transformada de Fourier. Los términos de correlación cruzada ($Z1$ y $Z2$) y sus conjugados ($Z1^*$ y $Z2^*$) están en cada extremo. Mientras que en la parte central se encuentra el término DC de la señal

y los términos de autocorrelación. La primera superficie $Z1$ está más intensa comparada con $Z2$, esto porque se encuentra más alejada de la “zero delay line”.

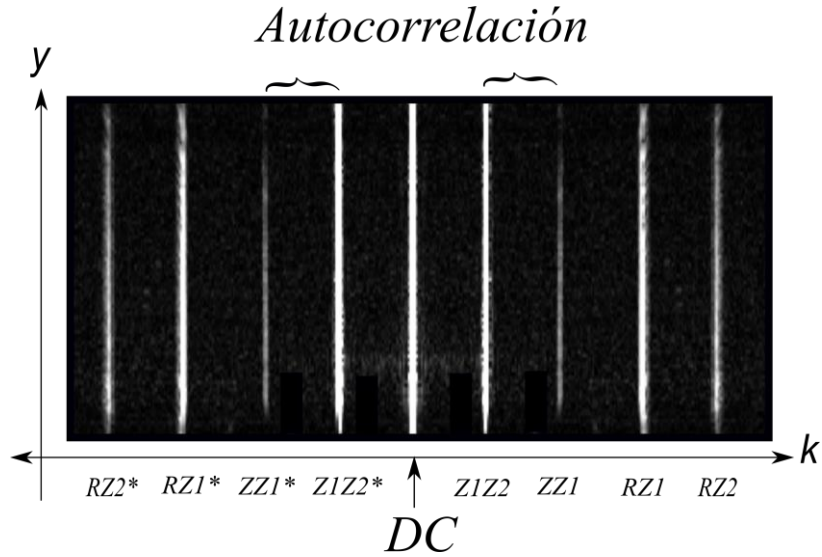


Figura 2.12 B-scan obtenido por medio de un sistema OCT en el dominio de Fourier de un portaobjetos.

2.1.3 Procesamiento de fase

Tomando la ec. 2.7 se tiene el equivalente para un sistema OCT en el dominio de Fourier:

$$I(k) = I_0 + 2 \sum_{n=1}^M \sqrt{I_r I_n} \cos[\phi_n(k)] + 2 \sum_{n=1}^M \sum_{n>m=1}^M \sqrt{I_m I_n} \cos[\phi_m(k) - \phi_n(k)] \quad (ec. 2.10)$$

Donde el primer término es el de fondo (I_0) o DC, el segundo contiene la interferencia entre el haz de referencia (I_r) y las capas de la muestra (I_n) conocido como correlación cruzada. El tercero es la interferencia entre los perfiles de reflectancia de cada capa ($I_m I_n$, con $n>m$). Este término de dos sumatorias representa las interacciones entre las diferencias capas de la muestra (autocorrelación). La fase óptica $\phi_n(k)$ describe la estructura de cada capa (n) con respecto al haz de referencia.

La fase óptica se encuentra dentro del campo eléctrico que regresa de ambos brazos del interferómetro. Llevan información de las diferencias de camino óptico, que puede ser traducida a cambios estructurales. La diferencia de fase $\phi_m(k) - \phi_n(k)$ puede ser expresada por medio de las frecuencias en el espacio k ($\phi_m(k) - \phi_n(k) = 2\pi(f_m - f_n)k$). Y a la vez utilizando las frecuencias para cada una de las capas de la muestra $(f_m - f_n)k = (z_m - z_n)/\pi$, se obtiene la diferencia de distancias geométricas.

La fase de la capa n de la muestra puede ser caracterizada como:

$$\phi_n(\lambda) = \phi_{n0}(\lambda) + \frac{4\pi}{\lambda} z_n \text{ (ec. 2.11)}$$

donde el primer término es la fase producida por la reflexión de la primera capa de la muestra y la capa n . z_n es la diferencia óptica de las superficies con respecto a la referencia. Reescribiendo la ec. 2.11 junto con el vector de onda:

$$\phi_n(k) = \phi_{n0} + 2kz_n \text{ (ec. 2.12)}$$

donde la dependencia de la fase ahora ha cambiado al espacio k .

Suponiendo que se presenta un cambio en la muestra, ya sea estructural o un cambio de posición se creara un cambio de fase relativo ($\Delta\phi_n$) en cada una de las capas:

$$\phi_n(\lambda) = \phi_n(\lambda) + \Delta\phi_n \text{ (ec. 2.13)}$$

Utilizando dos patrones de interferencia a distintos tiempos registrados por el sistema OCT siendo $I_1(k)$ y $I_2(k)$ (antes y después de una deformación respectivamente) es posible calcular la diferencia de fase relativa ($\Delta\phi_n$) envuelta, es decir que se encuentran sus valores entre $(-\pi$ y $\pi)$. Esto se calcula por medio de la siguiente expresión:

$$\Delta\phi_n = \tan^{-1} \left\{ \frac{\text{Re} [I_1(\mathbf{f}_{kn})] \text{Im} [I_2(\mathbf{f}_{kn})] - \text{Im} [I_1(\mathbf{f}_{kn})] \text{Re} [I_2(\mathbf{f}_{kn})]}{\text{Im} [I_1(\mathbf{f}_{kn})] \text{Im} [I_2(\mathbf{f}_{kn})] + \text{Re} [I_1(\mathbf{f}_{kn})] \text{Re} [I_2(\mathbf{f}_{kn})]} \right\} \text{ (ec. 2.14)}$$

donde $I_1(\mathbf{f}_{kn})$ y $I_2(\mathbf{f}_{kn})$ son las transformadas de Fourier de $I_1(k)$ y $I_2(k)$ respectivamente. Re e Im representan los componentes reales e imaginarias de cada una [21].

En la figura 2.13 se aprecia el proceso de procesamiento de patrones de interferencia para obtener la fase óptica desenvuelta para el desplazamiento de un portaobjetos. Se obtienen las dos exposiciones una en el estado basal y una segunda siendo desplazado. Ambos son procesados por separado con un algoritmo de linealización, apodización y su transformada de Fourier en 1D. Esto permite obtener la imagen OCT de cada instante capturado. Se continua con el cálculo de la diferencia de fase relativa envuelta y se aplica una máscara al área de interés (portaobjetos). Con ello es posible utilizar un desarrollador basado en branch cuts [22]. Este proceso de desenvolvimiento ($\Delta\phi U_n$) permite obtener el desplazamiento total de la muestra en radianes y por medio de un proceso de conversión a micrómetros.

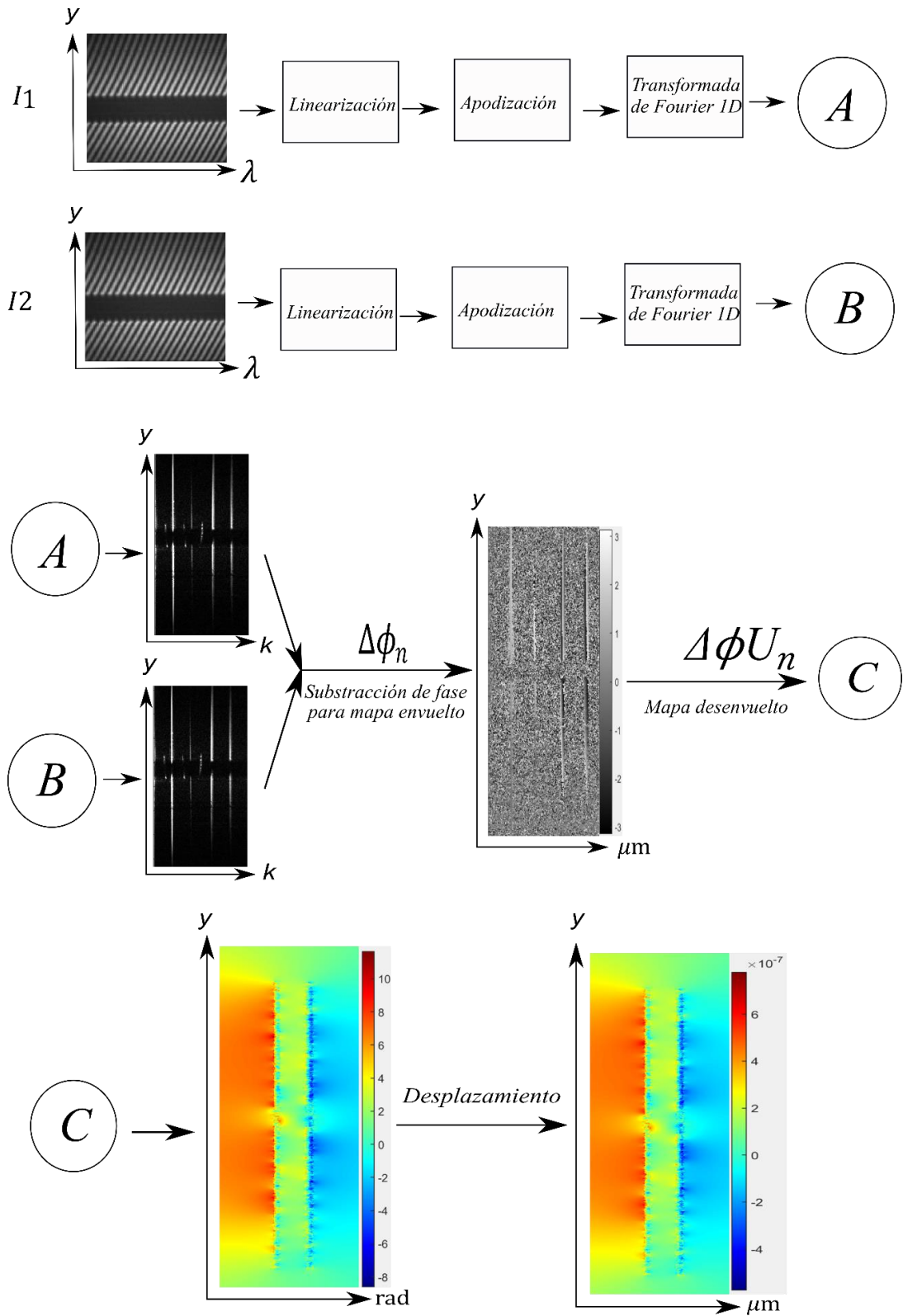


Figura 2.13 Diagrama de procesamiento de imágenes donde se muestra todos los pasos a seguir para llegar al desenvolvimiento de la fase.

2.2 OJO

2.2.1 Composición anatómica del globo ocular

El globo ocular (figura 2.14) cuenta con un diámetro de ≈ 25 mm y forma parte del aparato óptico.

Posee 3 capas:

- 1.- Capa fibrosa (externa): formada por la esclera y la córnea.
- 2.- Capa vascular (media): formada por el coroides, el cuerpo ciliar y el iris.
- 3.- Capa interna: formada por la retina.

