



**CENTRO DE INVESTIGACIONES  
EN OPTICA, A.C.**

**“MICROSCOPIA HOLOGRAFICA DIGITAL PARA LA  
CARACTERIZACION DE VARIABLES FISICAS EN MUESTRAS  
DE CELULAS DE PIEL”**



**Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Óptica)  
Versión definitiva. Incluye cambios sugeridos por revisores.**

***Presenta: Natalith Andrea Palacios Ortega***

*Director de Tesis: Dr. Fernando Mendoza Santoyo*

*León · Guanajuato · México*

*Junio de 2022*

*A Daniel, por darme la mano y seguirme en todas mis locuras.*

*A Mamá, Papá<sup>+</sup>, Isabel, Laura y toda mi familia por su sacrificio, oraciones y apoyo.*

## Agradecimientos.

A mi asesor, el Dr. Fernando Mendoza Santoyo y todo su grupo de investigación, por haber depositado su confianza en mí, por compartirme su conocimiento y experiencia, por su guía durante todo mi proceso de doctorado.

Al Centro de Investigaciones en Óptica por acogerme, y a los investigadores que con sus consejos, enseñanzas y ejemplo me han instruido y motivado en este camino.

A mis amigos, mis hermanos de México, Perú, Cuba y Colombia, con quienes no sólo compartí clases y laboratorios, sino que rápidamente se convirtieron en mi apoyo en los fracasos y triunfos; quienes siempre me brindaron una amistad cálida y me hicieron sentir como si nunca hubiera dejado mi país.

Los autores deseamos agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) por el apoyo brindado a través del programa de Becas Nacionales para extranjeros (636621), sin el cual no habría sido posible el presente trabajo de investigación.

## Contenido

Resumen.....	6
Introducción.....	7
Capítulo 1.....	9
Fundamentos de la Microscopía Holográfica.....	9
1.1.    Holografía, hologramas en línea y fuera de eje.....	10
1.1.1.    Holografía en línea.....	11
1.1.2.    Holografía fuera de eje.....	12
1.2.    Holografía Digital.....	14
1.2.1.    Métodos de reconstrucción en holografía digital.....	14
1.3.    Microscopía Holográfica Digital.....	17
1.3.1.    Sistema de Microscopía (General).....	18
1.3.2.    Resolución del Sistema.....	19
1.3.3.    Configuraciones básicas de Microscopía Holográfica Digital.....	24
1.3.4.    Importancia y diversas aplicaciones de la Microscopía Holográfica Digital.....	25
Referencias.....	28
Capítulo 2.....	31
La piel: histología básica y cáncer de piel.....	31
2.1.    Capas de la piel.....	32
2.1.1.    Epidermis.....	33
2.1.2.    Dermis.....	37
2.2.    Cáncer de piel.....	37
2.2.1.    Carcinoma de células basales.....	38
2.2.2.    Carcinoma de células escamosas.....	38
2.2.3.    Melanoma.....	40
2.3.    Cáncer de piel: Detección.....	41
Referencias.....	45
Capítulo 3.....	48
Obtención simultánea del índice de refracción y espesor en un arreglo de Microscopía Holográfica Digital.....	48

3.1.	Técnicas de desacoplamiento entre índice de refracción y espesor de muestras en sistemas DHM.	49
3.1.1.	Obtención del índice de refracción por evaluación directa del espesor.	49
3.1.2.	Desacoplamiento de índice de refracción y espesor por medio de dos mediciones interferométricas.	51
3.1.3.	Microscopía Tomográfica de Fase.	53
3.2.	Obtención de índice de refracción y espesor en la línea celular de melanoma A375.	54
3.2.1.	Desacoplamiento del índice de refracción y espesor por dos mediciones interferométricas, introduciendo un ángulo de inclinación.	54
3.2.2.	Arreglo experimental.	55
3.2.3.	Línea celular A375.	56
3.2.4.	Método experimental.	57
3.2.5.	Reconstrucción del holograma y filtraje del DC.	59
3.2.6.	Resolución del sistema.	60
3.2.7.	Resultados.	61
3.2.8.	Análisis del método propuesto con una muestra conocida.	65
	Referencias.	70
	Capítulo 4.	73
	Microscopía Holográfica Digital con doble longitud de onda para el análisis de muestras de queratoacantoma.	73
4.1.	Desenvolvimiento Óptico de Fase.	74
4.2.	Captura y reconstrucción de hologramas de muestras de tejido de biopsia de piel.	76
4.2.1.	Preparación del tejido analizado bajo la técnica del desenvolvimiento óptico de fase.	76
4.2.2.	Arreglo experimental de DHM para el desenvolvimiento óptico.	78
4.2.3.	Metodología para registrar hologramas de forma simultánea a doble longitud de onda.	80
4.2.4.	Resultados.	82
	Conclusiones Generales.	95
	Referencias.	97

## Resumen.

La Microscopía Holográfica Digital, conocida en inglés como Digital Holographic Microscopy (DHM), es una técnica cuyo potencial radica en la recuperación de información de fase del objeto de estudio, además de la amplitud, como se hace con la microscopía convencional. Esto permite conocer un mayor número de parámetros diferenciadores para descartar la presencia de alguna patología. Por ejemplo, por medio de DHM se han evidenciado diferencias entre el índice de refracción de células cancerígenas y el de células normales [1].

Estudios similares con DHM podrían ser de gran ayuda en la caracterización de células de cáncer de piel, ya que nuevas y mejoradas técnicas podrían servir en su diagnóstico, el cual consiste en un examen cualitativo, y en algunos casos en la extracción de una biopsia. La principal causa del cáncer de piel son las altas exposiciones a radiación solar UV.

En esta tesis, se implementó un sistema de DHM para la medición del índice de refracción y espesor en la línea celular de melanoma A375, acompañado de un novedoso modelo matemático para desacoplar estas variables. Adicionalmente, se configuró un sistema de DHM para obtener mapas de fase desenvueltos ópticamente. Con este arreglo, se realizaron mediciones de espesor y longitud en la epidermis de muestras de una biopsia con cáncer de piel de células escamosas de bajo grado. Ambas técnicas fueron corroboradas por medio de una muestra conocida.

Para la línea celular A375 se obtuvieron índices de refracción correspondientes al estado deshidratado de esta muestra; ya que arrojaron valores mayores a los del agua. Además, se obtuvieron mapas de fase no envuelta ópticamente para la capa córnea de la epidermis, así como de una de las lesiones características de la patología diagnosticada. Los queratinocitos de las capas basal y espinosa también fueron medidos, encontrándose una posible diferenciación entre muestras con y sin lesión.

## Introducción.

El cáncer de piel es el más común en los Estados Unidos [2], [3], [4], [5], [6]; del cual, su principal causa es la radiación solar ultravioleta. Existen tres tipos de cáncer de piel: siendo los de células basales y células escamosas los más comunes, y el de melanoma el menos común pero más letal. En la actualidad, para diagnosticar alguno de estos tipos de cáncer de piel se realiza inicialmente un examen físico, en donde el médico tratante analiza de forma cualitativa las lesiones o cambios en la piel sospechosos y, más adelante, un dermatólogo analiza las lesiones con técnicas no invasivas como la dermatoscopia. De ser necesario, se realiza una biopsia que implica extraer una parte del tejido sospechoso para ser analizado con el patólogo, quien gracias a su experticia y conocimiento de diversas patologías brinda un diagnóstico basado en el análisis del tejido a nivel microscópico, observando la muestra en un microscopio óptico comercial. Este análisis por lo regular es cualitativo y a nivel 2D de la muestra en cuestión.

En la actualidad, además de este tipo de exámenes y técnicas de diagnóstico como las tomografías y las imágenes de resonancia necesarias cuando se sospecha que el cáncer se ha propagado más allá de la piel, se ha empezado a implementar, especialmente en Europa y algunas partes de Estados Unidos, la microscopía confocal. Con esta técnica, se puede observar el tejido bien sea de una biopsia extraída o directamente sobre el paciente, sin ser invasivo.

Cuando se habla de técnicas como la microscopía confocal como herramienta de diagnóstico de cáncer de piel, reafirma un uso cada vez más común de los métodos ópticos no invasivos en objetos biológicos.

El uso de las técnicas de metrología óptica no era muy común hasta hace un par de décadas. Su avance ha permitido que, la Microscopía Holográfica Digital se muestre como una herramienta exitosa en la medición de parámetros físicos y mecánicos, en objetos estáticos y dinámicos, en muestras de diversos orígenes, y en distintos estados. Esto ha sido posible

gracias a la información de fase y amplitud registrada en un patrón de interferencia, que permite no sólo realizar mediciones en 2D sino también 3D.

En el presente trabajo de tesis doctoral, se implementó y puso a punto un sistema de Microscopía Holográfica Digital (DHM: Digital Holographic Microscopy), en dos configuraciones: una primera, con la introducción de una inclinación para el desacoplamiento de las variables de índice de refracción y espesor. Además, se propone un novedoso modelo matemático para dicho desacoplamiento, que permitió a partir del registro y procesamiento de los hologramas capturados, reportar información concerniente a la línea celular A375, que corresponde a melanoma.

En una segunda etapa experimental, se configuró el arreglo de DHM a doble longitud de onda para obtener información de fase no envuelta por el método de Desenvolvimiento Óptico de Fase, (conocido por su sigla en inglés, OPU: Optical Phase Unwrapping). En esta configuración, se registraron y procesaron hologramas correspondientes a muestras de células de piel diagnosticadas por un patólogo con queratoacantoma. Esta patología, de acuerdo con algunos autores, es un cáncer de células escamosas de bajo grado.

Con el arreglo de DHM a dos longitudes de onda, se realizaron mediciones con el fin de buscar una diferenciación entre muestras que presentaban lesión y las que no. Este trabajo es de gran importancia, debido al aporte que se da para el estudio y conocimiento más profundo de la patología de queratoacantoma en una muestra preparada bajo protocolos clínicos estándares.

El presente documento se encuentra dividido en cuatro capítulos. Un primer capítulo donde se abordan generalidades de la Holografía, Microscopía y Microscopía Holográfica Digital, finalizando con un breve resumen de algunos trabajos que han empleado DHM para el análisis de muestras biológicas. En el segundo capítulo, se aborda el tema de la piel, sus funciones, capas, y el tipo de células que en estas se encuentran, el cáncer de piel, sus clasificaciones, causas y características microscópicas. El capítulo tres da una descripción sobre el estado del arte respecto de las técnicas de desacoplamiento de índice de refracción y espesor en muestras biológicas, el montaje experimental que se implementó, el modelo matemático propuesto y los resultados obtenidos de índice de refracción y espesor en la línea celular A375 y una muestra de un escalón de SiO<sub>2</sub> conocida. En el cuarto y último capítulo se explica brevemente la técnica y ventajas del Desenvolvimiento óptico de fase. Se presenta el arreglo experimental configurado, y los resultados obtenidos de longitud y espesor en muestras de una biopsia de piel de un paciente diagnosticado con queratoacantoma. Así como en el capítulo tres, la técnica de desenvolvimiento óptico también es probada con la muestra de SiO<sub>2</sub>.



## Capítulo 1.

### Fundamentos de la Microscopía Holográfica.

La Microscopía Holográfica Digital o DHM (por su sigla en inglés: Digital Holographic Microscopy) se remonta a dos hitos en la Óptica que se dieron muchos años atrás: la invención del láser, y el desarrollo de la Holografía analógica. Los inicios de la holografía, nos llevan al trabajo de Gabor, quien en búsqueda de mejorar la resolución de un sistema de microscopía electrónica, se encontró con esta técnica [7]. La holografía se fundamenta en los fenómenos de interferencia y difracción, donde el primero describe el proceso de registro de un holograma y el segundo su reconstrucción.

El potencial de la holografía radica en la capacidad que esta tiene de almacenar información de amplitud y fase del objeto registrado a partir de la captura de un patrón de interferencia. Esto implica poder reconstruirlo en 3D, de hecho, la palabra holografía tiene su origen en las palabras griegas, holos (todo) y grafos (representación). Esta técnica presentó un crecimiento hacia la década de los 80s, donde además de emplear la holografía para el arte y la publicidad, también empezó a aplicarse mucho en pruebas de metrología óptica, tales como la interferometría holográfica. Para este tiempo, el registro y reconstrucción de hologramas se realizaba especialmente con películas fotográficas de muy alta resolución, conocidas también como películas holográficas, que dependían de los materiales de registro, sus complejos procesos de revelado y fijado de la emulsión fotográfica.

El reemplazo de estas películas holográficas se da gracias a la creación de la captura electrónica de imágenes por medio de cámaras VIDICON, y más tarde de forma digital con los sensores CCD y CMOS, naciendo así la holografía digital. Si bien esta técnica se trabajó también con cámaras de video analógicas conocidas como VIDICON, son las cámaras

digitales, en conjunto con el avance de las herramientas tecnológicas en búsqueda de mejores tiempos de procesamiento, las que permitieron explotar todas sus capacidades, ya que han permitido explorar ampliamente, la captura, procesamiento y reconstrucción de los hologramas en tiempo real para el análisis de fenómenos no sólo estáticos sino también dinámicos.

El desarrollo de nuevas y mejores fuentes de luz láser, han ayudado a que la microscopía holográfica digital sea tan reconocida y trabajada desde inicios del siglo XXI hasta nuestra época, con variaciones y nuevos avances en los algoritmos de reconstrucción, nuevas implementaciones experimentales como la microscopía de superresolución [8], [9] entre otros. Incluso hoy día, ya se comercializan sistemas de DHM para uso en aplicaciones biomédicas [10].

En este primer capítulo se describirán brevemente, los principios básicos que involucran la holografía y la matemática necesaria para el proceso de reconstrucción. Una vez entrando a la microscopía, se hablará respecto de la resolución axial y lateral, las configuraciones más empleadas en DHM como lo son un interferómetro Mach-Zehnder en transmisión o reflexión, así como la configuración para un arreglo de DHM en línea. Al final, se dará un pequeño estado del arte sobre algunas aplicaciones de DHM y su importancia para la medición y estudio del índice de refracción y espesor en muestras biológicas, patológicas y relacionadas.

## 1.1. Holografía, hologramas en línea y fuera de eje.

La holografía es una técnica basada en dos fenómenos ópticos: interferencia y difracción. Su invención en 1939 por Dennis Gabor se da unos años antes de la invención del láser. El proceso de obtención de un holograma conlleva un registro en el cual un patrón de interferencia es grabado en una placa sensible a la luz, o en el caso de la holografía digital, en un sensor tipo CCD o CMOS. Posteriormente, en la etapa de reconstrucción, el holograma digital es sometido a algoritmos numéricos de propagación para la obtención de fase y amplitud. En el caso analógico, y, dependiendo del material fotosensible, el holograma pasa por una etapa de procesamiento químico consistente en revelar y fijar la película holográfica previa a su reconstrucción. A continuación, se detallará sobre el proceso de registro o captura de un holograma y los algoritmos necesarios para la reconstrucción de los hologramas digitales.

### 1.1.1. Holografía en línea.

El registro de un holograma se entiende desde el fenómeno de interferencia, de donde resulta un patrón de intensidad de la forma:

$$I = |U_R + U_O|^2 = |U_R|^2 + |U_O|^2 + U_R^* U_O + U_R U_O^* \quad (1)$$

Donde  $U_R$  y  $U_O$  representan la amplitud compleja del campo eléctrico asociado a los haces referencia y objeto que entran en interferencia, y  $U_R^*$  y  $U_O^*$  son sus correspondientes complejos conjugados.

De acuerdo con la Fig. 1(a), en los hologramas “en línea” se puede considerar un haz pasando a través de un objeto, en la interacción con este, parte de la luz será difractada por cada punto del mismo y otra parte no. La parte difractada es entendida como el frente de onda que lleva la información del objeto (haz objeto) mientras que la parte no difractada corresponde al haz referencia [11].

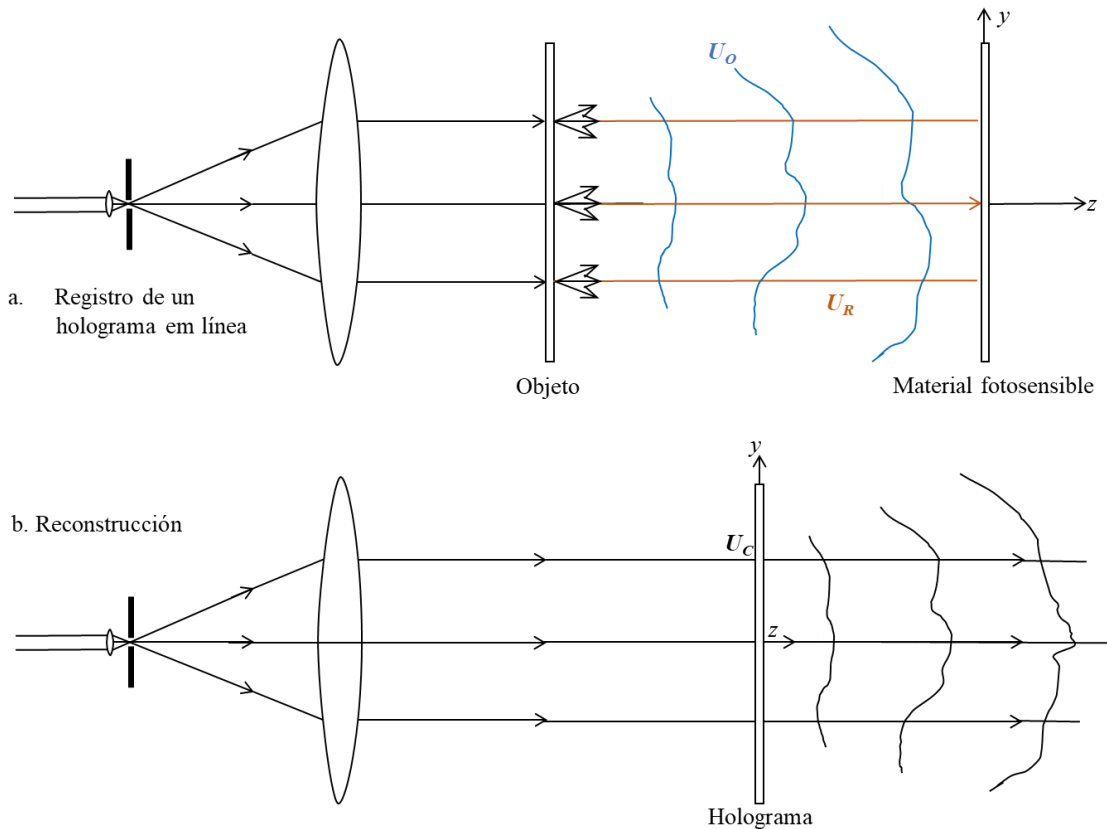


Figura 1. Registro de un Holograma en línea. Imagen adaptada de C.M. Vest [11].

En el caso de un holograma analógico, este pasará por un proceso de revelado, que implica el uso de químicos, donde, su transmitancia ( $t$ ) será proporcional a su intensidad y que depende, a su vez de una constante de proporcionalidad  $\beta$  característica del medio de registro [11].

En el proceso de reconstrucción, el holograma es iluminado por un haz de referencia:  $U_c$ , (ver Fig. 1(b)) dando como resultado:

$$t_b \propto (|U_R|^2 + |U_O|^2) \text{ con } t = t_b + \beta(U_R^*U_O + U_RU_O^*) \quad (2)$$

$$U_I = U_c t = U_c t_b + \beta U_c U_R^* U_O + \beta U_c U_R U_O^*$$

Donde  $U_I$  representa la amplitud compleja del campo eléctrico del holograma reconstruido,  $U_c t_b$  el orden cero de difracción y los patrones de intensidad de los haces referencia y objeto [12]. El segundo término corresponde a la imagen virtual y el tercero a la imagen real del holograma. En el caso de holografía en línea estos términos se encuentran juntos (ver Fig. 1(b)), por lo cual la holografía fuera de eje resulta mucho más ventajosa para separarlos.

### 1.1.2. Holografía fuera de eje.

En la holografía fuera de eje, como se muestra en la Fig. 2, el haz de referencia en el proceso de registro se propaga en una dirección distinta a la del haz objeto ( $\theta_R$ ); con esto se busca separar el orden cero de las imágenes del holograma que se obtienen en el proceso de reconstrucción. En comunicaciones, este método es conocido como la codificación y decodificación de señales por modulación de una portadora (o carrier, en inglés) de alta frecuencia. En holografía se aplica el mismo concepto, pero en vez de usar frecuencias temporales, se emplean frecuencias espaciales.

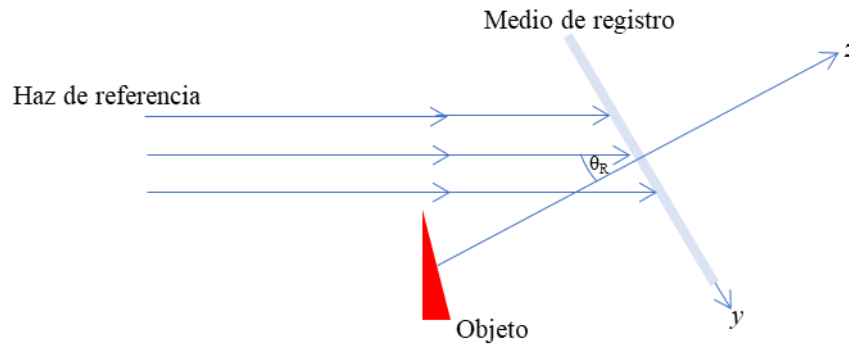


Figura 2. Registro de un Holograma. Imagen adaptada de P.K. Rastogi [13].

En el plano del medio de registro, donde se graba el holograma, los haces objeto y referencia están representados por las amplitudes complejas [11]:

$$\begin{aligned} U_o(x, y) &= a_o(x, y) \exp(-i\phi_o(x, y)) \\ U_R(x, y) &= a_R \exp(i2\pi f_y y) \\ f_y &= \sin \theta_R / \lambda \end{aligned} \quad (3)$$

Donde  $U_R(x, y)$  es un frente de onda plano incidente de forma oblicua,  $f_y$  es su frecuencia espacial. La irradiancia sobre el plano del medio de registro es:

$$I(x, y) = |U_o(x, y)|^2 + a_R^2 + a_R U_o(x, y) \exp(-i2\pi f_y y) + a_R U_o^*(x, y) \exp(i2\pi f_y y) \quad (4)$$

De forma similar al procedimiento seguido en la Ec. 2 para hologramas en línea, la transmitancia del holograma, al ser revelado, está dada por [11]:

$$\begin{aligned} t(x, y) &= t_b + \beta \left[ |U_o(x, y)|^2 + a_R U_o(x, y) \exp(-i2\pi f_y y) + a_R U_o^*(x, y) \exp(i2\pi f_y y) \right] \\ t(x, y) &= t_b + \beta a_o^2(x, y) + 2\beta a_R a_o \cos(2\pi f_y y + \phi_o(x, y)) \end{aligned} \quad (5)$$

La importancia de la Ec. 5 se destaca en el hecho de que se identifica que el holograma registrado consiste en un patrón de franjas de frecuencia espacial  $f_y$  moduladas en amplitud por  $a_o(x, y)$  y en fase por  $\phi(x, y)$ .

El caso de la Ec. 5 corresponde a materiales de registro que cambian su transmitancia de forma proporcional a la intensidad local de la luz, como es el caso de una película revelada con cristales de halogenuro de plata.

Si se emplea un haz de referencia  $U_c$ , idéntico al haz de registro, se obtiene la Ec. 7, donde  $U_I(x, y)$  representa la amplitud compleja para el holograma reconstruido.

$$U_c(x, y) = U_R(x, y) \quad (6)$$

$$U_I(x, y) = \left( t_b + \beta |U_o(x, y)|^2 \right) a_R \exp(i2\pi f_y y) + \beta a_R^2 U_o(x, y) + \beta a_R^2 U_o^*(x, y) \exp(i4\pi f_y y) \quad (7)$$

En la anterior ecuación, el primer término es una porción del frente de onda de reconstrucción que es transmitido por el holograma con una atenuación y algo de modulación de irradiancia (halo), el segundo y tercer término representan las imágenes virtual y real del frente de onda del objeto reconstruido [11]. La correcta separación de la imagen virtual, real y el haz transmitido se logra siempre y cuando el ángulo  $\theta_R$  sea lo suficientemente grande [13]; de

este tema se hablará con mayor profundidad más adelante, en la resolución de un sistema DHM.