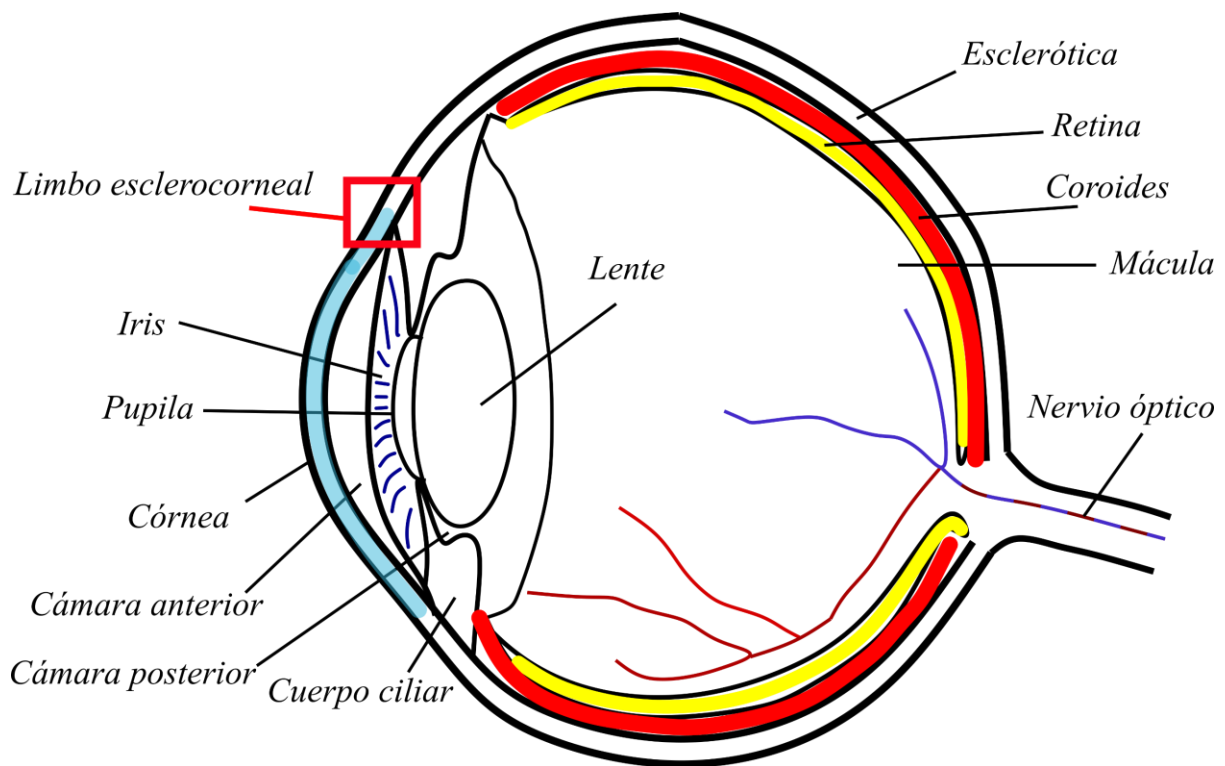


Figura 2.14 Anatomía del globo ocular

2.2.1.1 Capa fibrosa

La cornea es la parte anterior del ojo, la cual es transparente. Cubre una sexta parte del globo ocular. La esclera es la parte blanca del ojo y la cual mantiene su estructura. Tanto la córnea como la esclera se componen de diferentes capas celulares, y ambas poseen un proceso de hidratación diferente. A diferencia de la esclera, la córnea es avascular (tejido no vascularizado), que se nutre de los lechos capilares, líquido lagrimal y humor acuoso.

El limbo esclerocorneal, es la parte donde se unen la esclerótica y la córnea. Este es un anillo translucido de 1 mm de grosor, donde residen las asas capilares que nutren la córnea.

2.2.1.2 Capa vascular

La coroides se localiza entre la retina y la esclera. Esta capa es altamente vascular, pues provee de oxígeno y nutrientes. Recubre la mayor parte del ojo uniéndose en la parte anterior con el cuerpo ciliar en cada extremo.

El cuerpo ciliar es un musculo que conecta la coroides con el iris. Esta encargada de la contracción y relajación del cristalino, lo cual permite obtener diferentes distancias de enfoque.

El iris descansa sobre el cristalino y contiene una pupila que permite transmitir la luz. La pupila cuenta con dos músculos, el esfínter y el dilatador. Dichos músculos disminuyen y aumentan su diámetro respectivamente.

2.2.1.3 Capa interna

La retina está compuesta por la porción óptica y la porción ciega. La primera es sensible a la luz visible y contiene una capa nerviosa (receptiva de luz) y capa pigmentaria (mejora la captación de luz). La segunda es una capa de células soporte.

En la zona anterior del globo ocular podemos presenciar el segmento anterior y segmento posterior. Para el primero la humectación está dada por el humor acuoso y el segundo por humor vitreo. El segmento anterior está dividido por cámara anterior y cámara posterior. La primera se delimita por la parte posterior de la córnea y la parte anterior del iris, y la segundo por la parte posterior del iris y la parte anterior del cristalino. El segmento posterior es compuesto por las estructuras detrás del cristalino, que sería el cuerpo vitreo, la retina, coroides, macula y papila óptica, además de conectar con el nervio óptico [23].

En el glaucoma la cámara anterior presenta un bloqueo en el canal de Schelmm causando un incremento de humor acuoso. Esto conlleva a un incremento de la presión intraocular (PIO). Su medición se lleva por medio de técnicas invasivas como lo son el tonómetro de Goldman. Este mide la respuesta de presión del ojo al golpearlo con un prisma frontal. Se tiene un área de contacto de 7.35 milímetros cuadrados y un diámetro de contacto de 3.06 milímetros. Pero la técnica es afectada por corneas gruesas y delgadas, pues se encuentran fuera de los estándares de medición. La búsqueda de un sistema no invasivo no ha podido dar resultados confiables como lo son la tonometría neumática. El uso de un sistema OCT permite caracterizar físicamente una muestra orgánica. El enfoque principal es el cuantificar los cambios estructurales en la córnea, por medio del cambio de fase. El poder relacionar el cambio de fase al cambio de PIO, permitirá predecir cuadros de glaucoma.

2.2.2 Histología de la córnea

Compuesta por 5 capas: Epitelio corneal, Membrana de Bowman, Estroma, Membrana de Descemet y el endotelio (Figura 2.15).

Epitelio: compuesta por células epiteliales escamosas estratificadas. Cuenta con uniones estrechas entre células que impiden el paso de líquido lagrimal al estroma. Su grosor ronda alrededor de 50 micras.

Membrana de Bowman: membrana acelular compuesta por fibras de colágeno. Son capaces de resistir un golpe, pero una vez destruidas, no es posible regenerarlas. Su grosor oscila los 12 micrones.

Estroma: es el 90% del espesor corneal y se compone de fibras de colágeno orientadas en forma irregular mantenidos por sustancias de proteoglicanos y fibroblastos intercalados. La disposición de sus fibras permite el paso de luz hacia la retina. Su diámetro y distancia entre fibras son iguales, pues es de la mitad de la longitud de onda de la luz visible. El grosor completo del estroma es de 300-500 micras dependiendo de la cantidad de lamelas que lo componen.

Membrana de Descemet: Membrana basal del endotelio de fibras de colágeno. Comparada con la membrana de Bowman, esta es producida constantemente en la vida y puede incrementar de tamaño. Puede variar de 3-10 micras a lo largo de la vida.

Endotelio: Formada por una sola capa de células hexagonales que permiten la hidratación de la córnea gracias a sus bombas que permiten el transporte de iones. Siendo solo una capa simple de epitelio escamoso con grosor de 5 micras [24].

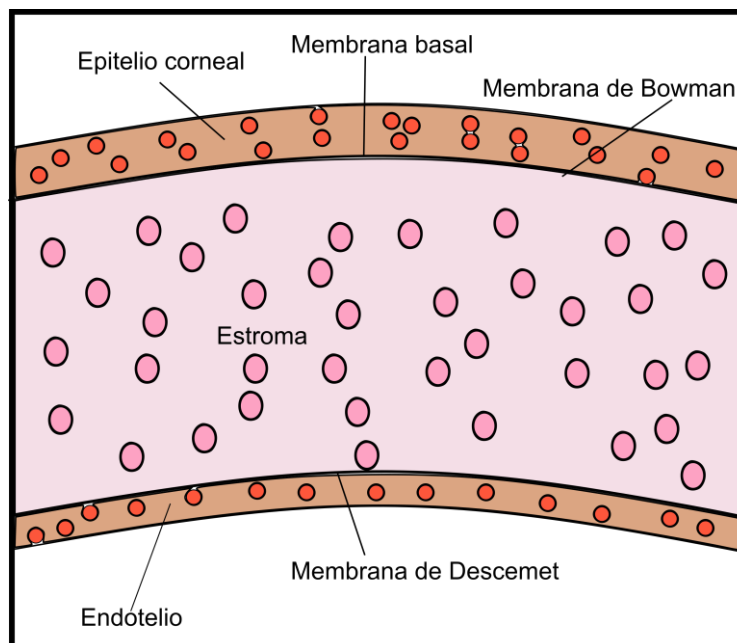


Figura 2.15 Histología de la córnea

2.3 Microinyección

Un sistema de microinyección busca introducir una cantidad de sustancia muy pequeña de alrededor de $15\mu\text{l}$. Normalmente se utilizan agujas de metal o micropipetas de vidrio para ingresar líquido. Estos dispositivos son utilizados normalmente para la inyección de plásticos o para la manipulación de células y control de enfermedades. Tal es el caso [25] de narcóticos que buscan controlar los niveles de PIO, inyectando cantidades de $1\mu\text{l}$.

En la figura 2.16 se tiene un sistema de microinyección básico que puede ser utilizado para controlar la inyección de microlitros en cierta cantidad de tiempo. Es de suma importancia controlar la cantidad inyectada, esto para simular el proceso fisiológico dentro de un organismo, si el fin es crear un modelo para el desarrollo de nuevas técnicas para su detección.

Simulando un incremento de PIO con este sistema y la detección de los cambios por medio de la técnica de OCT y la fase óptica, se plantea cuantificar el desplazamiento de la córnea al inyectar el globo ocular en el espacio esclerocorneal.

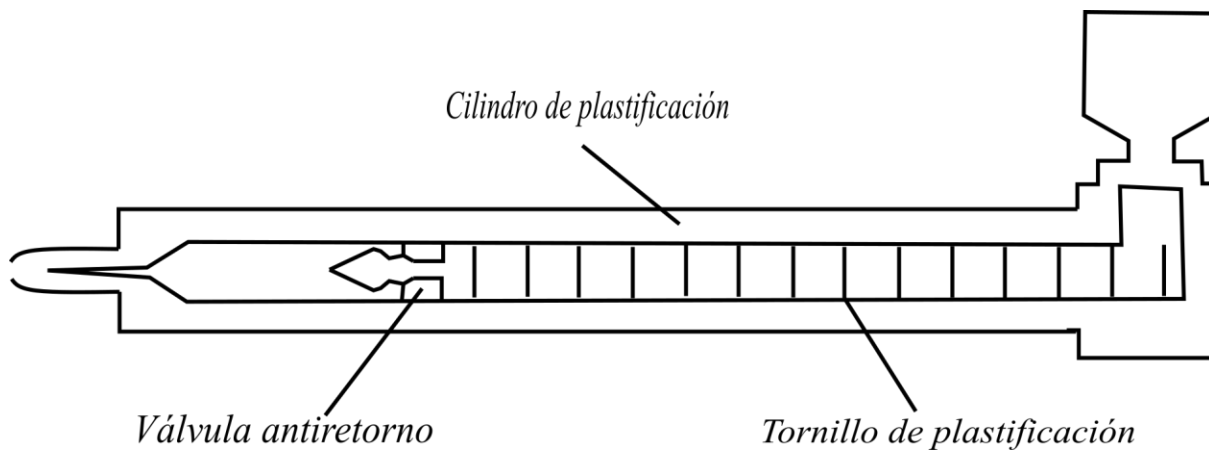


Figura 2.16 Sistema de microinyección básico

3 Desarrollo experimental

3.1 Sistema óptico

El arreglo OCT utilizado para el estudio se encuentra en la figura 3.1. Este consta de 2 fuentes SLD1 y SLD2 con una potencia de 15mW, una longitud de onda de 833.3nm y un ancho espectral de 55.5nm. La segunda de 10mW con una longitud de onda de 843.9nm y un ancho espectral de 99nm. Por medio de un acoplador de fibra 2x2 (A) se combinan ambas fuentes. La unión de ambas busca penetrar y obtener una mayor cantidad de fotones retro dispersados. Se toma una sola salida y esta entra a una montura del arreglo para propagar el haz. Se continua hacia un lente esférico (LE1) con distancia focal de 75mm el cual permite incrementar el tamaño del haz y mantener la fuente colimada. El siguiente elemento es el divisor de haz (BS) con una relación de división de 90/10. Donde el 90% de la intensidad de la fuente es refractada hacia la muestra y un 10% reflejada a un filtro de densidad neutra (FI) que atenúa la intensidad y continua hacia el espejo de referencia (ER) cubierto en oro. El brazo que va hacia la muestra pasa por un lente cilíndrico (LCy1) con distancia focal de 100mm) que enfoca en la muestra paralelo al eje “y”. El espejo (ED) redirecciona el haz en la dirección “-y” hacia la muestra la cual se encuentra sobre una base movable en el eje “y”. Mientras que la montura diseñada permite ajustar la muestra en el eje “z”. Regresan ambos rayos al BS y se continua con una rejilla de difracción (G) con 600 líneas/mm. Esta redirecciona el haz de referencia hacia LCy2 (con una distancia focal de 100 mm), expandiendo el haz perpendicular al eje “y”. Esto expande el haz en sus diferentes longitudes de onda y es captado por un sensor sCMOS (pco.edge).

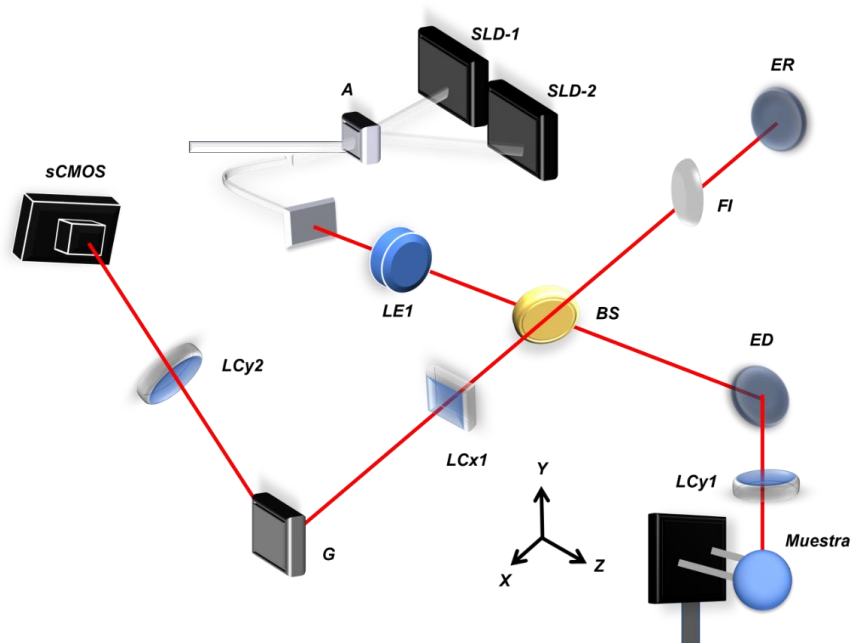


Figura 3.1 Sistema OCT en el dominio de Fourier que permite obtener un B-scan por medio de un sensor 2D.

3.2 Soporte de globo ocular

El diseño de la montura simula la cavidad orbital del cráneo. Para esto se obtuvieron las medidas típicas de diferentes globos oculares porcinos ($r = 14 \pm 1 \text{mm}$) y fueron utilizadas para realizar un diseño 3D que luego fue impreso. El nervio óptico fue considerado como la base para la sujeción del ojo dentro de la montura, pues al ser aprisionado por la montura prohibía su salida. La montura se encontraba soportada por unos vástagos que permitían ajustarla en el eje "x". Mientras que la base donde se colocaron los vástagos permitía modificar la posición en el eje "y" (figura 3.2). Por otro lado, era necesario hidratar el tejido para retrasar su proceso de degradación causado al incidir el SLD en él. Por ello se optó por colocar la montura en dicha posición permitiendo hidratar el globo con una gota.

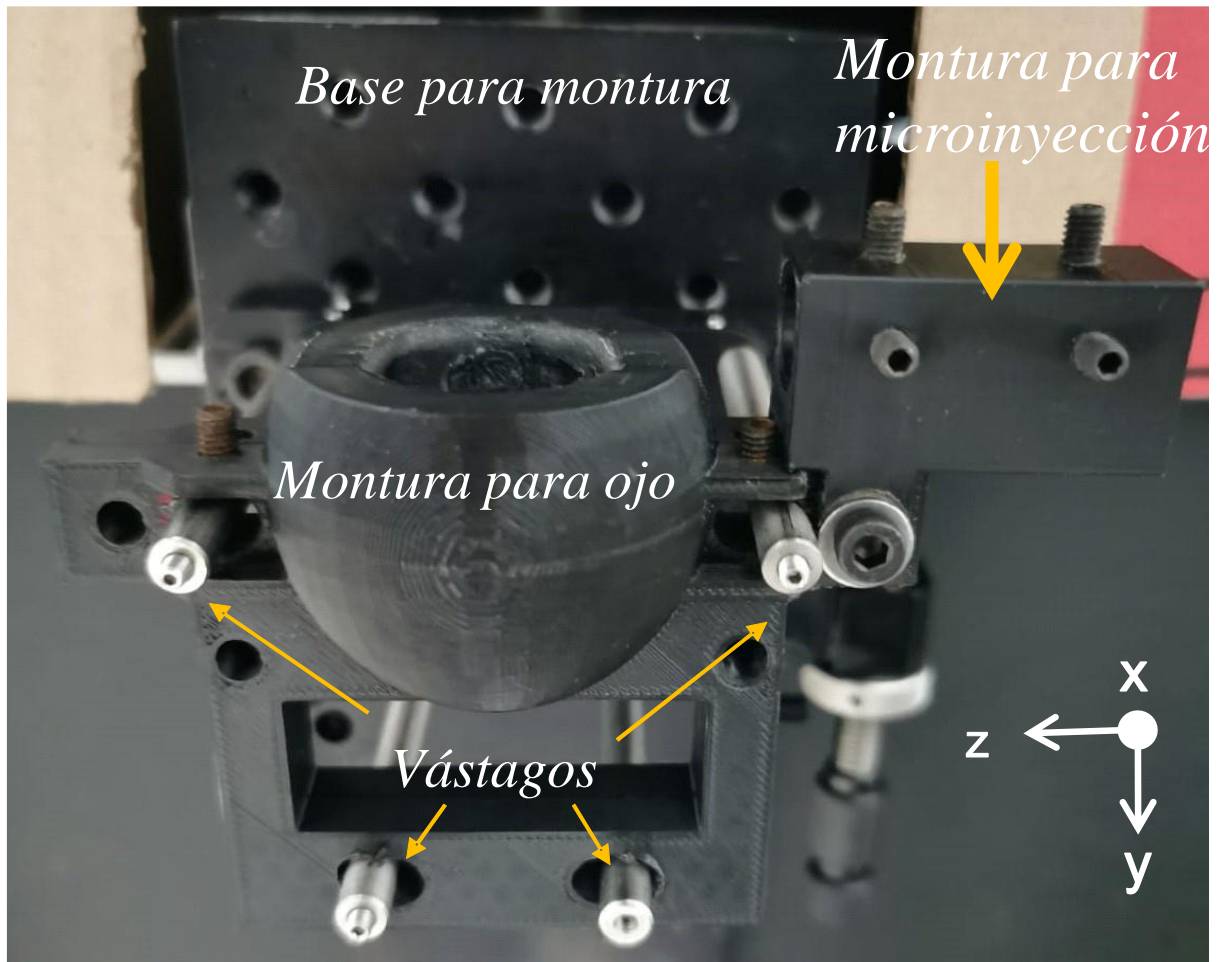


Figura 3.2 Sistema de montura para globo ocular con la adición de la montura para el sistema de microinyección.

3.3 Sistema de microinyección

El sistema de microinyección consta de 3 piezas impresas en 3D (P1, P2 y P3), un motor a pasos controlado por una computadora, dos jeringas (J1 y J2), 1 cánula con adaptadores para ingresar ambas jeringas y una aguja 31G (figura 3.3).



Figura 3.3 Sistema de microinyección

La figura 3.3 muestra la base diseñada para fijar el motor de pasos a la mesa (P1) (Anexo A1). Este motor a pasos recibía la información de la computadora por medio de un Arduino. Al motor se fijó una placa de aluminio para transmitir el desplazamiento a la jeringa próxima del sistema. La primera jeringa (J1) era sujeta por medio de una montura (P2) (Anexo A2) que inhibía su movimiento y permitía que el embolo ejerciera presión e inyectara el líquido. El sistema continuó con una cánula de 75cm donde en un extremo se contaba con la boquilla de la J1 y el otro se ingresaba a la J2 por medio de conexiones hidráulicas. La J2 era sujeta por una base diseñada e impresa (Anexo A3) el cual se ajustaba a la montura del soporte del globo ocular. Esta base contiene opresores que impiden el movimiento de la jeringa y que sea introducida la aguja al ojo y permanezca estática.

3.4 Preparación de la muestra

Se propuso realizar el estudio con un total de 3 grupos para comprobar las diferencias entre corneas dependiendo del tratamiento que se les daba a los globos oculares. El primero y segundo se conseguían en comercios locales, donde el primero (G1) llevaba un proceso de escaldado a una temperatura de 60 grados centígrados y posteriormente se congelaba el tejido. El segundo (G2) llevaba el mismo proceso de escaldado, pero sin congelarse. El tercer grupo (G3) constaba de tejido post-mortem no mayor a 30 minutos. El proceso de extracción fue el mismo realizado como en la referencia [26] donde se podía obtener el globo ocular con su nervio a ciertos centímetros intacto.

3.5 Alineación y primeras imágenes

El proceso de posicionamiento de la muestra y el proceso de incremento de PIO y captura de imágenes se resume en los siguientes pasos:

1. Colocar globo ocular en montura
2. Posicionamiento de montura en vástagos
3. Alineación de tejido con el sistema óptico
4. Ajustar jeringa y aguja
5. Inyección de líquido y grabado de imágenes
6. Procesamiento y análisis de resultados

En el primer punto se posiciona el globo ocular en la montura y esta es ajustada. Para el segundo paso la montura es deslizada sobre los vástagos (figura 3.4 a) para posicionarla en la dirección del haz. En tercer lugar, por medio de un programa generado en MATLAB, se obtiene la señal OCT en tiempo real lo que permite corregir la posición del globo y que quede lo más cerca posible de la “zero delay line”. Una vez alineado, se ajustan los opresores para inmovilizar la montura.

Para el cuarto paso se introduce la aguja en el limbo esclerocorneal, en donde solo ingresa unos cuantos milímetros ya que está muy cercano el iris y podría ser dañado. Una vez colocada, se procede a ajustar los 4 opresores que inmovilizarían la aguja y evitan que la jeringa presente algún movimiento al inyectar el líquido.

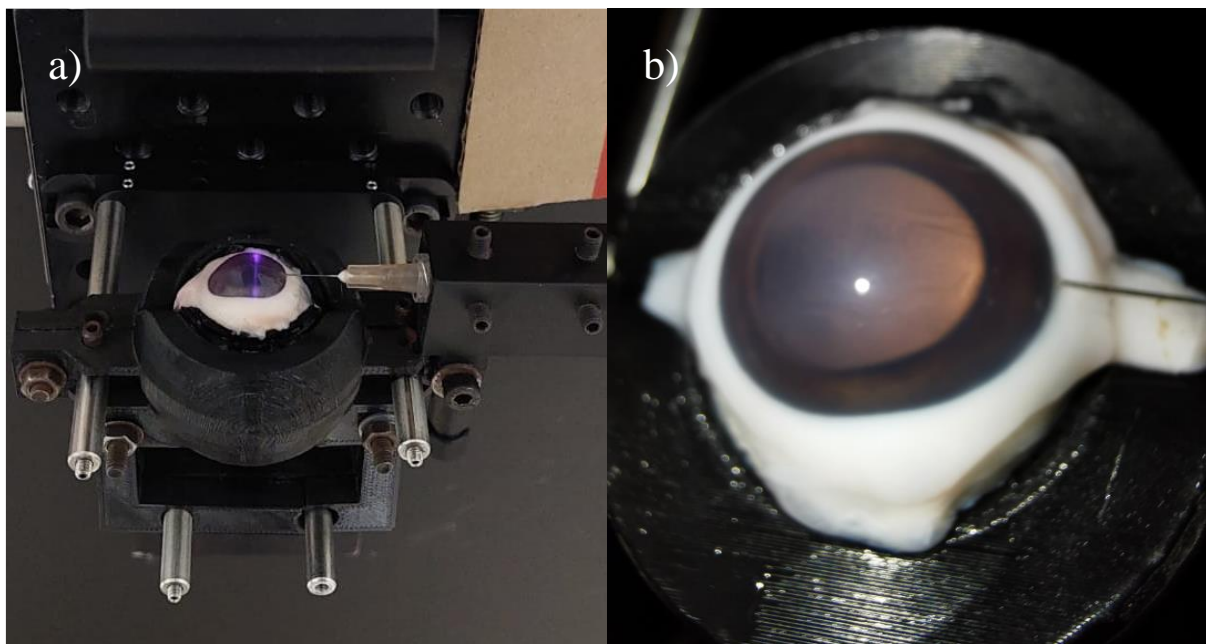


Figura 3.4 a) Alineación de la muestra en el arreglo óptico. b) Zona de inyección (limbo esclerocorneal).

Para poder validar la posición correcta de la inyección se colaboró y consulto a un profesor oftalmólogo de la Universidad de Aguascalientes. Este nos indicó que la zona indicada para inyectar era el limbo esclerocorneal pues nos permite ingresar la presión a la cámara anterior y sin daño alguno a la córnea (figura 3.4 b).