En la Fig. 3, se puede apreciar que los puntos correspondientes de las imágenes virtual y real están ubicados a distancias iguales pero opuestas del plano del holograma. La imagen real debido a su disposición contraria al objeto original, se conoce como imagen pseudoscópica, mientras que la otra es ortoscópica [13].

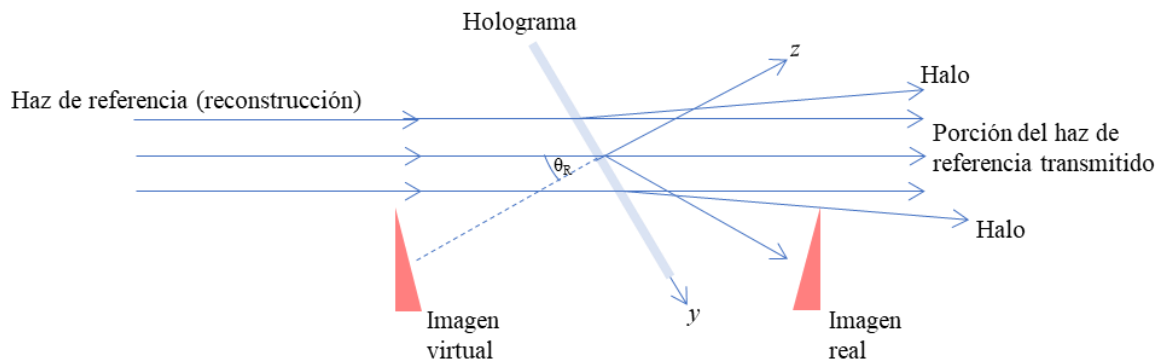


Figura 3. Reconstrucción de Holograma. Imagen adaptada de P.K. Rastogi [13]

## 1.2. Holografía Digital.

Desde hace varios años el registro de hologramas análogos para propósitos metrológicos ha ido decreciendo conforme se dio la introducción de los sensores tipo CCD y CMOS. En la actualidad, el auge de estos sensores es tan grande que, la holografía análoga ha pasado a un segundo plano y la holografía digital se ha mostrado como una técnica con un gran potencial y con la ventaja de que el holograma registrado no debe pasar por un proceso de revelado. En la holografía digital, se registra el patrón de interferencia sobre un sensor tipo CCD o CMOS y, ya que la información del patrón de interferencia queda almacenada, esta puede ser procesada mediante una gran diversidad de algoritmos de reconstrucción.

### 1.2.1. Métodos de reconstrucción en holografía digital.

En la etapa de reconstrucción de un holograma digital, se cuenta con gran variedad de algoritmos, entre los que se pueden encontrar los siguientes:

### 1.2.1.1. Reconstrucción Numérica por transformada de Fresnel.

Uno de los métodos más empleados en la reconstrucción de hologramas es el de transformada de Fresnel. Este modelo será descrito usando la Fig. 4, donde se identifican: un objeto a registrar de amplitud  $b$ , ubicado en el plano  $(x,y)$ , propagado una distancia  $d$  hasta el plano del holograma de coordenadas  $(\zeta,\eta)$ , donde se forma el patrón de interferencia de intensidad  $h$  en el sensor CCD o CMOS.

La reconstrucción está representada por otra propagación: desde el plano del holograma hasta el plano  $(x'y')$  ubicado a una distancia de reconstrucción  $d'=d$  donde se forma la imagen  $b'$ . Esta imagen está dada por la transformada de Fresnel inversa (Eq. 8) donde numéricamente el holograma  $h$  es multiplicado por el complejo conjugado del haz de referencia  $r$  [14]:

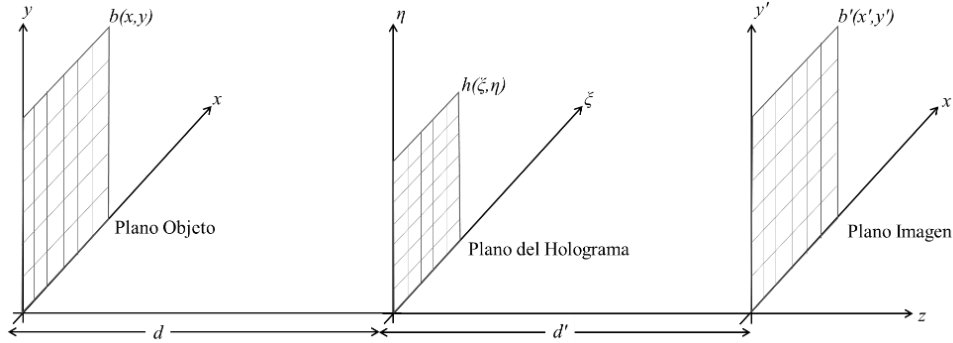


Figura 4. Propagación para el registro y reconstrucción de un holograma digital. Imagen adaptada de T. Kreis [14]

$$b'(\delta, \varepsilon) = e^{i\pi d\lambda(\delta^2 + \varepsilon^2)} \iint h(\zeta, \eta) r^*(\zeta, \eta) e^{\frac{i\pi}{d\lambda}(\zeta^2 + \eta^2)} e^{-2i\pi(\zeta\delta + \eta\varepsilon)} d\zeta d\eta \quad (8)$$

$$\delta = \frac{x'}{d\lambda} \quad \varepsilon = \frac{y'}{d\lambda}, \quad \text{siendo: } e^{\frac{i\pi}{d\lambda}(\zeta^2 + \eta^2)}, \text{ la función } \textit{chirp}.$$

Digitalmente, el proceso es entendido como la aplicación de la transformada de Fourier del producto de la distribución de intensidad del holograma  $h(\zeta,\eta)$ , por el complejo conjugado de la función que describe el haz de referencia  $r^*(\zeta,\eta)$ , y el término de curvatura que resulta de la aproximación de Fresnel (fase cuadrática exponencial, o como se conoce en inglés: función *chirp*). De forma discreta, se deberá tener en cuenta el tamaño de píxel del sensor empleado y el tamaño de este dado por su número de filas y columnas.

### 1.2.1.2. Reconstrucción numérica por convolución.

Este tipo de reconstrucción tiene en cuenta que la difracción también puede ser modelada por medio del teorema de convolución, por lo tanto, en el plano imagen del holograma se tiene:

$$b'(x', y') = [h(\xi, \eta) \cdot r^*(\xi, \eta)] * g(\xi, \eta) \quad (9)$$

Donde la Ec. 9 es la integral de convolución en notación corta, y  $g$  es la función de respuesta al impulso. En el espacio de Fourier se tiene [14]:

$$b' = \mathfrak{T}^{-1} \{ \mathfrak{T}(h \cdot r^*) \cdot \mathfrak{T}(g) \} \quad (10)$$

Siendo  $G = \mathfrak{T}(g)$  la función de transferencia en el espacio libre.

La diferencia entre el uso del método por transformada de Fresnel o por convolución se observa a las distancias de reconstrucción que emplee uno u otro, al parecer a cortas distancias la convolución funciona mejor que la transformada de Fresnel, pero a la mínima distancia de reconstrucción sus comportamientos son similares [12].

### 1.2.1.3. Espectro Angular.

Consideremos un campo  $E_0(x_0, y_0)$  compuesto por muchas ondas planas propagándose en varias direcciones de acuerdo con la Fig. 5 [12].

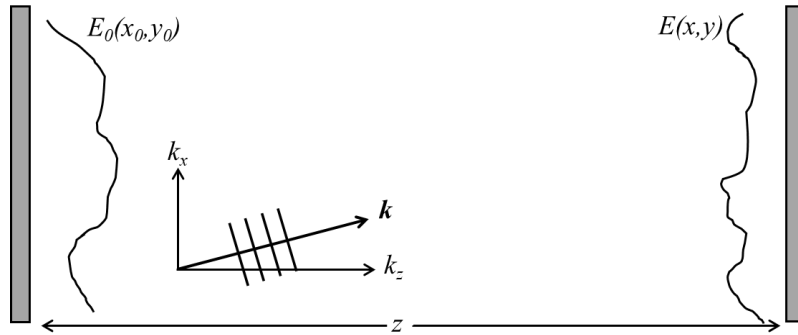


Figura 5. Propagación de un campo representado por medio de sus componentes de ondas planas en su espectro angular. Imagen adaptada de M.K. Kim [12].

La propagación de dicho campo, para una distancia  $z$  está dada por:

$$E(x, y; z) = \frac{1}{2\pi} \iint A_0(k_x, k_y) \exp[i(k_x x + k_y y + k_z z)] dk_x dk_y \quad (11)$$

Donde  $A_0$  es la amplitud compleja de cada una de las componentes de  $E_0$ , y  $\exp(ik_z z)$  es el factor de fase adquirido debido a la propagación.  $A_0$  también puede ser representada por:



$$A_0(k_x, k_y) = \frac{1}{2\pi} \iint E_0(x_0, y_0) \exp[-i(k_x x_0 + k_y y_0)] dx_0 dy_0 = \mathfrak{T}\{E_0\}$$

$$\therefore E_0(x_0, y_0) = \mathfrak{T}^{-1}\{A_0\}$$
(12)

Por lo tanto,  $E(x, y; z)$  es la transformada de Fourier inversa de  $A_0(k_x, k_y)\exp(ik_z z)$ :

$$E(x, y; z) = \mathfrak{T}^{-1}\{A_0(k_x, k_y) \exp(ik_z z)\} = \mathfrak{T}^{-1}\{\mathfrak{T}\{E_0\} \exp(ik_z z)\}$$

$$= \mathfrak{T}^{-1}\left\{\mathfrak{T}\{E_0\} \exp\left[i\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2} z\right]\right\}, \text{ entonces: } k^2 \geq k_x^2 + k_y^2$$
(13)

En este modelo de propagación se tiene en cuenta que:

La condición para  $k^2$  impone un filtraje de frecuencias pasa bajas, es decir, para campo lejano no se propagarán estructuras espaciales más finas que la longitud de onda.

Como se puede observar, de acuerdo con la Ec. 13, el modelo de espectro angular no depende de un factor  $1/z$  ó  $1/d$  como se definió en el modelo de propagación de Fresnel [12].

Para aplicaciones de la holografía, como es el caso de la microscopía holográfica, donde el tamaño efectivo del píxel puede ser más pequeño que la longitud de onda y el argumento de la raíz cuadrada de la Ec. 13 puede ser negativo en algunas partes del espectro, se aplica la función *circ* para el respectivo filtraje:

$$E(x, y; z) = \mathfrak{T}^{-1}\left\{\mathfrak{T}\{E_0(x_0, y_0)\} [k_x, k_y] \exp\left[iz\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}\right] \text{circ}\left(\frac{\sqrt{k_x^2 + k_y^2}}{k}\right)\right\} [x, y]$$
(14)

### 1.3. Microscopía Holográfica Digital.

La Microscopía Holográfica Digital hace uso de dos técnicas fundamentales de la Óptica: la Holografía Digital, que se fundamenta a su vez en los principios básicos de la interferencia y difracción, para el registro y reconstrucción de amplitud y fase del objeto. Y, por el otro lado, la Microscopía Óptica, que permite observar y analizar objetos y seres vivos como es el caso de bacterias, células, protozoos y algunos organelos tan pequeños que, a simple vista, no es posible.

A continuación, se describirá de forma muy general las implicaciones de un arreglo de Microscopía Holográfica Digital, así como las configuraciones más básicas para el registro de hologramas fuera de eje en transmisión, reflexión y en línea.

### 1.3.1. Sistema de Microscopía (General).

Un microscopio compuesto está formado principalmente, por dos elementos: un objetivo que forma una imagen real ampliada del objeto y un ocular que es una lente por medio de la que se observa dicha imagen. En un microscopio, por lo general, la distancia del objetivo a la imagen real es de 160mm, dicha distancia es conocida como la longitud del tubo del microscopio y para las Normas de la Industria Alemana, DIN por su sigla en alemán (Deutsche Industrie Normen) es de 160mm, mientras que, para las Normas Industriales Japonesas, JIS por su sigla en inglés (Japanese Industry Standard) es de 170mm. De esta forma, los objetivos de microscopio son diseñados de acuerdo a un mismo estándar, haciendo que, la amplificación del objetivo dependa de dos valores constantes: el índice de refracción en el cual se encuentra inmerso la muestra ( $n$ ) y la distancia del objetivo a la imagen real ( $X'$ ), y una única variable: la distancia focal efectiva del objetivo ( $f_o$ ), [15] dicha magnificación  $m_o$  está dada por:

$$m_o = -\frac{nX'}{f_o} \quad (15)$$

#### 1.3.1.1. Objetivos.

Existen distintos tipos de objetivos, los cuales varían dependiendo de la amplificación que ofrecen: Lister para bajas amplificaciones, Amici para las intermedias y de inmersión para las altas. Así mismo, se clasifican de acuerdo a su capacidad para corregir, hasta cierto punto, determinadas aberraciones [15].

#### 1.3.1.2. Distancia de trabajo y Apertura Numérica.

Uno de los parámetros más importantes en un objetivo de microscopio es la apertura numérica NA:

$$NA = n \sin \theta \quad (16)$$

Siendo  $n$  el índice de refracción del medio que rodea al objeto y  $\theta$  el semidiámetro angular del objetivo visto desde el objeto (ver Fig. 6). La apertura numérica, así como la amplificación del objetivo, aumentan conforme se reduce la distancia focal efectiva [16].

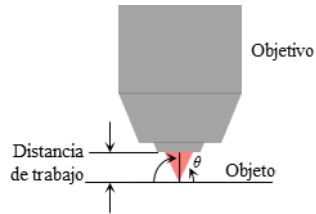


Figura 6. Detalle del semidiámetro angular del objetivo. Imagen adaptada de D. Malacara et al. [15]

En la Fig. 6 también se puede apreciar la distancia de trabajo, la cual es la distancia entre la superficie superior del cubreobjetos sobre el objeto hasta el vértice de la superficie óptica más baja del objetivo [15].

### 1.3.2. Resolución del Sistema.

#### 1.3.2.1. Muestreo.

Uno de los detalles que debe ser de cuidado en un sistema de Holografía Digital es el cumplimiento del teorema del muestreo, el cual, en el caso de un patrón de franjas de interferencia sobre un sensor CCD o CMOS se aplica bajo la condición de que el periodo  $p$  de dichas franjas debe ser muestreado por más de dos píxeles, eso es entonces [14]:

$$p > 2\Delta\xi \quad (17)$$

Donde  $p$  es el periodo de las franjas del patrón de interferencia y  $\Delta\xi$  el tamaño del píxel. En un sistema fuera de eje, este límite también determina el del ángulo entre el haz de referencia y haz objeto en el sistema con longitud de onda  $\lambda$ , de la forma [14]:

$$\theta_R < \frac{\lambda}{2\Delta\xi} \quad (18)$$

#### 1.3.2.2. Resolución lateral y axial del sistema.

El poder resolutor es la capacidad que tiene una lente sin aberraciones para determinar el menor detalle que se puede observar al formar una imagen [16].

La calidad de un sistema de microscopía está dada por su resolución, en 2D se habla de resolución lateral; y en 3D se analiza la calidad del sistema por medio de la resolución axial. Existen diversas definiciones y análisis para estos parámetros, todos dependiendo del tipo de luz empleada: coherente, parcialmente coherente o incoherente, análisis desde la óptica clásica o desde la difracción (en campo lejano o cercano), e incluso involucrando parámetros propios de los sistemas de holografía digital [17]. A continuación, se hablará de ambas

resoluciones para el caso de patrones de difracción con luz coherente, que, al final, también pueden ser aplicados a sistemas de holografía digital:

- Resolución Lateral.

En el caso de luz coherente o parcialmente coherente, como lo es para microscopios, se tiene en cuenta el criterio de Abbe, en el cual, apreciando la Fig. 7, el objeto al ser iluminado por una fuente de luz coherente actúa como una rejilla de difracción, donde la luz será difractada en varios haces con diferentes órdenes de difracción y el objetivo de microscopio ( $L$ ) de distancia focal  $f$  reúne sobre la imagen todos estos haces, interfiriendo entre sí.

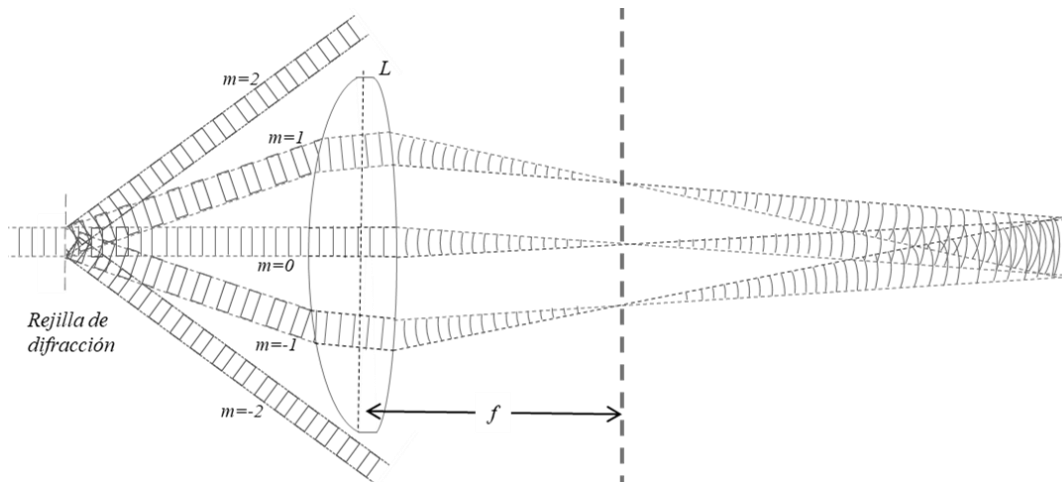


Figura 7. Criterio de Abbe. Imagen adaptada de: D. Malacara [16]

Para que se pueda ver el detalle del objeto, el objetivo de microscopio deberá ser lo suficientemente grande como para dejar pasar los órdenes de difracción superiores producidos por las frecuencias espaciales altas. Es por esto, que el poder resolutor es estudiado de acuerdo con el modelo de una rejilla de difracción, para un orden unitario  $m$  e incidencia normal  $\theta$ ; entonces, para luz coherente o parcialmente coherente el criterio de resolución de Abbe es:

$$d = \frac{\lambda}{n \sin \theta} = \frac{\lambda}{NA} = \delta x_0 \quad (19)$$

Donde  $d$  es el diámetro del objeto mínimo observable,  $\lambda$  la longitud de onda,  $\theta$  el radio angular de la lente,  $n$  el índice de refracción del medio en el que se encuentra el objeto y  $NA$  la apertura numérica de la lente, o en el caso del microscopio, del objetivo [16]. De aquí en adelante, llamaremos  $\delta x_0$  a la resolución lateral del sistema.

Este criterio para luz incoherente está dado por:

$$\frac{\lambda}{2NA} = \delta x_{Abbe} \quad (20)$$

En el caso del criterio de Rayleigh, este se basa en qué tan bien se resuelven dos puntos: dos puntos se resuelven cuando el máximo del patrón de difracción de uno coincide con el mínimo del otro. Para esto, se debe tener en cuenta que la distribución de un punto en un sistema  $4f$  sobre el plano de un detector está dado por la función de Bessel de primer orden, que corresponde a patrones de difracción de Airy:

$$I(x, y) = I_0 \left| \frac{2J_1 \frac{2\pi a q}{\lambda z}}{\frac{2\pi a q}{\lambda z}} \right|^2, \text{ con } q = \sqrt{x^2 + y^2} \quad (21)$$

Siendo  $J_1$  la función de Bessel de primer orden,  $I_0$  la intensidad en el centro del patrón de difracción,  $z=2f$  la distancia entre la lente de radio  $a$  y el detector, y  $x, y$  las coordenadas sobre el plano de la imagen. El primer mínimo de la función de Bessel de primer orden ocurre en 3.83, [17] de tal forma:

$$\frac{2\pi a \delta x_{Rayleigh}}{\lambda z} = 3.83$$

$$0.61 \frac{\lambda z}{a} = 0.61 \frac{\lambda}{NA} = \delta x_{Rayleigh} \quad (22)$$

A continuación, en las imágenes de la Fig. 8, se muestra el efecto del tipo de fuente y el criterio seleccionado para la distancia entre ambas fuentes puntuales: Abbe (Ec. 20) y Rayleigh (Ec. 22). Para estas simulaciones se introdujeron las variables:  $a=25mm$ ,  $z=0.2m$ ,  $\lambda=532nm$ . En ambas simulaciones es notorio que, si la distancia entre ambas fuentes es igual a la resolución de Abbe para una luz coherente o incoherente, los puntos no se resuelven; lo mismo sucede con el criterio de Rayleigh para luz coherente.

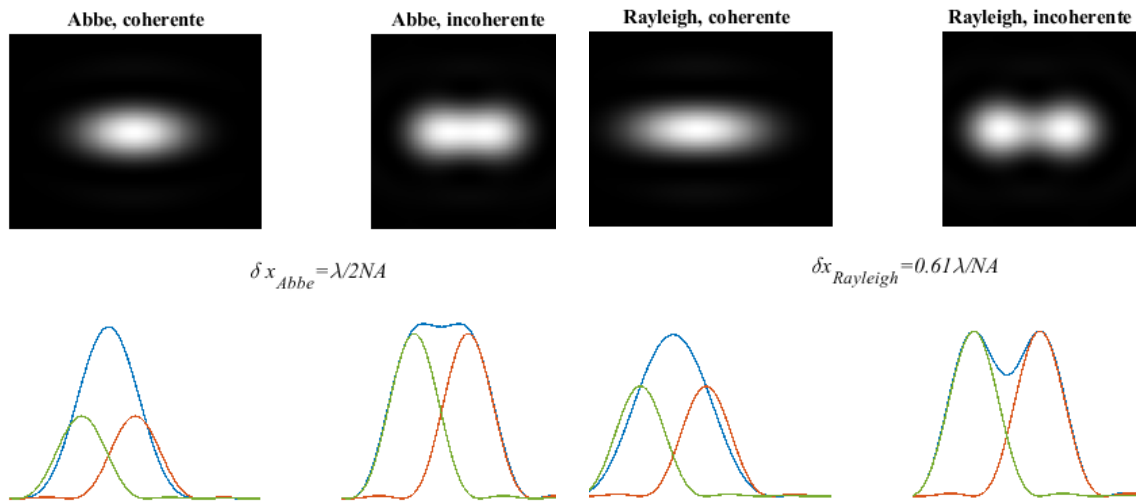


Figura 8. Detalle de los criterios de Abbe y Rayleigh para la resolución lateral

En el caso del modelo del criterio de Abbe a partir de un elemento difractivo, como se presentó al inicio de esta sección, si la distancia entre las dos fuentes puntuales es igual a este criterio (Ec. 19), al observar la Fig. 9, es notorio que se resuelven ambos puntos bien sea luz coherente o incoherente.

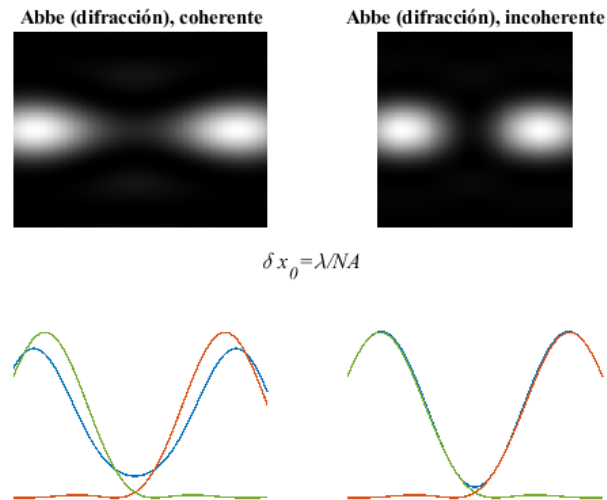


Figura 9. Criterio de Abbe considerando el modelo difractivo.

- Resolución Axial.