En el quinto paso se incrementa la PIO por medio del motor de pasos. Para esto se programó una secuencia de pasos para tener 3 intervalos de inyección de líquido con descansos entre ellos. En la figura 3.5 se tiene el set de inyección con una duración total de 50 segundos. La prueba inicia con 4s en estado basal para continuar con una rampa de 50 pasos de motor que equivalen a 1µl aproximadamente. Un segundo reposo de 4s seguido de una rampa de 25 pasos que equivalen a 0.5 µl aproximadamente. Un tercer reposo de 4s seguido de otra rampa de 25 pasos y finalmente 6s de reposo. Mientras se lleva a cabo todo este proceso, por medio del sensor toda esta prueba es captada a 20 imágenes por segundo (fps). Este paso se realizó un total de 5 veces por globo ocular, con un tiempo de 2-3 minutos de espera entre pruebas para analizar los resultados (punto 6). Al analizar los resultados se apagaban las fuentes y se realizaba un post-procesamiento y se analizaban los patrones de interferencia grabados. Esto permitía corregir las pruebas o finalizarlas.

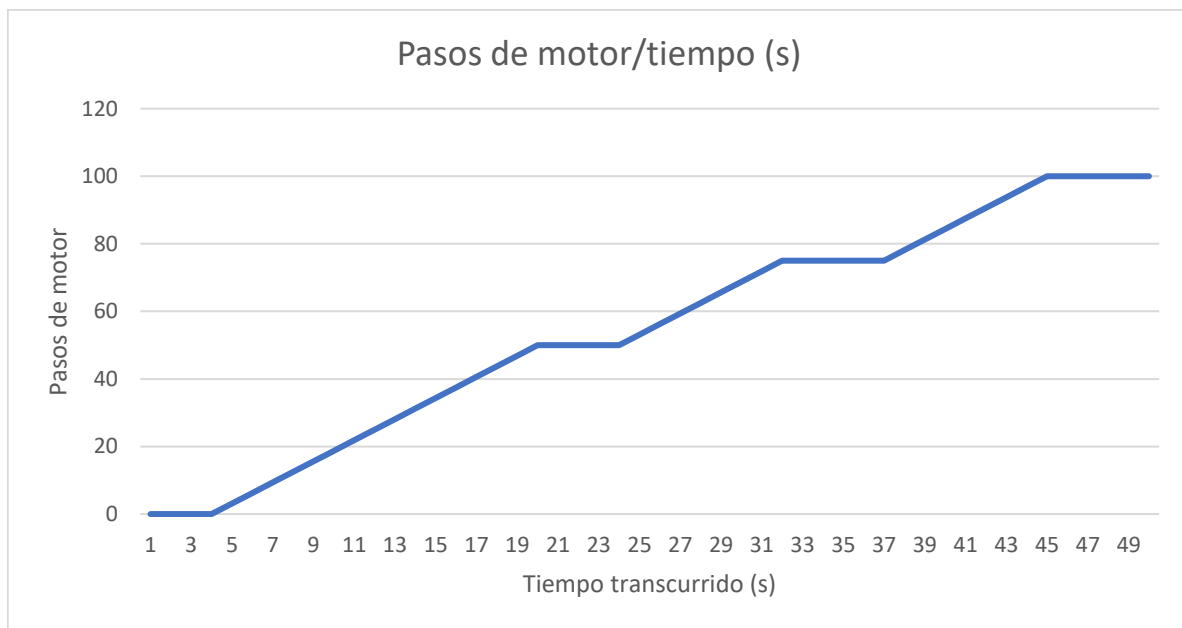


Figura 3.5 Gráfico de pasos de motor contra el tiempo de inyección

El sensor utilizado permitía captar imágenes de 2560x2160 píxeles. Con esto se obtuvo un total de 2160 A-scans con una resolución de 2560 píxeles. Siendo estos capturados 20 veces por segundos, permitía obtener 43,200 A-scans por segundo (doble de la resolución de sistemas comerciales como Leica EnFocus). Además, el sensor nos permitía obtener una escala de gris a 12-bits.

En los 3 grupos se repitieron las pruebas bajo las mismas condiciones y su manipulación fue la misma. Se buscaba que el tiempo de hidratación entre cada gota no fuera mayor a 5 minutos.

A continuación, todas las imágenes de fase óptica y señal OCT tendrán un ancho de 3.6 mm y una penetración (altura) de 1.2 mm a menos de que se especifique lo contrario.

La figura 3.6 muestra una señal OCT de un globo ocular en un estado basal, es decir, no se había incrementado su PIO. Este fue utilizado para poder analizar la respuesta y corregir la alineación, exposición de la cámara, o posicionamiento del globo ocular. Se puede ver que al acercarse la muestra a la “zero delay line”, podemos obtener una alta penetración y con el espejo de referencia colocar la señal de autocorrelación fuera de la muestra.

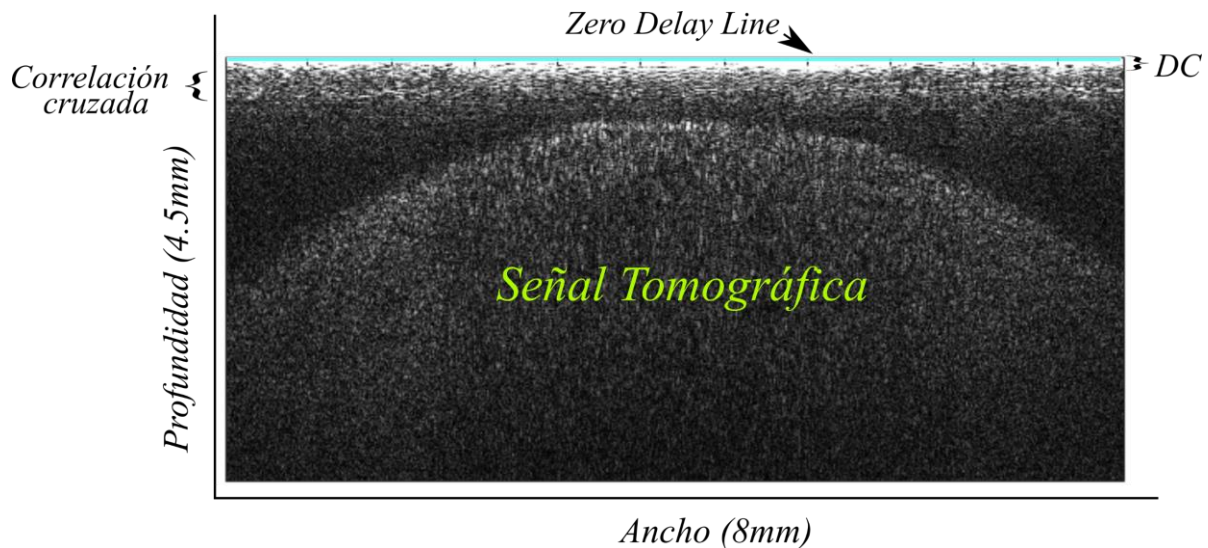


Figura 3.6 Señal OCT de un globo ocular en estado basal. Penetración (altura) de 1.2 mm y ancho de 3.6 mm.

Estos interferogramas son utilizados para calcular la fase entre estados relativos, comparando el estado basal con un estado anterior donde la inyección de líquido incrementa la PIO. Esto fue cuantificado con microlitros, ya que fue la unidad que se pudo calcular con respecto a los pasos del motor. En la figura 3.7 tenemos la gráfica de pasos contra el líquido inyectado en el ojo.

Las imágenes de fase envuelta (figura 3.8) a diferentes cantidades de microinyección, nos permitieron analizar los movimientos y reajustes de la córnea. La figura 3.8 a se representa como la imagen basal o con fase cero. Conforme se incrementa la PIO sería normal esperar un incremento de cambio de fase, esto detallado por el cambio de franjas de oscuro a claro. Para la figura 3.8 b y 3.8 c es notorio como se tuvo un cambio de fase en la zona anterior del ojo, mientras que en la zona del estroma se tiene un cambio de fase de derecha a izquierda. Esto es confirmado con la figura 3.8 d, pues la franja continua y además aparece una tercera. Esto se traduce en desplazamientos medibles en la córnea, confirmando que el sistema OCT es capaz de caracterizar cambios de PIO.

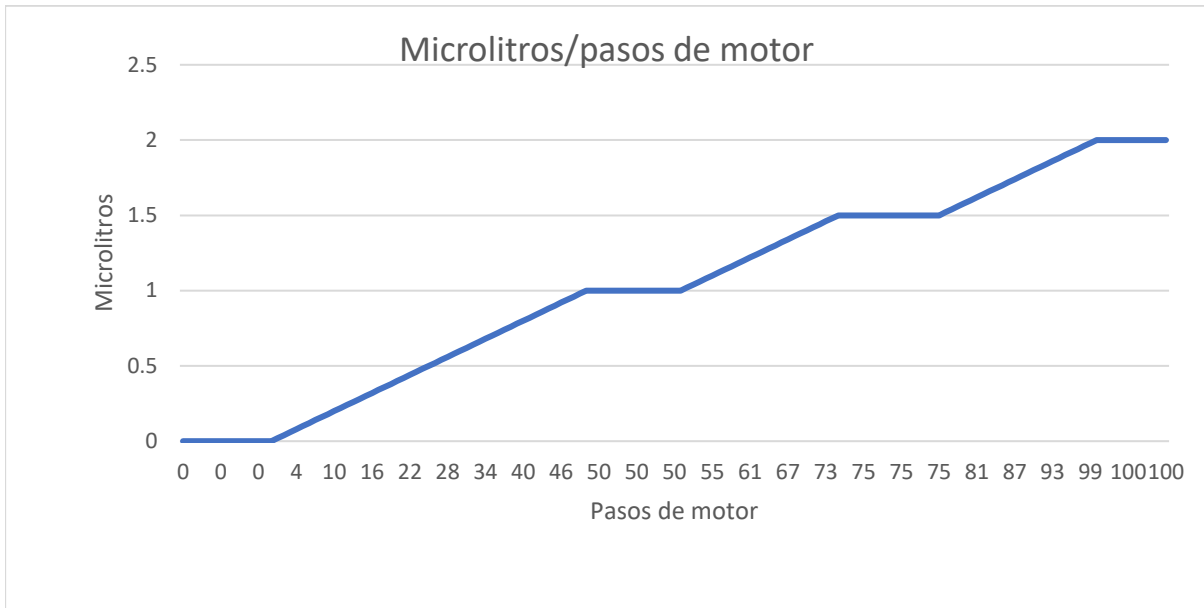


Figura 3.7 Grafico de microlitros inyectados por pasos de motor.

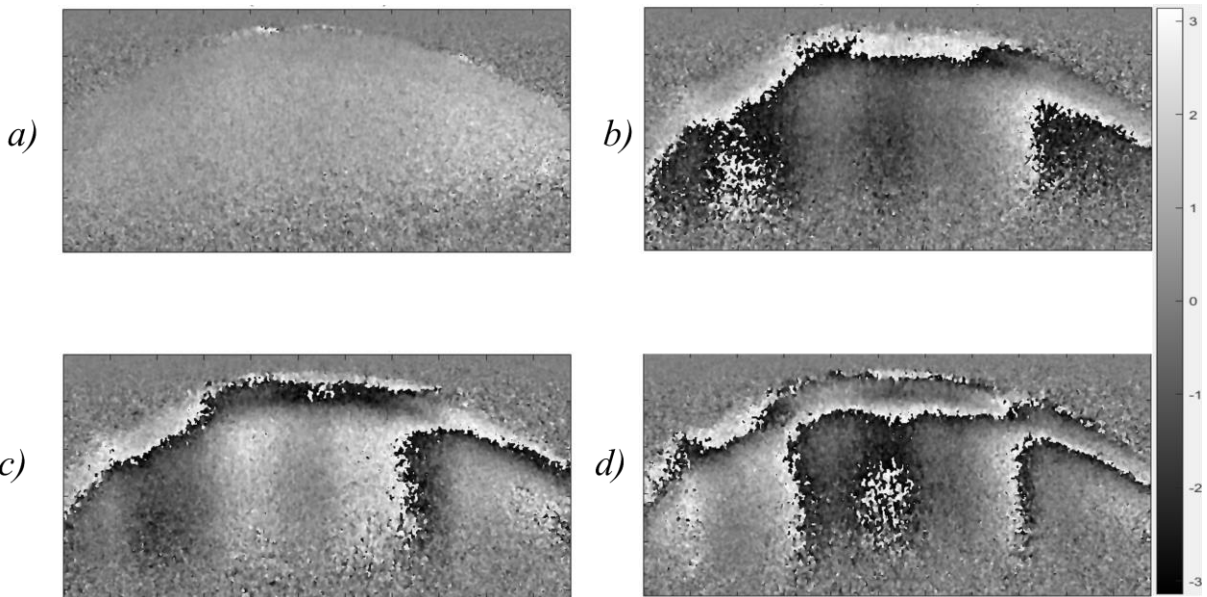


Figura 3.8 Imágenes de fase envuelta a diferentes desplazamientos del motor a pasos. a) 0 μm , b) 17.5 μm , c) 25 μm , d) 34 μm

4 Resultados

Las pruebas se realizaron en los 3 grupos descritos, en todo el proceso se mantuvo los mismos parámetros en el sensor y protocolo de incremento de la PIO. La temperatura del laboratorio se mantuvo en 23 ± 1 grados centígrados con una humedad de $60\% \pm 3\%$.