La resolución axial de un sistema de microscopía, con luz coherente está dada por [17]:

$$\delta z_0 = \frac{2\lambda}{NA^2} \quad (23)$$

Dicha definición se basa en el criterio de Rayleigh para la resolución axial, donde se considera la distribución axial de un frente de onda enfocado en un sistema óptico, cuya irradiancia en el plano de un detector está descrita por una función *sinc* de la forma:

$$I(0, 0, \Delta z) = I_0 \operatorname{sinc} \left| \frac{\beta a^2}{2} \right|^2, \quad \text{con } \beta = \frac{\pi \Delta z}{\lambda z^2} \quad (24)$$

Donde  $\Delta z$  es la distancia de defoco medida desde la posición de foco. Dicha ecuación, es a su vez resultado del cálculo de la propagación del frente de onda en un sistema  $4f$ , donde la fuente y la lente se encuentran a una distancia  $2f$  y la fuente y el detector a  $z=2f+\Delta z$  [17]

El criterio de resolución de Rayleigh dice que dos fuentes puntuales se resuelven cuando el máximo del orden cero del patrón de difracción de una coincide con el primer mínimo de la otra, lo cual, de acuerdo con la Ec. 24 se da cuando:

$$\frac{\beta a^2}{2} = \pi \quad (25)$$

Reemplazando  $\beta$  en la Ec. 24 se obtiene la distancia  $\Delta z$  que corresponde al criterio de resolución axial de la Ec. 23 [17].

Si se tienen en cuenta los parámetros del sistema, como lo son el tamaño de píxel en el holograma ( $\Delta \xi$ ), el número de píxeles ( $N$ ), la distancia de propagación ( $z$ ), y, además, el criterio de muestreo que se mencionó inicialmente se obtiene:

$$\begin{aligned} \delta x_0 = 2\Delta \xi_0 &\approx \frac{\lambda}{NA} \quad \text{con: } \Delta \xi_0 \approx \frac{\lambda z}{N\Delta \xi} \\ \delta z_0 &= \frac{8\lambda z^2}{N^2\Delta \xi^2} \approx \frac{2\lambda}{NA^2} \end{aligned} \quad (26)$$

Donde  $\Delta \xi_0$  es el tamaño del píxel en el plano objeto, y, además:  $NA \approx N\Delta \xi/2z$  [17].

### 1.3.3. Configuraciones básicas de Microscopía Holográfica Digital.

Una configuración de microscopía holográfica digital consiste de un interferómetro con una fuente de luz que por lo general es un láser, con la coherencia suficiente para generar interferencia y una cámara CCD o CMOS para el registro del interferograma [18].

En un sistema DHM, la configuración del interferómetro puede ser tipo Mach-Zehnder o Michelson. El primero es más recomendable para observar muestras en transmisión, mientras que el segundo lo es para reflexión, aunque bajo algunas modificaciones puede trabajar en transmisión, así como el otro en reflexión. Dichas configuraciones se pueden observar en detalle en la Fig. 10, donde el elemento que da la magnificación es el objetivo de microscopio sobre el brazo del haz objeto (MO1). Un segundo objetivo de microscopio (MO2), de las mismas características que MO1, es puesto sobre el haz referencia de forma tal que los frentes de onda de ambos haces tengan la misma curvatura [19]. Las imágenes real y conjugada descritas en la Ec. 2 son separadas gracias al ángulo (inicialmente definido como  $\theta_R$ ) introducido por medio del segundo divisor de haz (BS2 en la configuración tipo Mach-Zehnder). También se pueden configurar arreglos en línea como los de la Fig. 11, sin embargo, estos no son recomendables cuando se busca separar la imagen real de la conjugada y del DC. Un arreglo de holografía en línea es más empleado para el análisis de partículas pequeñas; en este, el haz referencia es la luz que pasa sin afectar la muestra analizada, y el haz objeto es la luz esparcida por las partículas [14].

La información de fase en un arreglo de DHM por transmisión (Ec. 27) o reflexión (Ec. 28 en objetos netamente reflectivos) está descrita por:

$$\Delta\phi = \frac{2\pi}{\lambda}(n_s - n_m)d \quad (27)$$

$$\Delta\phi = \frac{4\pi}{\lambda}d \quad (28)$$

Siendo  $\lambda$  la longitud de onda de la fuente de luz,  $n_s$  el índice de refracción de la muestra y  $n_m$  el del medio que la rodea,  $\Delta\phi$  el cambio de fase introducido por la muestra de espesor  $d$  debido a la diferencia de camino óptico (DCO) entre los frentes de onda de los haces objeto y referencia.



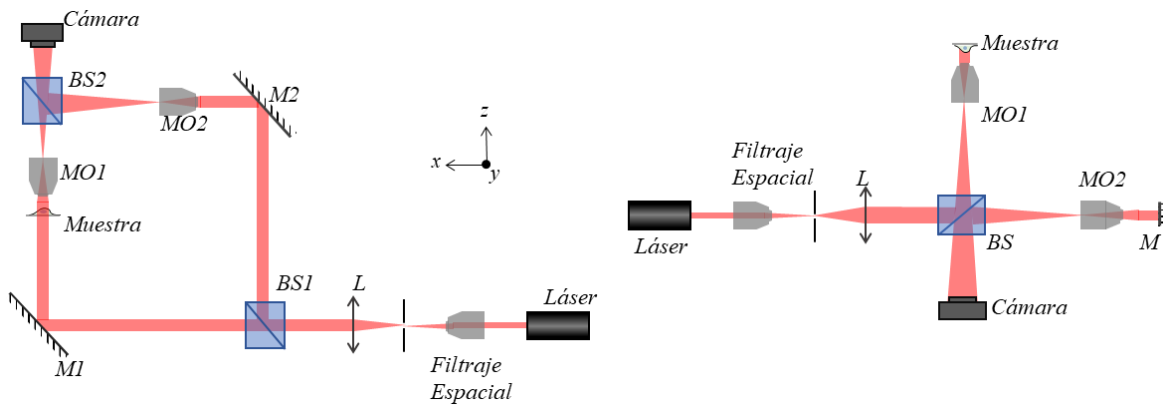


Figura 10. Configuraciones para microscopía holográfica fuera de eje, izquierda: objeto en transmisión, interferómetro Mach-Zehnder, derecha: objeto en reflexión, interferómetro Michelson. Imagen adaptada de M.K. Kim [12]

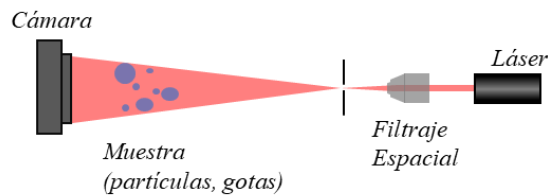


Figura 11. Configuración para microscopía holográfica en línea (holograma de Gabor). Imagen adaptada de M.K. Kim [18]

### 1.3.4. Importancia y diversas aplicaciones de la Microscopía Holográfica Digital.

La microscopía holográfica digital tiene la capacidad de entregar información no solo de amplitud sino también de fase a partir de la reconstrucción de un holograma, registrado como la intensidad de un patrón de interferencia capturado por un sensor. Esto es de gran utilidad, ya que se puede contar con información no sólo en 2D sino en 3D de la muestra a evaluar. Esta información depende del espesor e índice de refracción de la muestra en el caso de holografía digital por transmisión y, en caso de que el objeto sea netamente reflectivo, depende únicamente de su altura, [20] donde es más adecuado un arreglo de holografía digital por reflexión. A la medición y análisis de la información de fase a partir de la microscopía holográfica digital se le conoce como Microscopía Cuantitativa de Fase o QPM (por su sigla en inglés, Quantitative Phase Microscopy) [12].

El uso de la microscopía holográfica digital ha venido ampliándose gracias a la capacidad que esta técnica tiene para entregar información de espesor e índice de refracción de muestras, tal es el caso de Hejna et al. [21], quienes trabajan con 26 características, dentro de

las cuales una es el espesor para marcar y/o diferenciar, estados celulares, apoptosis, respuesta a daño de ADN, entre otros.

En un sistema de DHM, al aplicarse una fuerza sobre las muestras se genera una deformación mecánica, que, así como el espesor puede medirse. Estas deformaciones son posibles, entre otras, por medio de la aplicación de la técnica de pinzas ópticas en la cual, se aprovecha la presión de radiación. Realizar este tipo de mediciones es también de gran importancia, ya que las células cancerígenas presentan cambios de elasticidad representados en un bajo módulo de Young [22].

También se han llevado a cabo mediciones de cambios de espesor en el tiempo debido a otros factores tales como la aplicación de una toxina marina sobre células vivas de tumor de páncreas. Esto también puede ser un gran aporte para el estudio de las reacciones celulares ante la administración de medicamentos [23].

A partir del conocimiento del índice de refracción se pueden determinar distintas características celulares tales como la concentración proteica, elasticidad, conductividad, densidad de masa seca, etc. Con los avances de la microscopía holográfica digital y algunas de sus variantes se ha logrado reportar no sólo el índice de refracción de una sola célula a nivel 2D, sino también en 3D, lo cual ha sido posible con la Tomografía de Difracción Óptica u ODT (Optical Diffraction Tomography). Este avance ha sido tan importante que, al momento, se conocen reportes de índices de refracción de organelos celulares. La importancia de la medición de esta variable a nivel biológico, histológico y patológico es ampliamente reconocido [1]. Por ejemplo, por medio de Microscopía Tomográfica de Fase se ha mostrado que el índice de refracción en glóbulos rojos sanos tiene una distribución homogénea, mientras que a lo largo de las distintas etapas del desarrollo de la malaria no lo es. Adicionalmente, conforme van avanzando las etapas de esta enfermedad, el índice de refracción en promedio va decreciendo, lo cual está correlacionado con el decremento en la concentración de hemoglobina característico de esta enfermedad [24].

En cuanto a estudios patológicos, se ha encontrado que la mayoría de las células normales tienen un índice de refracción de 1.353, mientras que las células cancerígenas están en el rango de 1.370 a 1.400 [25], [26]. Específicamente, el índice de refracción del núcleo de células de biopsia de mama también es mayor en células cancerígenas que en células normales. Estos datos fueron obtenidos por medio de QPM de baja coherencia en el dominio espacial en muestras preparadas por protocolos clínicos estándares [1], [27].

Dependiendo de la aplicación, especialmente del tipo de muestra y/o la información a recopilar, actualmente existen muchas variantes de las configuraciones clásicas de DHM previamente mostradas. Por ejemplo, en las técnicas de tomografía o técnicas tipo Lens-Free, se emplean fuentes de baja coherencia. En el caso del desacoplamiento del índice de

refracción del espesor [28], [29] o para aplicar la técnica de desenvolvimiento óptico (optical unwrapping) [20], se usan más de una fuente de luz láser (dos a tres), lo cual también se aplica para obtener imágenes de DHM a color.

Muchas de las configuraciones actuales emplean equipos adicionales, por ejemplo, láseres pulsados para aplicar presión de radiación y así generar deformaciones sobre las muestras [30], láseres de bajas longitudes de onda visibles para las técnicas de superresolución [9], e incluso el uso de moduladores espaciales de luz para experimentar y mejorar la técnica con haces estructurados. Estas son tan solo algunas de las variantes que al momento se conocen de la Microscopía Holográfica Digital.

La técnica de Microscopía Holográfica Digital ha sido empleada en todo tipo de muestras: células vivas [23], células en proceso de apoptosis inducida [31], muestras preparadas bajo diversos procesos [27], [32] y de diversos orígenes: protozoo [33], vegetal [34], bacteriano, mamífero como los glóbulos rojos [24], espermatozoides [35], células de tumores, entre otros. Sus usos no sólo se limitan a la obtención de índice de refracción y espesor para su morfología 3D sino también para el estudio de movimiento celular en 2D y 3D [36], diferenciación entre tipos de células y de tratamientos, área, volumen y conteo celular, entre otros [37]. Al momento, existen un sinnúmero de variaciones y aplicaciones de la Microscopía Holográfica Digital, incluso algunas compañías ya comercializan productos basados en esta técnica [10].