4.1 Comparación de penetración en señal OCT por grupos

La señal OCT obtenida se encuentra en la figura 4.1 para cada uno de los grupos de estudio. Se tiene una mayor intensidad de la señal para el caso del grupo 1 (G1), esto permite tener un tejido dañado, cuya dispersión disminuye, regresando la mayoría de los fotones al sensor. Para el grupo 2 (G2) se nota una reflexión alta en la zona central de la córnea, mientras que en el grupo 3 (G3), se esparce la mayor cantidad de fotones en la córnea y la penetración disminuye sustancialmente comparado con el grupo 1, pero la córnea se observa mejor.

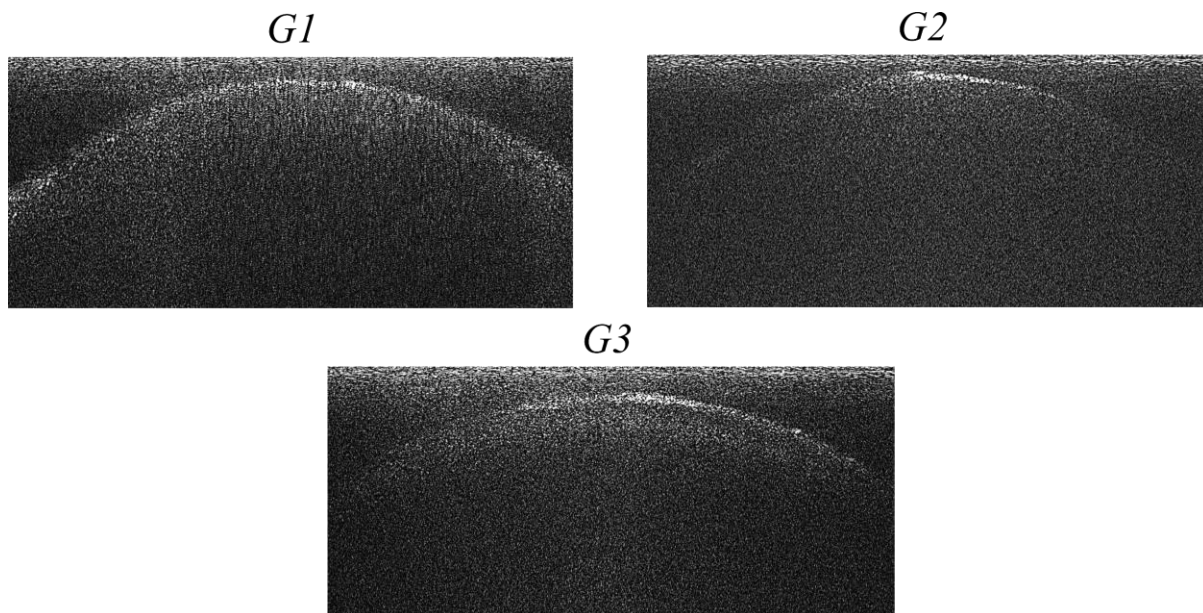


Figura 4.1 Señal OCT de los 3 grupos de estudio. G1 congelado y escaldado, G2 escaldado y G3 post-mortem (30 minutos).

Para cada uno de los grupos se obtuvo un rango diferente de penetración. La figura 4.2-G1 tiene una penetración de 1.079 mm, para el grupo 2 (figura 4.2-G2) 0.611 mm y para el grupo 3 (figura 4.2-G3) 0.516 mm. Esta información fue obtenida con imágenes de diferencia de fase óptica y analizadas con el programa de procesamiento de imágenes ImageJ, y corroborado con un algoritmo en MATLAB. Esto nos lleva a confirmar que el proceso de necrosis entre ellos no era el mismo y que la córnea sufre una reestructuración de sus fibras de colágeno. En el grupo 1 la penetración es mayor ya que las fibras de colágeno son degradadas al congelarse y actúan como un objeto sólido. Dado que en los otros dos grupos la penetración es menor, las fibras no han sido alteradas a ese grado.

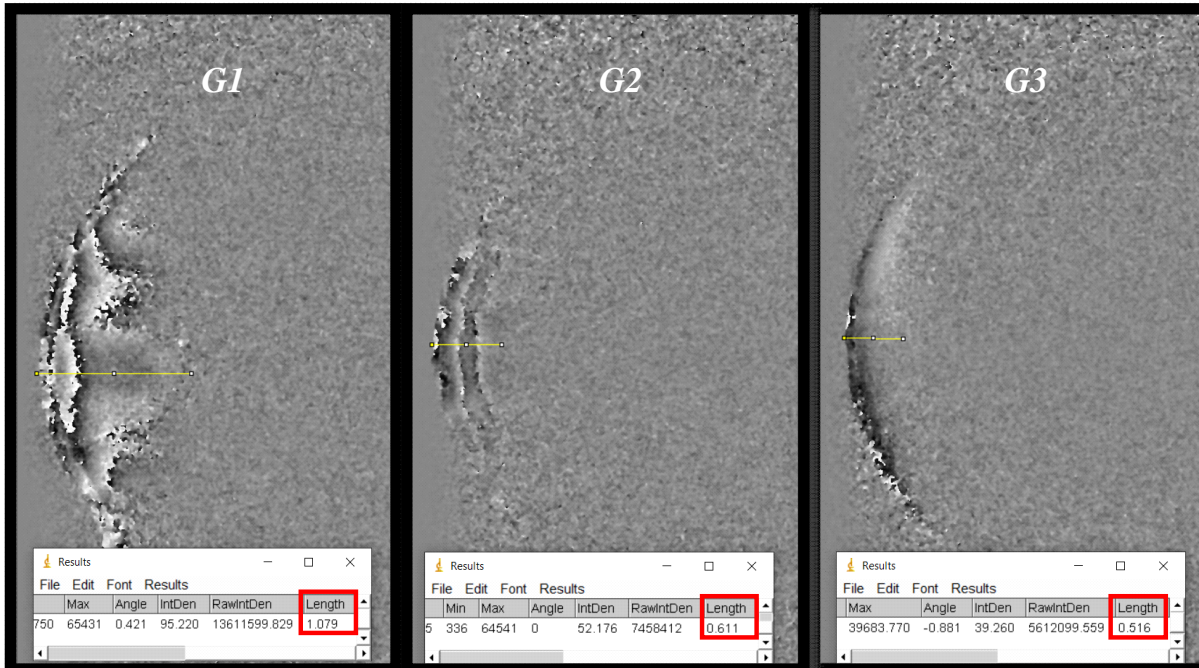


Figura 4.2 Penetración de la señal OCT en cada grupo bajo estudio (valores expresados en milímetros).

4.2 Fase óptica por grupo

La figura 4.3 muestra la diferencia de fase envuelta en cada uno de los grupos de acuerdo con el número de pasos de motor. Tomando como referencia el estado basal anterior al primer paso del motor se calculó la fase óptica. En las siguientes figuras las columnas por grupo (G1, G2 y G3) contienen las fases a 5(A), 15(B), 25(C), 35(D) y 45(E) pasos respectivamente.

	G1	G2	G3
A	Cambios estructurales en la parte central de la córnea. Siendo visible en epitelio y estroma.	Cambios estructurales en la parte central de la córnea. Siendo visible en el epitelio.	Presenta desplazamiento en la parte anterior del epitelio.
B	El desplazamiento sigue la misma trayectoria, aumentando en el centro y reduciendo en los extremos.	Epitelio y estroma mantienen un desplazamiento continuo y similar a lo largo de la córnea.	Desplazamiento radial en dirección “-y”. Interpretado como una distribución uniforme del incremento de la PIO y que el tejido no se comporta como un sólido.
C	Además de concentrar el desplazamiento en la zona central, se está incrementando en la periferia. No se muestra tejido de drenaje.	El desplazamiento es mayor en la zona del epitelio.	Continúa el desplazamiento radial a mayor grado comparado con los anteriores, suponiendo un incremento cada vez mayor de la PIO.

D	El epitelio y el estroma presentan un incremento de franjas repetitivo.	La acumulación de franjas a nivel estroma, indica una saturación.	Es notoria la transición del desplazamiento de la parte posterior del epitelio a su parte anterior.
E	Los extremos presentan deformación al no haber mecanismo de drenaje.	Se observa de-correlación en los extremos.	No hay de-correlación y se ajusta a cambio de PIO.

La diferencia para grupos en la columna a, es que en el caso de G1, el desplazamiento del epitelio y el estroma es mayor comparado con G2 y G3. Para la fila b, continua el mismo desplazamiento entre grupos y un mayor desplazamiento para G1. Este fenómeno se replica para el resto de las filas. Lo importante es ver como en el caso de G1 la presión se concentra en la parte central, mientras que G2 lo hace en toda la córnea y G3 lo presenta radialmente.

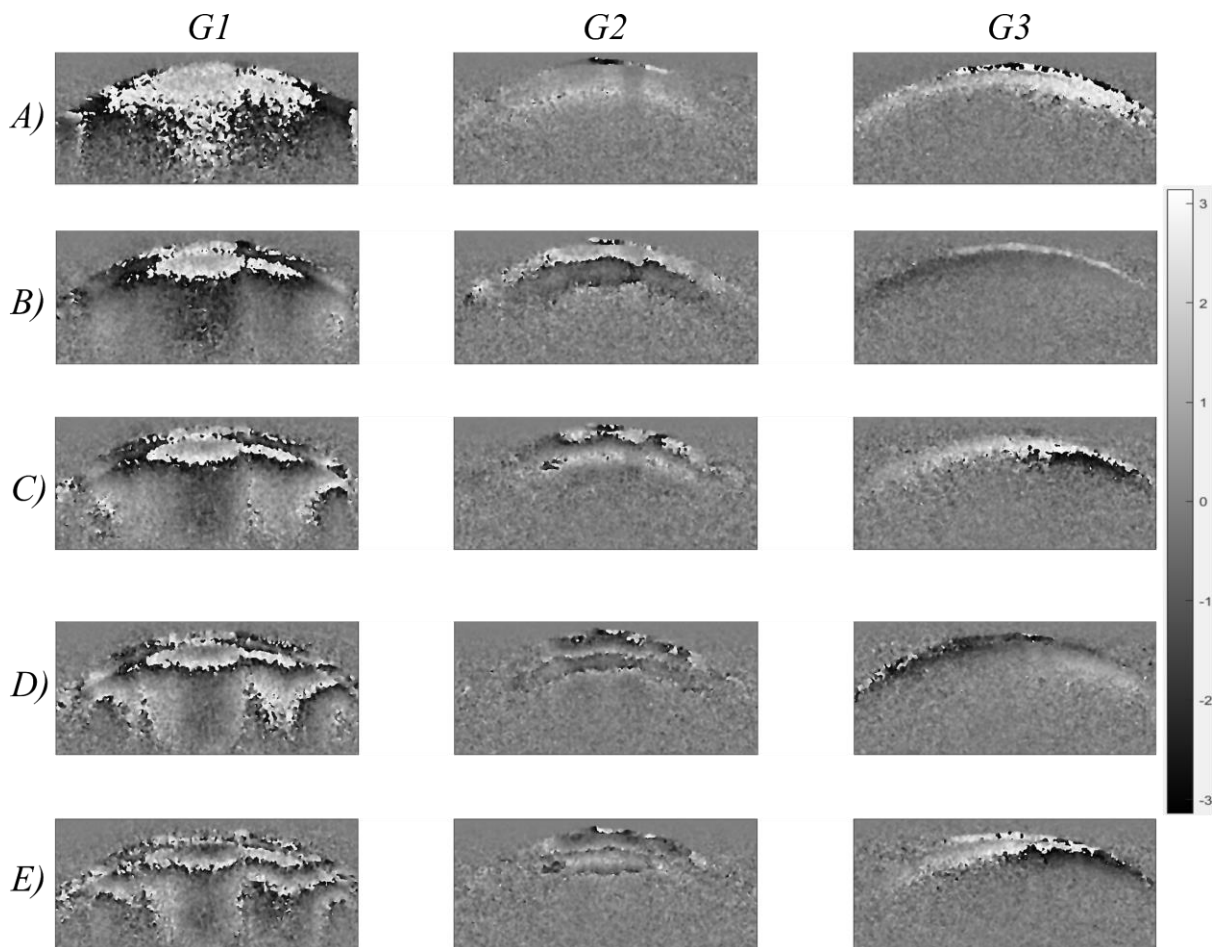


Figura 4.3 Fase envuelta por grupo a diferentes desplazamientos: A) 6.25 μm , B) 18.75 μm , C) 31.25 μm , D) 43.75 μm , E) 56.25 μm

En la figura 4.4, se tiene el desenvolvimiento de las fases anteriores. A estas se les aplico una máscara para que el desentorvedor solo tomara en cuenta la seña del tejido. Para el caso de la columna G1(A, B, C), es notorio como la parte central de la córnea tiene un mayor desplazamiento en comparación con el resto de la muestra. Para G1(C y D) se tiene más desplazamiento en sus extremos. En la columna G2, se presenta desplazamiento entre el epitelio y el estroma. En G2-C la mayor cantidad de desplazamiento se encuentra en el epitelio y es continuo para G2-E, donde se muestra una de-correlación en sus extremos. Por último, en G3-A, G3-B y G3-D los cambios de desplazamiento mayormente se encuentran en el epitelio, mientras que en G3-C y G3-E se nota un incremento substancial en el estroma.

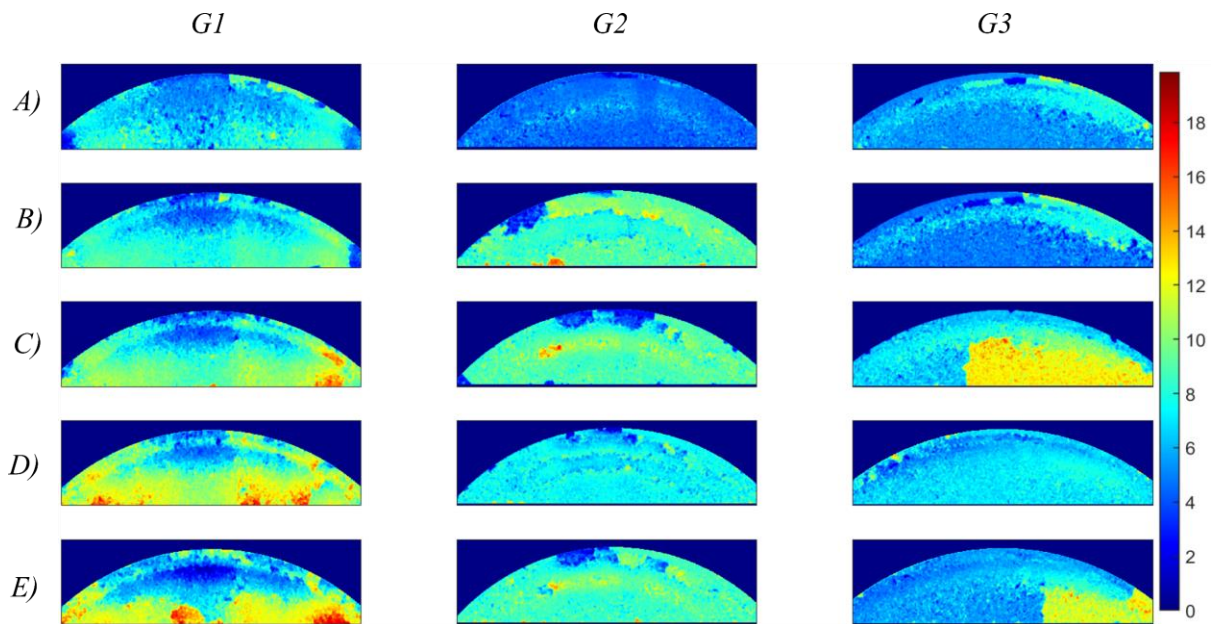


Figura 4.4 Fase desenvuelta por grupo a diferentes desplazamientos: A) 6.25 µm, B) 18.75 µm, C) 31.25 µm, D) 43.75 µm, eE) 56.25 µm

4.2 Respuesta fisiológica al cambio de PIO

La figura 4.5 contiene la fase desenvuelta de los grupos en una representación 3D. Cada uno de los recuadros presentan de frente la parte anterior de la córnea, además se encuentran rotadas para poder apreciar las imágenes en 3D. Las dimensiones para el ancho y profundidad de la muestra continúan como en los casos anteriores.

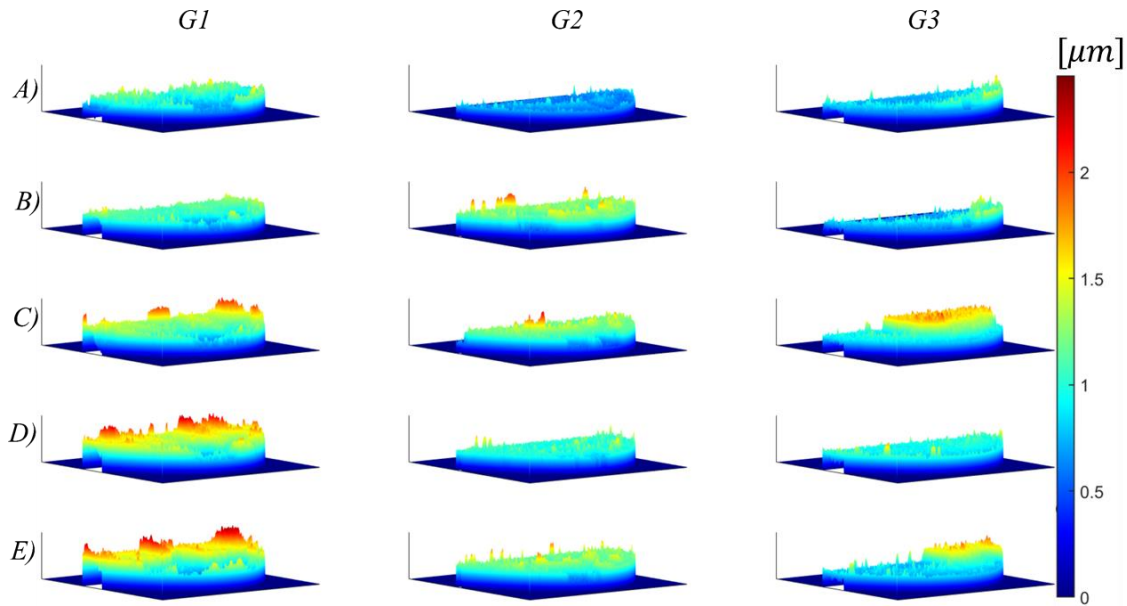


Figura 4.5 Respuesta mecánica de la córnea con inyección de: A) 0.1 μL , B) 0.3 μL , C) 0.5 μL , D) 0.7 μL , E) 0.9 μL con escala de desplazamiento del tejido.

	G1	G2	G3
A	La inyección de líquido causó un cambio de desplazamiento en el estroma y en dirección contraria en el centro del epitelio.	La zona entre el estroma y el epitelio presentó un cambio de morfología.	La parte anterior del epitelio presenta un el cambio de estructura en la mitad de él. Teniendo el estroma en estado basal.
B	Se observa un incremento de movimiento para la estructura del estroma, mientras que la parte central del epitelio, continúa en dirección contraria.	Dado que en la parte posterior del epitelio se presenta mayor cambio, se puede traducir como un cambio del estroma hacia el epitelio.	El desplazamiento es notorio a lo largo del epitelio en su parte anterior.
C	Los extremos de la córnea se mueven de posición y el centro del epitelio continúa con su alteración.	La zona entre el estroma y el epitelio presenta la mayor carga de desplazamiento, pero en la parte anterior del epitelio, centralmente se tiene un cambio contrario.	El cambio en el estroma es mucho mayor que el de la córnea. Puede indicar una sobresaturación de líquido.
D	En el centro del epitelio se nota como el desplazamiento indica un incremento de presión en la zona.	La fase óptica nos revela un cambio completo de la estructura de la córnea, por lo tanto.	La imagen presenta un movimiento total de la estructura de la córnea.

E	Los extremos rebasan en deformación comparados con el centro.	Un desplazamiento central en el epitelio contrario al del estroma, replican el fenómeno anterior al reajuste.	Una segunda saturación del estroma se presenta. Podría indicar que otra vez el ojo es incapaz de drenar la cantidad de líquido.
---	---	---	---

El G1 presenta cambios muy diferentes a los otros grupos a distintos desplazamientos. Lo que sí es consistente es el cambio de desplazamiento dentro del estroma y que constantemente el epitelio cambia de posición. Para la comparativa de G2 y G3 es notorio que en la fila D, ambos grupos presentan un reajuste celular, esto porque el desplazamiento no es consistente con los pasos anteriores. Por lo tanto, un reajuste interno presentaría tal cambio.

5 Discusión y conclusiones

Tomando en cuenta los grupos de estudio que se utilizaron, se concluye que es necesario hacer pruebas en ojo post-mortem para obtener una respuesta fisiológica correcta. Mientras que los grupos 1 y 2 pueden ser utilizados para cuantificar los cambios y corroborar los resultados del sistema. La importancia del grupo 3, es por la aparente funcionalidad del canal de Schlemm, pues nos permite caracterizar los cambios de PIO con su funcionamiento. Para la inyección en la figura 4.5 G3-C y G3-D se detectan los cambios de PIO en el sistema significativos para detectar la presencia de un cuadro de glaucoma.

El canal de Schlemm es capaz de liberar $2\mu\text{L}/\text{min}$ según la referencia 27, es decir, $0.033\mu\text{L}/\text{segundo}$. El sistema que se propuso constaba de una inyección de $1\mu\text{L}/16$ segundos, es decir, $0.0625\mu\text{L}/\text{segundo}$. En la figura 4.5 G3-C se aprecia el incremento de PIO. Viendo que la velocidad del flujo que el canal de Schlemm es capaz de liberar es menor a la inyectada, nos indica una sobresaturación de la cámara anterior. Continuando con la figura 4.5 G3-D aquí se tiene un cambio de la fase, indicando el reacomodo estructural del globo ocular. Por último, una segunda saturación de la cámara anterior se presenta en la figura 4.5 G3-E al tener un incremento del estroma como en el caso anterior.

El sistema OCT desarrollado junto con el sistema de imagenología indirecta, captura imágenes de patrones de interferencia, los cuales son utilizados para caracterizar la posición de la córnea y, además fueron utilizadas para el cálculo de la fase óptica. Con esto se obtuvieron los cambios de PIO en las muestras. También nos permitió corroborar que no se requiere de una fuente de alta potencia, pues la penetración mayor al epitelio no es necesario para cuantificar los cambios de presión. La ventaja es ingresar al estroma para entender el proceso fisiológico de incremento de PIO, y como el canal de Schlemm juega un papel importante para la caracterización de los cambios en la córnea.

Dentro de la literatura, los estudios son enfocados en corneas, mientras que dentro de esta investigación se enfocó en el globo ocular. Al tener la estructura anatómica completa, se observa que la variación de PIO, simulaba las condiciones de aumento de presión que ocurren en un caso de glaucoma. La técnica permite analizar los cambios que van desde los $0.1\mu\text{L}$ en 16 segundos. En todos los grupos al inyectar una cantidad de $0.1\mu\text{L}$ (4.5 G1-A, G2-A, G3-A) se presenta un cambio de desplazamiento de 1.5, 0.5 y $1\mu\text{m}$ respectivamente en cada grupo. Esto porque cada uno tiene una respuesta fisiológica diferente por su tratamiento. También se tiene presente que para la inyección de $0.5\mu\text{L}$ todos los grupos alcanzaron la mayor cantidad de desplazamiento, y se exhibe un reacomodo estructural para los grupos G2 y G3. Por lo tanto, se comprobó que es posible medir ese micro volumen en ojos post-mortem.