El potencial de la microscopía holográfica digital para su aplicación en patología, biología y campos relacionados es muy grande, en palabras de El-Schich et al. [37]: *“la microscopía holográfica digital ha sido empleada para diagnóstico celular en la clínica, proveyendo soporte para emplear el concepto de Holografía Digital.”*

En los próximos capítulos se profundizará un poco más sobre algunas de las variantes de la Microscopía Holográfica Digital, las cuales, para el presente trabajo de tesis doctoral, fueron montadas y puestas a punto para la medición de índice de refracción y espesor en muestras de células de cáncer de piel, tema que será abordado a continuación.

## Referencias.

1. P. Y. Liu, L. K. Chin, W. Ser, H. F. Chen, C. M. Hsieh, C. H. Lee, K. B. Sung, T. C. Ayi, P. H. Yap, B. Liedberg, K. Wang, T. Bourouina, and Y. Leprince-Wang, "Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: Past, present and future," *Lab Chip* **16**, 634–644 (2016).
2. G. P. J. Guy, S. R. Machlin, D. U. Ekwueme, and K. R. Yabroff, "Prevalence and Costs of Skin Cancer Treatment in the U.S., 2002–2006 and 2007–2011 Gery," *Am J Prev Med.* 2015 **48**, 183–187 (2015).
3. J. E. Niederhuber, J. O. Armitage, J. H. Doroshow, M. B. Kastan, and J. E. Tepper, *Abeloff's Clinical Oncology*, Sixth (Elsevier Inc., 2020).
4. The American Cancer Society medical and editorial content team, "Key Statistics for Basal and Squamous Cell Skin Cancers," <https://www.cancer.org/cancer/basal-and-squamous-cell-skin-cancer/about/key-statistics.html>.
5. The American Cancer Society medical and editorial content team, "Key Statistics for Breast Cancer," <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/how-common-is-breast-cancer.html>.
6. The American Cancer Society medical and editorial content team, "Key Statistics for Prostate Cancer," <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/key-statistics.html>.
7. D. Gabor, "A new microscopic principle," *Nature* **161**, 777–778 (1948).
8. V. Micó, Z. Zalevsky, C. Ferreira, and J. García, "Superresolution digital holographic microscopy for three-dimensional samples," *Opt. Express* **16**, 19260 (2008).
9. Y. Cotte, F. Toy, P. Jourdain, N. Pavillon, D. Boss, P. Magistretti, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Marker-free phase nanoscopy," *Nat. Photonics* **7**, 113–117 (2013).
10. Y. Zhang and R. L. Judson, "Evaluation of holographic imaging cytometer holomonitor M4® motility applications," *Cytom. Part A* **93**, 1125–1131 (2018).
11. C. M. Vest, *Holographic Interferometry* (Wiley, 1979).
12. M. K. Kim, *Digital Holographic Microscopy : Principles, Techniques, and Applications* (Springer, 2011).
13. P. K. Rastogi, *Holographic Interferometry : Principles and Methods* (Springer Berlin Heidelberg, 1994).
14. T. Kreis, *Handbook of Holographic Interferometry : Optical and Digital Methods*

(Wiley-VCH, 2005).

15. D. Malacara-Hernández, Z. Malacara-Hernández, and Z. Malacara, *Handbook of Optical Design* (CRC Press, 2003).
16. D. Malacara, *Óptica Básica* (Fondo de cultura económica, 2015).
17. T. Latychevskaia, "Lateral and axial resolution criteria in incoherent and coherent optics and holography, near- and far-field regimes," *Appl. Opt.* **58**, 3597 (2019).
18. M. K. Kim, "Principles and techniques of digital holographic microscopy," *SPIE Rev.* **1**, (2010).
19. X. Yu, J. Hong, C. Liu, and M. K. Kim, "Review of digital holographic microscopy for three-dimensional profiling and tracking," *Opt. Eng.* **53**, 112306 (2014).
20. A. Khmaladze, M. Kim, and C.-M. Lo, "Phase imaging of cells by simultaneous dual-wavelength reflection digital holography," *Opt. Express* **16**, 16900 (2008).
21. M. Hejna, A. Jorapur, J. S. Song, and R. L. Judson, "High accuracy label-free classification of single-cell kinetic states from holographic cytometry of human melanoma cells," *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
22. F. Quan and K. Kim, "Medical applications of the intrinsic mechanical properties of single cells," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **48**, 865–871 (2016).
23. B. Kemper, D. Carl, J. Schnekenburger, I. Bredebusch, M. Schäfer, W. Domschke, and G. von Bally, "Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy," *J. Biomed. Opt.* **11**, 034005 (2006).
24. Y. K. Park, M. Diez-Silva, G. Popescu, G. Lykotrafitis, W. Choi, M. S. Feld, and S. Suresh, "Refractive index maps and membrane dynamics of human red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13730–13735 (2008).
25. W. J. Choi, D. I. Jeon, S.-G. Ahn, J.-H. Yoon, S. Kim, and B. H. Lee, "Full-field optical coherence microscopy for identifying live cancer cells by quantitative measurement of refractive index distribution," *Opt. Express* **18**, 23285 (2010).
26. X. J. Liang, A. Q. Liu, C. S. Lim, T. C. Ayi, and P. H. Yap, "Determining refractive index of single living cell using an integrated microchip," *Sensors Actuators, A Phys.* **133**, 349–354 (2007).
27. P. Wang, R. Bista, R. Bhargava, R. E. Brand, and Y. Liu, "Spatial-domain low-coherence quantitative phase microscopy for cancer diagnosis," *Opt. Lett.* **35**, 2840 (2010).
28. N. A. Turko and N. T. Shaked, "Erythrocyte volumetric measurements in imaging flow cytometry using simultaneous three-wavelength digital holographic microscopy," *Biomed. Opt. Express* **11**, 6649 (2020).

29. B. Rappaz, F. Charrière, T. Colomb, C. Depeursinge, P. J. Magistretti, and P. Marquet, "Simultaneous cell morphometry and refractive index measurement with dual-wavelength digital holographic microscopy," *Opt. Lett.* **33**, 744–746 (2008).
30. D. C. Clark and M. K. Kim, "Determination of absorption coefficient by digital holographic measurement of optical excitation," *Appl. Opt.* **50**, 1668 (2011).
31. M. Kemmler, "Noninvasive time-dependent cytometry monitoring by digital holography," *J. Biomed. Opt.* **12**, 064002 (2007).
32. A. V. Belashov, A. A. Zhikhoreva, V. G. Bespalov, V. I. Novik, N. T. Zhilinskaya, I. V. Semenova, and O. S. Vasyutinskii, "Refractive index distributions in dehydrated cells of human oral cavity epithelium," *J. Opt. Soc. Am. B* **34**, 2538 (2017).
33. W. M. Ash, L. Krzewina, and M. K. Kim, "Quantitative imaging of cellular adhesion by total internal reflection holographic microscopy," *Appl. Opt.* **48**, (2009).
34. C. Trujillo and J. Garcia-Sucerquia, "Phase-shifting digital holographic microscopy by using a multi-camera setup," **42**, 1–4 (2017).
35. V. Dubey, D. Popova, A. Ahmad, G. Acharya, P. Basnet, D. S. Mehta, and B. S. Ahluwalia, "Partially spatially coherent digital holographic microscopy and machine learning for quantitative analysis of human spermatozoa under oxidative stress condition," *Sci. Rep.* **9**, 3564 (2019).
36. K. Alm, H. Cirenajwis, L. Gisselsson, A. Gjørloff Wingren, B. Janicke, A. Mölder, S. Oredsson, and J. Persson, "Digital Holography and Cell studies," in *Holography Research and Technologies* (InTech, 2011), Vol. I.
37. Z. El-Schich, S. Kamlund, B. Janicke, K. Alm, and A. G. Wingren, "Holography: The Usefulness of Digital Holographic Microscopy for Clinical Diagnostics," in *Holographic Materials and Optical Systems* (InTech, 2017).

## Capítulo 2.

### La piel: histología básica y cáncer de piel.

El objeto de estudio en este trabajo es la piel, específicamente la patología del cáncer de piel con sus tres clasificaciones: melanoma, cáncer de células basales y el cáncer de células escamosas. Con dos arreglos experimentales, se analizarán, medirán e identificarán células de la línea celular A375 que corresponde a melanoma, así como algunas de las lesiones características que se presentan en el queratoacantoma. Esta patología, para algunos autores es una lesión benigna que se puede transformar en un cáncer de células escamosas (SCC por su sigla en inglés: Squamous Cell Carcinoma), mientras que para otros es un SCC de bajo grado [1]. Para realizar este estudio, se hace necesario conocer brevemente, este órgano, sus funciones, capas y células en cada una de ellas, así como un aspecto general de las lesiones que pueden llegar a presentarse cuando se genera el cáncer de piel.

La piel es el órgano más largo del cuerpo humano que, en conjunto con el cabello, folículos capilares, glándulas sebáceas y sudoríparas, uñas y glándulas mamarias constituyen el sistema integumentario. La piel puede ser catalogada como gruesa o delgada, lo cual depende del grosor de la epidermis, más no del grosor de la piel como tal; las zonas del cuerpo humano donde se puede encontrar piel gruesa son la palma de las manos y la planta de los pies [2].

La piel actúa como barrera protectora contra agentes biológicos, físicos y químicos existentes en el ambiente exterior, como es el caso de la protección contra los rayos ultravioleta. Asimismo, provee información inmunológica, ayuda a regular la temperatura corporal y la pérdida de agua, convierte hacia el sistema nervioso la información sensorial percibida sobre el ambiente exterior, realiza funciones endocrinas, entre otras [2].

Inicialmente, se describirán las capas de la piel, de las cuales, la más exterior es la epidermis, conformada principalmente por queratinocitos; luego, se encuentra la dermis, que alberga varios tipos de colágeno, brinda soporte mecánico y resistencia. Al final, se encuentra la hipodermis, que es la capa más profunda, y está constituida por tejido adiposo.

Una vez conocidas las capas de la piel, se abordarán las patologías relacionadas con los cánceres de piel más comunes: el de células escamosas y el de células basales, así como uno de los más peligrosos, el cáncer de melanoma. Así mismo, se hablará un poco de una de las causas más comunes en estas afecciones: la alta exposición a radiación solar UV. En conjunto con esto, se describirán brevemente el aspecto histológico de algunas lesiones de dichas patologías.

Al final, se explicará la forma en la que actualmente se realiza el diagnóstico del cáncer de células escamosas, células basales y melanoma. Igualmente, se describirán las técnicas que se emplean como la dermatoscopia y el análisis de muestras obtenidas a partir de biopsias.

Además de las técnicas clásicas, también se hablará respecto de la microscopía confocal, que se presenta como una de las opciones más recientes para diagnóstico; así como de la microscopía holográfica digital y su uso en diversas aplicaciones a nivel histológico.

## 2.1. Capas de la piel.

La piel está compuesta por dos capas principalmente: la epidermis que es la más externa, conformada por un estrato queratinizado y, justo debajo de esta, la dermis formada por tejido conectivo que brinda soporte mecánico y resistencia a la piel. Una tercera capa hace parte de la piel: la hipodermis, que, en su mayoría está compuesta por tejido adiposo [2].

La piel también puede ser clasificada como piel gruesa o delgada, esto refiere al grosor de la epidermis, que en el caso de la piel gruesa puede estar entre los 400 a 600  $\mu\text{m}$  de espesor, mientras que en la piel delgada esta entre los 75 a 150  $\mu\text{m}$  [2]. Las partes del cuerpo donde se encuentra piel gruesa son la planta del pie y la palma de la mano.

El detalle de las capas presentes en la piel gruesa se puede apreciar en la Fig. 1, tomada del texto Junqueira's Basic Histology [3], donde además de mostrar estas divisiones, también se enseñan las células presentes en cada una de ellas; de estas se hablará más adelante.