6 Bibliografía

- [1] Podoleanu, A. Gh. "Optical coherence tomography." *Journal of microscopy* 247.3 (2012): 209-219.
- [2] YANOFF, Myron; SASSANI, Joseph W. *Ocular pathology*. Elsevier Health Sciences, 2018.
- [3] Manuel, H., Fernando Mendoza-Santoyo, and Jesús Pedroza-G. "Simultaneous birefringence imaging and depth phase resolved measurement using a Fourier domain OCT system." *Optics and Lasers in Engineering* 68 (2015): 104-110.
- [4] Briones, M. J., et al. "Birefringence and deformation measurements in porcine corneas using Fourier domain OCT." *22nd Congress of the International Commission for Optics: Light for the Development of the World*. Vol. 8011. International Society for Optics and Photonics, 2011.
- [5] Muscat, Sarah, et al. "Repeatability and reproducibility of corneal thickness measurements by optical coherence tomography." *Investigative ophthalmology & visual science* 43.6 (2002): 1791-1795.
- [6] Zhou, Boran, Arthur J. Sit, and Xiaoming Zhang. "Noninvasive measurement of wave speed of porcine cornea in ex vivo porcine eyes for various intraocular pressures." *Ultrasonics* 81 (2017): 86-92.
- [7] Elsheikh, Ahmed, Daad Alhasso, and Paolo Rama. "Biomechanical properties of human and porcine corneas." *Experimental eye research* 86.5 (2008): 783-790.
- [8] Kling, Sabine, et al. "Corneal biomechanical changes after collagen cross-linking from porcine eye inflation experiments." *Investigative ophthalmology & visual science* 51.8 (2010): 3961-3968.
- [9] Huang, David, et al. "Optical coherence tomography." *science* 254.5035 (1991): 1178-1181.
- [10] Gåsvik, Kjell J. *Optical metrology*. John Wiley & Sons, 2003.
- [11] Sirohi, Rajpal S. *Introduction to optical metrology*. CRC press, 2017.
- [12] Khan, Mohammed Zahed Mustafa, et al. "Simultaneous quantum dash-well emission in a chirped dash-in-well superluminescent diode with spectral bandwidth > 700 nm." *Optics letters* 38.19 (2013): 3720-3723.
- [13] Brezinski, Mark E., et al. "Optical coherence tomography for optical biopsy: properties and demonstration of vascular pathology." *Circulation* 93.6 (1996): 1206-1213.
- [14] Hedrick, W. R., D. L. Hykes, and D. E. Starchman. *Ultrasound Physics and Instrumentation 4th edn* (St. Louis, MO: Elsevier Mosby). (2005).
- [15] Mendes, Odilon Linhares C., et al. "Automatic segmentation of macular holes in optical coherence tomography images: a review." *Journal of Artificial Intelligence and Systems* 1.1 (2020): 163-185.

- [16] Huang, David, et al. "Micron-resolution ranging of cornea anterior chamber by optical reflectometry." *Lasers in surgery and medicine* 11.5 (1991): 419-425.
- [17] Schuman, Joel S. "Spectral domain optical coherence tomography for glaucoma (an AOS thesis)." *Transactions of the American Ophthalmological Society* 106 (2008): 426.
- [18] Drexler, Wolfgang, and James G. Fujimoto, eds. *Optical coherence tomography: technology and applications*. Springer Science & Business Media, 2008.
- [19] Zhang, Kang, and Jin U. Kang. "Real-time 4D signal processing and visualization using graphics processing unit on a regular nonlinear-k Fourier-domain OCT system." *Optics express* 18.11 (2010): 11772-11784.
- [20] Teramura, Yuichi, Masayuki Suekuni, and Fumihiko Kannari. "Two-dimensional optical coherence tomography using spectral domain interferometry." *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics* 2.1 (2000): 21.
- [21] Manuel, H., Pablo D. Ruiz, and Jonathan M. Huntley. "Double-shot depth-resolved displacement field measurement using phase-contrast spectral optical coherence tomography." *Optics express* 14.21 (2006): 9643-9656.
- [22] Carey Smith (2021). GoldsteinUnwrap2D_r1 (https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/29497-goldsteinunwrap2d_r1), MATLAB Central File Exchange. Retrieved December 26, 2021.
- [23] Argento, Carlos. *Oftalmología General: Introducción para el especialista*. Corpus, 2007.
- [24] Oyster, Clyde W., and Michael C. Barris. "BOOK REVIEWS-The Human Eye: Structure and Function." *Optometry and Vision Science* 76.11 (1999): 735-735.
- [25] Campbell, W. Richard, and David E. Potter. "Centrally mediated ocular hypotension: potential role of imidazoline receptors." *Annals of the New York Academy of Sciences* 763 (1995): 463-485.
- [26] Rousou, C., et al. "A technical protocol for an experimental ex vivo model using arterially perfused porcine eyes." *Experimental eye research* 181 (2019): 171-177.
- [27] Johnson, M. C., and R. D. Kamm. "The role of Schlemm's canal in aqueous outflow from the human eye." *Investigative ophthalmology & visual science* 24.3 (1983): 320-325.

7 Anexo A

Dentro de este anexo se incluyen los diseños CAD utilizados para el sistema de microinyección y la montura para simular la cavidad orbital del cráneo en este orden.

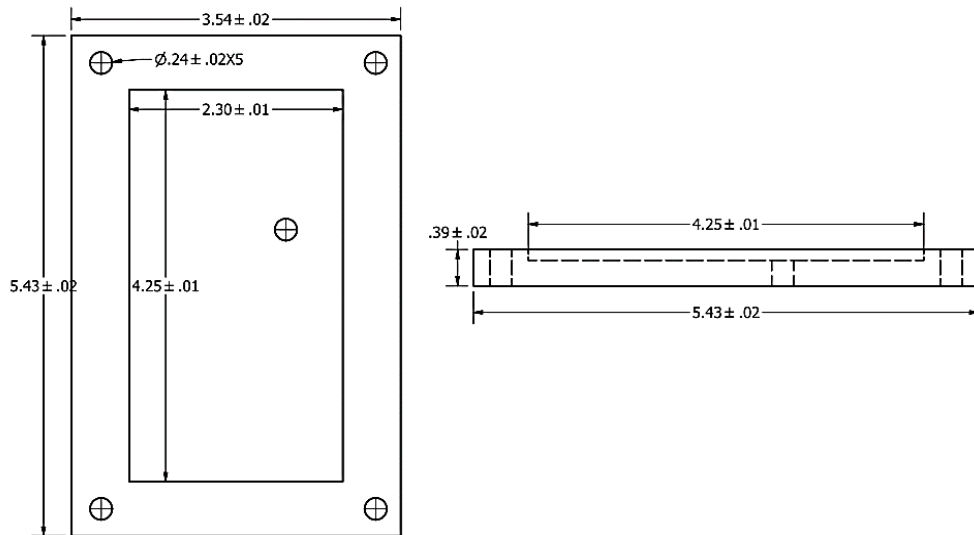


Figura A1 Montura (P1) para motor de pasos.



Figura A2 Vista isométrica del a montura (P1) para motor de pasos en 3D

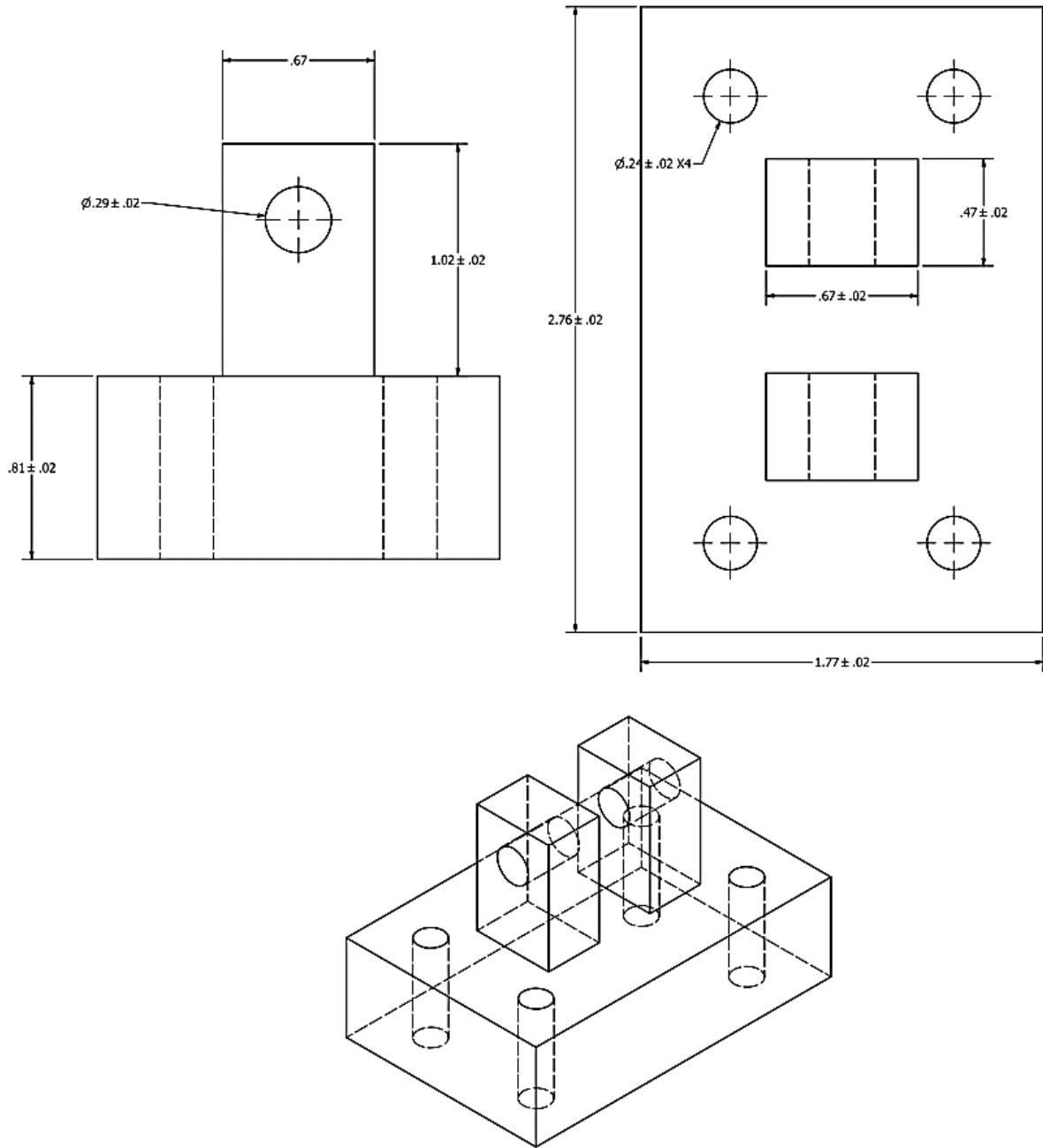


Figura A3 Montura para J1 del sistema.