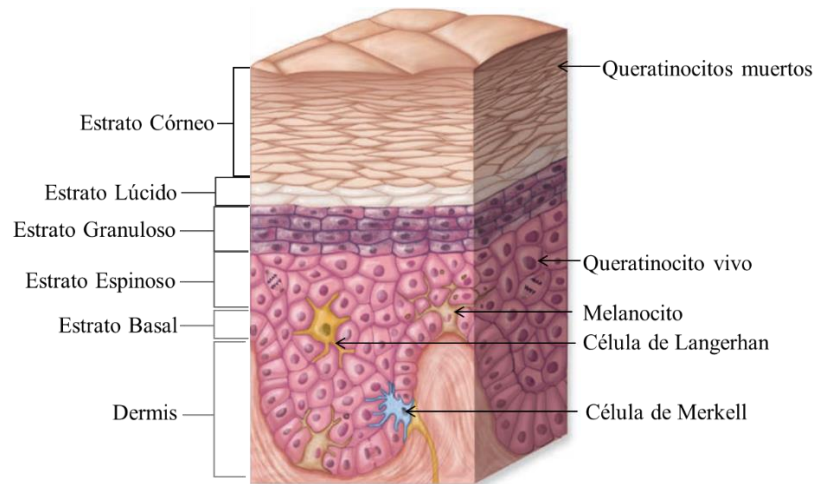


Figura 1. Detalle de las capas de la piel y sus células. Imagen tomada de: Junqueira's Basic Histology [3].

### 2.1.1. Epidermis.

La epidermis está compuesta por cuatro y hasta cinco capas en la piel gruesa, estas son:

- **Estrato Basal:** es una capa sencilla, y la más profunda de la epidermis, compuesta por células madre que se convertirán en queratinocitos y después surgen hacia la capa superior. Sus células, tienen un citoplasma pequeño, razón por la cual el espacio entre sus núcleos es reducido; así mismo, contienen melanina transferida de los melanocitos vecinos y extensas uniones intercelulares [2]. Además de los queratinocitos, también se encuentran dispersas en esta capa las células de Merkel y los melanocitos [4].
- **Estrato Espinoso:** esta es, normalmente, la capa más gruesa. Se encuentra justo encima de la capa basal, y en ella se presentan unas estructuras con forma de espinas, las cuales son resultado del encogimiento que sufren las células durante los procesos histológicos [3]; dichas espinas son la razón de su nombre. A medida que sus células maduran y se mueven hacia la superficie, se van tornando más grandes, aplanadas y se organizan de forma paralela al plano de la superficie. Esto es más notorio en las células más superficiales, donde el núcleo se hace más elongado en vez de ovoide [2]. Esta capa alberga también las células de Langerhan [4].
- **Estrato Granuloso:** justo encima de la capa espinosa se encuentra el estrato granuloso, los queratinocitos, de forma plana, contienen gránulos de queratohialina, ramilletes gruesos de queratina y gránulos revestidos de membrana. Esta es la capa más externa de la epidermis donde las células aún se encuentran vivas. Las células más superficiales en esta capa forman uniones muy estrechas entre ellas y con las células

del estrato córneo en piel delgada así como con las del estrato lúcido en la piel gruesa [4].

- Estrato Lúcido: algunos histólogos la consideran una subdivisión del estrato córneo [2], se hace visible sólo en la palma de las manos y los pies, sus células no tienen núcleo ni organelas, esta capa se hace difícil de reconocer en cortes histológicos [4].
- Estrato Córneo: compuesto por células escamosas sin núcleo, aplanadas, llenas de filamentos de queratina, con aspecto seco. Esta capa es la que más puede llegar a variar en espesor, especialmente en sitios sujetos a cantidades inusuales de fricción. Debido a esta, la epidermis se puede catalogar como gruesa o delgada [2]. Sus células, llamadas células escamosas, toman forma de un polígono de 14 lados; la queratina, y la queratohialina, en conjunto con otras tres proteínas forman un recubrimiento celular grueso, cornificado. En sus células más externas se produce la descamación, proceso que se da a la par con la generación de nuevas células en las capas más internas, manteniéndose así el espesor de la epidermis y su estabilidad estructural [4].

Estas capas observadas al microscopio se pueden apreciar en la Fig. 2 (Imagen tomada de: Histology at Yale [4]) y en la Fig. 3 (Imagen tomada del texto Junqueira's Basic Histology [3]) donde además se muestra con mayor detalle las espinas entre queratinocitos del estrato espinoso.

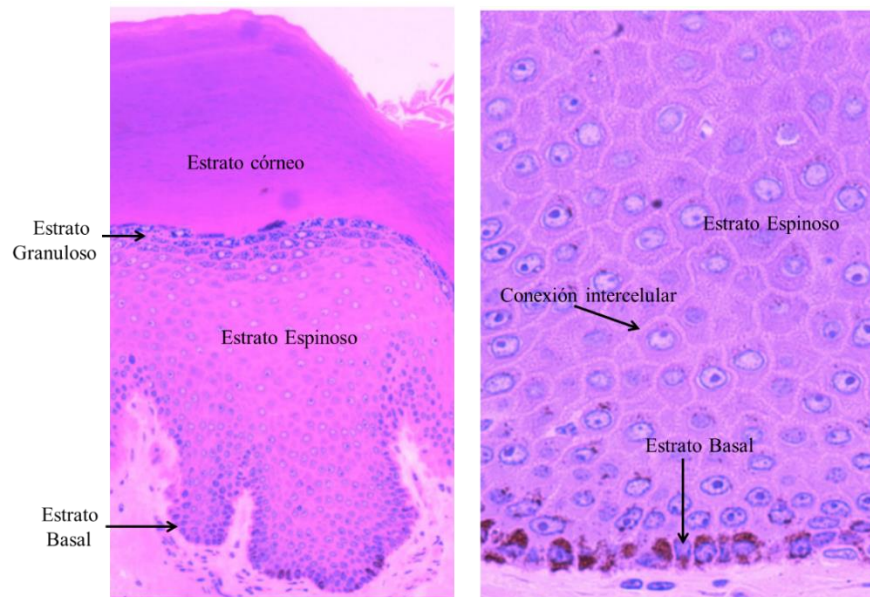


Figura 2. Detalle de las capas de la epidermis. Imagen tomada de: Histology at Yale [5]

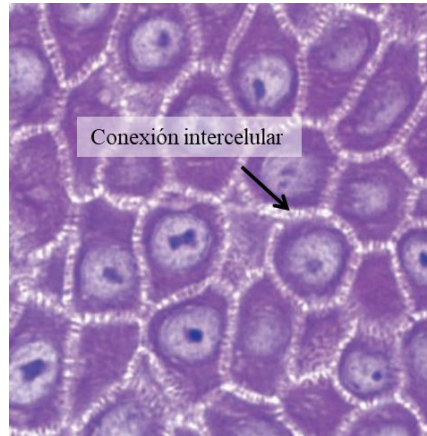


Figura 3. Estrato espinoso en piel gruesa, detalle de las conexiones intercelulares o “espinas”, imagen tomada de Junqueira’s Basic Histology [3].

#### 2.1.1.1. Células presentes en la epidermis.

- Queratinocitos.

Esta es la célula más predominante en la epidermis, se originan en la capa basal; una vez que dejan esta capa, asumen dos funciones fundamentales: producción de queratina y la formación de la barrera de agua epidérmica [2].

- Melanocitos.

Los melanocitos se encuentran presentes en el estrato basal; sus extensiones conocidas como dendritas, ocupan espacios extracelulares entre las células del estrato espinoso. El pigmento de la melanina es sintetizado por los melanocitos en unas organelas conocidas como melanosomas [4]. La función más importante de la melanina es proteger al organismo de la radiación ultravioleta no ionizante [2].

El color de la piel depende de diversos factores, entre ellos se encuentran la radiación ultravioleta, causas genéticas, sexo, entre otros, siendo el contenido de melanina el más importante.

Respecto del color de la piel, en Dermatología, la escala Fitzpatrick se usa para clasificar la pigmentación natural de la piel humana y los efectos sobre la misma después de ser expuesta a los rayos UV. En un principio se creó como una ayuda para conocer el potencial de bronceado de la piel, esto para seleccionar la cantidad de Joules/cm<sup>2</sup> de rayos UVA como tratamiento de la psoriasis. Esta escala contiene 6 tipos que, a su vez se relacionan con 36 variantes de color de una escala cromática, siendo el tipo I para pieles que siempre se queman, pero nunca se broncean, y el tipo VI para pieles que nunca se queman pero siempre se

broncean. Esta clasificación, sin embargo, se considera inadecuada, ya que, entre varios aspectos, por ejemplo, respecto de las clasificaciones IV a la VI, de acuerdo con algunos autores, no se incluyen adecuadamente el amplio rango de tonos de piel que en estas deberían estar. [6].

La exposición a radiación ultravioleta incrementa el número de melanocitos y acelera el ritmo de producción de melanina, protegiendo de los efectos de la radiación; esta respuesta a la radiación ultravioleta se encuentra genéticamente determinada y es más marcada en las personas de color de piel oscura. En las personas de piel clara, los melanosomas se encuentran más concentrados en los queratinocitos que están más cerca de la capa basal y un poco en la capa granulosa; mientras que en las personas de piel oscura, pueden estar a lo largo de la epidermis, incluyendo la capa córnea [2].

En la formación de melanina, los melanosomas maduros y sus contenidos de melanina son transferidos hacia los queratinocitos vecinos por donación de pigmentos [2]; los melanosomas, una vez dentro de los queratinocitos (por fagocitosis), migran hacia la región del núcleo y forman una barrera física entre el núcleo del queratinocito y los rayos UV del sol, protegiendo así a los cromosomas del queratinocito de posibles daños debido a radiación UV [4].

- Células de Langerhan.

Se localizan principalmente en el estrato espinoso. Este tipo de células están relacionadas con las reacciones de hipersensibilidad como, por ejemplo, la dermatitis alérgica de contacto y otras respuestas inmunes de la piel mediadas por células. Las células de Langerhan no pueden ser distinguidas con certidumbre en los procesos de rutina de secciones de corte de parafina y teñido con H&E (Hematoxilina y Eosina) [2].

Tanto las células de langerhan como los melanocitos no presentan uniones adhesivas con los queratinocitos vecinos (desmosomas).

- Células de Merckell.

Las células de Merckell se encuentran abundantemente en partes sensibles de la piel como las puntas de los dedos y en la base de algunos folículos capilares. Se encuentran unidas a los queratinocitos de la capa basal mediante desmosomas [3]. Estas células están unidas a terminaciones nerviosas libres, las cuales son sensibles al tacto, ejerciendo la función de mecanoreceptores. Son difíciles de diferenciar de los melanocitos [7], [3].

### 2.1.2. Dermis.

Esta capa, ubicada justo debajo de la epidermis, se encuentra conformada por tejido conectivo denso e irregular que contiene fibras de colágeno tipo I y redes de fibras elásticas gruesas.

Hacia la superficie de la dermis, en contacto con la epidermis, se encuentra la capa papilar, en la que se forman las crestas dérmicas, que, en conjunto con las crestas epidérmicas conforman la unión epidérmica/dérmica. Este estrato se encuentra compuesto por fibroblastos, fibras de colágeno tipo III, fibras elásticas finas y bucles capilares. En esta capa también se encuentran los corpúsculos de Meisner, que son receptores del tacto fino. Las fibras nerviosas amielínicas siguen su curso a través de esta capa, llegando así a los espacios extracelulares de la epidermis donde funcionan como receptores del dolor.

La capa más profunda de la dermis es la capa reticular, conformada por fibras de colágeno tipo I y fibras elásticas gruesas. En áreas más profundas se pueden encontrar los corpúsculos de Pacini, que son receptores de presión [4].

Las glándulas sebáceas, sudoríparas, los folículos capilares y las uñas se encuentran localizadas a distintos niveles de la dermis, y se conocen como los apéndices de la piel [4].

## 2.2. Cáncer de piel.

Existen diversos tipos de cáncer de piel, los más comunes son: el carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y el melanoma. La principal causa de estas patologías es la radiación UV, de la cual se distinguen los rayos UVC (<290nm), UVB (290-320nm) y los UVA (320-400nm).

Los rayos UVC no penetran la capa de ozono y no se considera que tengan efecto biológico. Por otro lado, los rayos UVB causan los tres tipos de cáncer de piel y pueden penetrar todas sus capas, sin embargo, el daño se limita a las capas más superficiales. Estos rayos no pueden penetrar el vidrio y su intensidad varía a lo largo del día, siendo más fuertes en determinadas estaciones del año. Los mayores causantes del cáncer de piel son los rayos UVA, los cuales pueden atravesar la piel hasta su capa más profunda. Son la radiación solar UV más constante sin importar la época del año y puede pasar intacta las nubes y el vidrio [4].