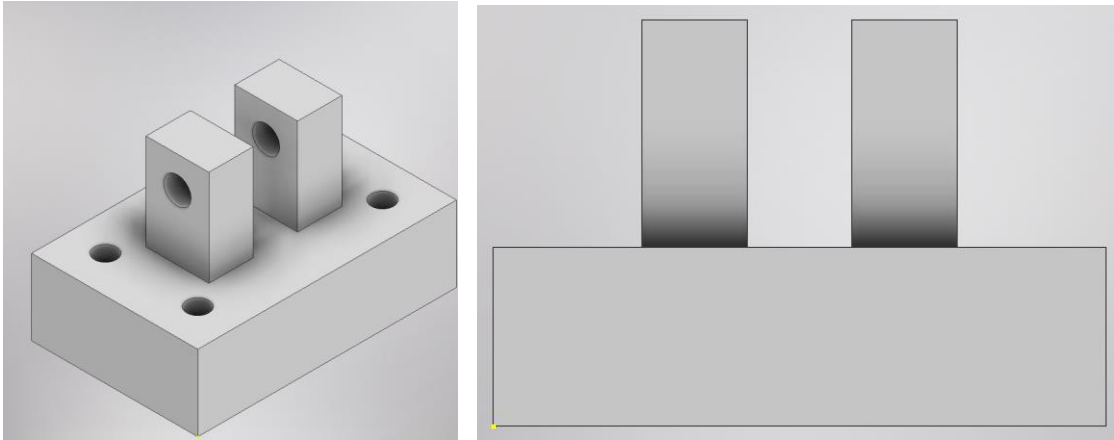


Figura A4 Vistas isométrica y frontal de la montura J1 del sistema en 3D

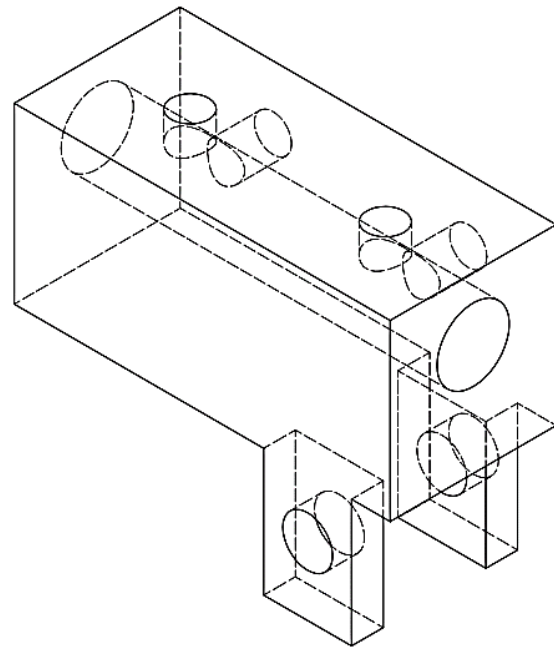
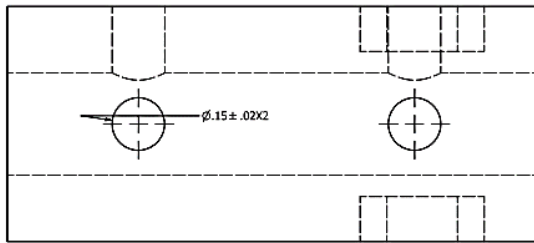
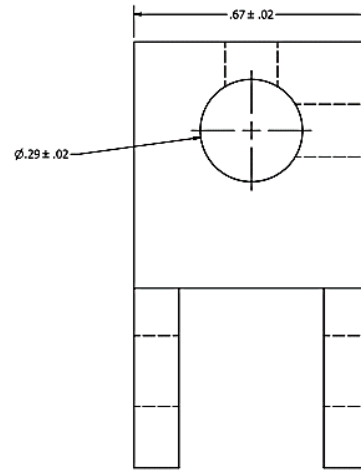
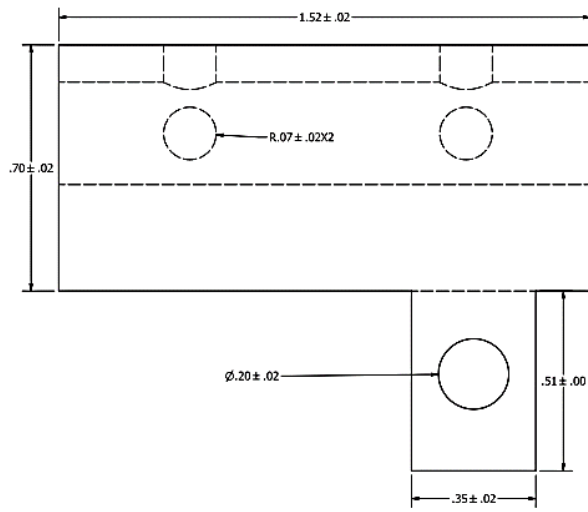


Figura A5 Montura para J2 del sistema.

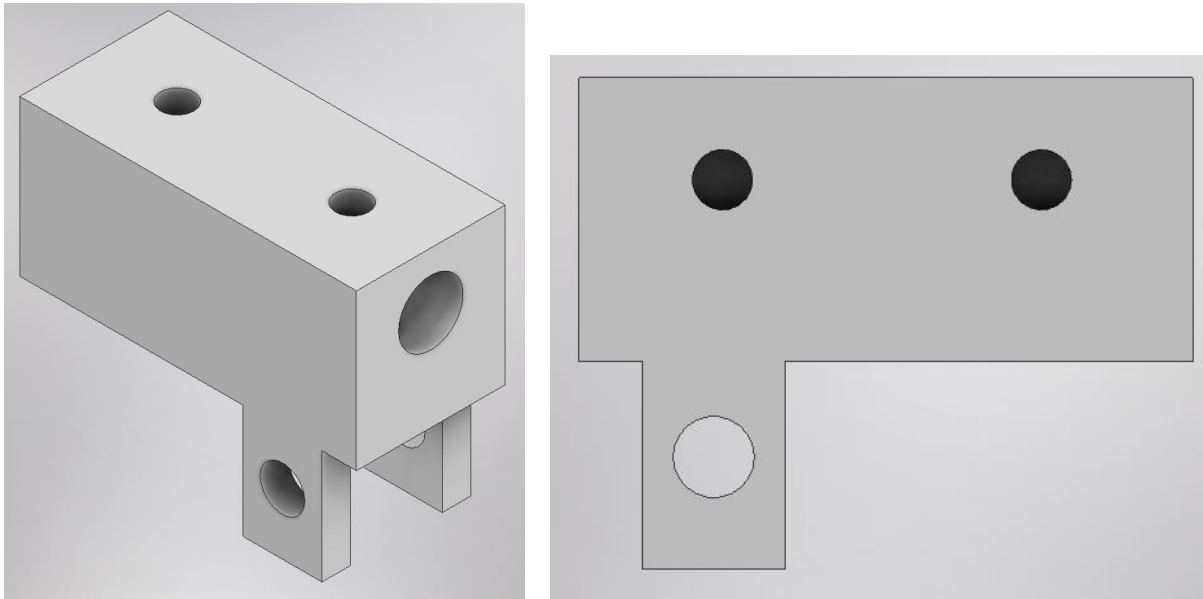


Figura A6 Vistas isométrica y frontal de la montura para J2 del sistema en 3D.

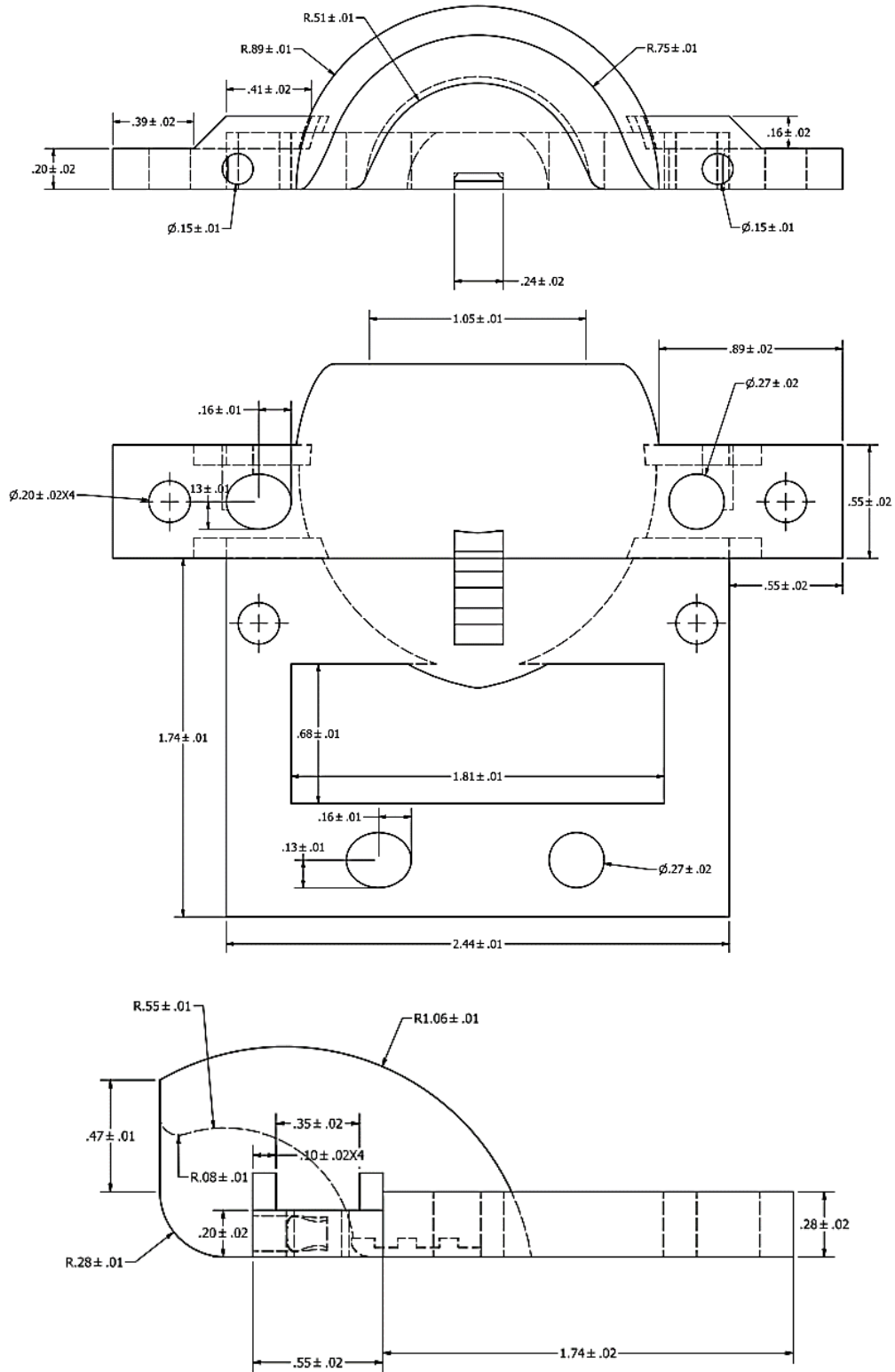


Figura A7 Montura para el globo ocular

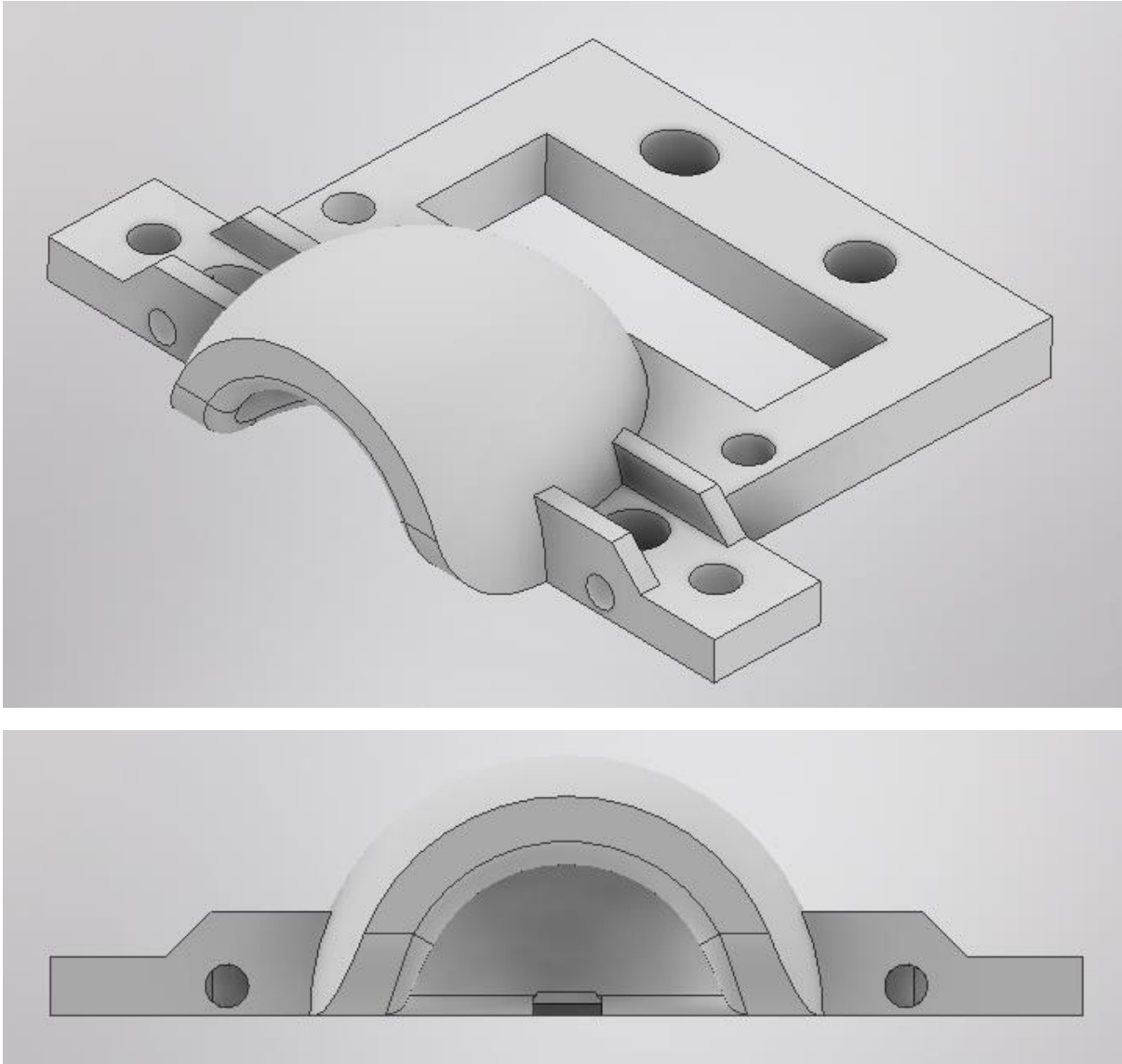


Figura A8 Vistas isométrica y frontal de la montura para el globo ocular en 3D.