Los rayos UVA y UVB generan el fotoenvejecimiento, que se manifiesta con la aparición de arrugas profundas, pecas y la pérdida de elasticidad. La piel adquiere un aspecto laxo, y el riesgo para contraer cáncer de piel se aumenta [4], [2]. La mejor estrategia para prevenir la

penetración y el daño causado por la radiación solar UV son el uso de pantallas solares físicas y químicas [2].

### 2.2.1. Carcinoma de células basales.

Es el tipo de cáncer de piel más común, se genera en la capa basal de la epidermis, es de lento crecimiento y no es común que genere metástasis; además de generarse por la exposición al sol, también puede ocurrir en personas de piel clara. De forma externa se puede manifestar con pápulas (lesiones de menos de 5mm de diámetro con forma de domo o planas) que presentan vasos sanguíneos subepidérmicos, algunas lesiones pueden contener melanina y parecerse al melanoma. En la epidermis, de forma microscópica se pueden observar varios focos de crecimiento; y a veces llega a presentar lesiones nodulares que crecen hacia la dermis como se puede observar en la Fig. 4 (a), donde además se detalla que están recubiertos en tejido fibrótico. En la Fig. 4 (b) se detallan las células basales empalizadas hacia los bordes de un nido [8].

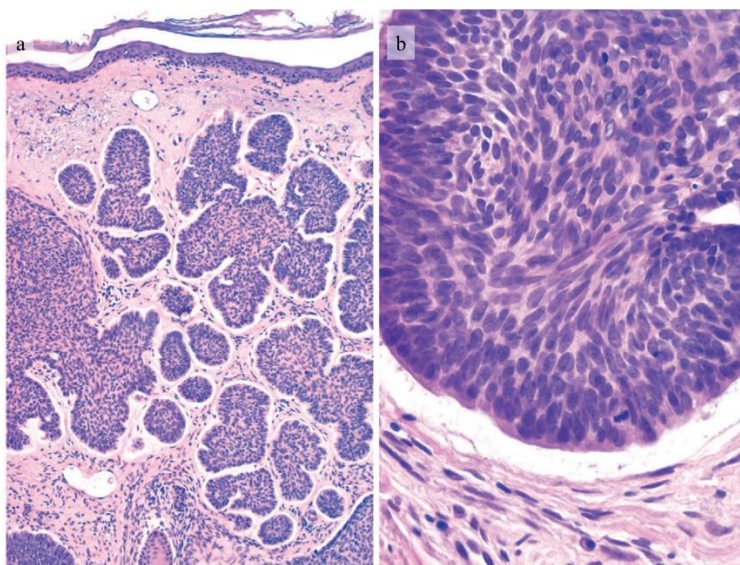


Figura 4. Carcinoma de células basales. Imagen tomada de: Robbins Basic Pathology [8]

### 2.2.2. Carcinoma de células escamosas.

Este cáncer de piel, después del carcinoma de células basales es el segundo más común [2]. Puede ser causado por la exposición al sol, ya que la luz UV genera efectos dañinos en el ADN. Además, se puede deber a viejas cicatrices de quemaduras, úlceras crónicas, entre

otros. Es más común en personas de edad avanzada, especialmente hombres. En este tipo de cáncer se pueden generar mutaciones inducidas como las de los rayos UVB, debilitando la inmunovigilancia de la cual son responsables las células de Langerhan [8].

El aspecto de esta patología presenta placas con descamación, claramente definidas y de color rojizo; siendo más avanzadas las que presentan lesiones nodulares, tamaño variable y ulceraciones. A nivel microscópico, la presencia de células cancerígenas puede llegar a ser altamente atípico en todas las capas de la epidermis y de forma desordenada [8]. Asimismo, estas células se pueden presentar en distintas geometrías como polígonos, organizados en lóbulos y zonas de queratinización, así como formas redondas con focos necróticos y unas ocasionales células queratinizadas [2].

En la Fig. 5, se puede observar una de las características que puede presentar esta patología: el tumor invade la dermis (zonas donde se observa tejido conectivo color rosa), notándose como proyecciones irregulares de células escamosas atípicas [8]. Hacia las zonas donde sólo se encuentran células escamosas, estas se encuentran desorganizadas.

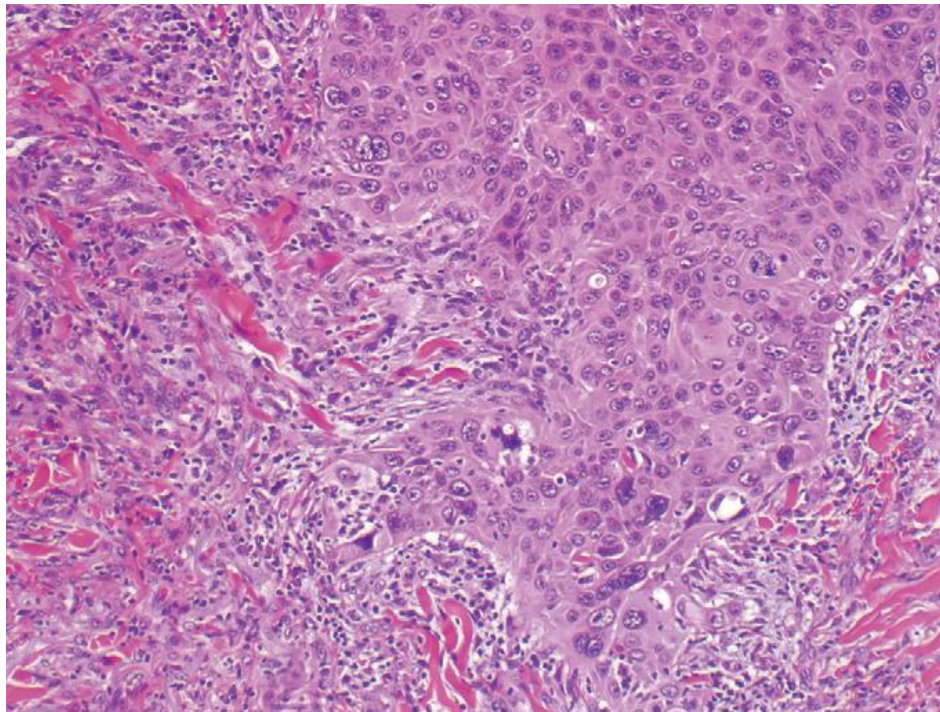


Figura 5. Carcinoma de células escamosas, imagen tomada de: Robbins Basic Pathology [8].

### 2.2.3. Melanoma.

El melanoma es el cáncer de piel menos común, pero si no es detectado a tiempo, puede ser el más letal. Su mayor incidencia se da en países con mayor exposición al sol y en personas con piel clara. Además de estos factores, la predisposición hereditaria también juega un papel importante. Como su nombre lo indica, se genera en los melanocitos, que se caracterizan por tener un núcleo grande y contornos irregulares [2].

De forma temprana puede iniciar con alteraciones de un lunar que puede o no presentar síntomas como dolor, comezón, o sensación de ardor. Sin embargo, cualquier lesión pigmentada que cambie de color, de bordes asimétricos, que ha crecido, especialmente a tamaños mayores de 6mm debe considerarse sospechosa [4]; de esto se hablará con mayor profundidad al describir el método del ABCDE.

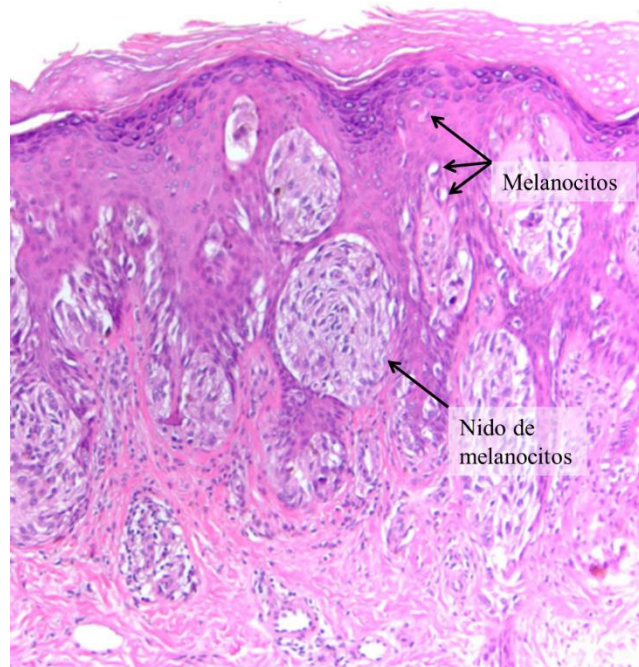


Figura 6. Melanoma, detalle microscópico: nidos de melanocitos, y melanocitos presentes en todas las capas de la epidermis. Imagen tomada de: Histology at Yale [5]

En este cáncer se reconocen dos etapas: la de crecimiento radial, en la cual, los melanocitos crecen en todas las direcciones, hacia arriba y a los lados de la epidermis y hacia la dermis; externamente, se puede observar como una lesión negra con partes de café oscuro a claro y una combinación de rosa a rojo o sombras azules. A nivel microscópico, sus células pueden



verse como nidos mal conformados o como células individuales en todos los niveles de la epidermis; en esta etapa todavía no tiende a generarse metástasis. Con el tiempo, de uno a dos años, se presenta la etapa de crecimiento vertical, donde nódulos redondos crecen de forma perpendicular a la superficie de la piel. A este punto, los melanocitos no presentan pigmentación, o tienen muy poca, y usualmente la metástasis se da hacia los ganglios linfáticos de la región [2], [8]. En la Fig. 6, tomada de Histology at Yale [5], se pueden apreciar melanocitos presentes en todas las capas de la epidermis y nidos de melanocitos que incluso empiezan a penetrar la dermis, lo cual también puede ser indicador de la etapa de crecimiento vertical.

### 2.3. Cáncer de piel: Detección.

De acuerdo con la Sociedad Americana del cáncer, la primera recomendación es realizar un autoexamen: tener conocimiento sobre los lunares, pecas, imperfecciones, y cualquier otra marca en la piel, para que, dado el caso en que se generen cambios, el mismo paciente lo pueda notar. En este autoexamen se deben examinar todas las áreas del cuerpo, incluyendo las palmas de las manos y pies, orejas, uñas, el cuero cabelludo y la espalda, se deben buscar en las marcas de la piel cambios en color, tamaño, y forma. La aparición de nuevos lunares también debe ser de atención [9], [10].

Respecto al melanoma, se conoce la regla del ABCD (por su sigla en inglés: A: Assymetry, B: Border, C: Color y D: Diameter/Difference). Con esta regla, se analizan lesiones sospechosas de acuerdo con su asimetría (A) que hace referencia a encontrar una mitad distinta a la otra, el borde (B) donde pueden encontrarse irregulares, escalonados, poco definidos: opuesto a suaves y de líneas rectas, color (C) sombras variando desde un área a otra y diámetro (D) mayores a 6mm. Las lesiones que presentan estas características podrían ser potencialmente melanoma.

Adicionalmente a la regla del ABCD se añade la evolución de la lesión (E), diferenciación (D) de otras lesiones o cambios en la apariencia o sintomatología con el tiempo. Los cambios de color y tamaño son las dos características tempranas más comunes notadas por los pacientes que podrían ser útiles en discriminar melanoma de otras lesiones benignas. [11].

En el caso del cáncer de células basales o escamosas se debe prestar atención a: dolores, bultos, imperfecciones, marcas inusuales, o cambios en la piel que se sientan o vean distintos. Las áreas de los cambios en la piel se pueden tornar rojizas, inflamadas, presentar sangrado, supurar o incluso generan comezón, dolor, entre otras. En el cáncer de células basales y escamosas las marcas pueden llegar a ser variadas [9], [10].

Una vez con el dermatólogo, además de realizar el examen físico, este también realizará una revisión con un dermatoscopio, el cual es un dispositivo portable, que permite observar la lesión del paciente directamente, sin necesidad de realizar biopsias. De acuerdo con Palacios y Díaz [12], la dermatoscopia es un enlace entre la dermatología clínica macroscópica y la dermatopatología microscópica.

El dermatoscopio es un dispositivo conformado por una lente de aumento, un sistema de iluminación que puede ser una fuente de luz tipo halógena o LED y su fuente de alimentación. Existen dermatoscopios de dos tipos: de inmersión y de luz polarizada; en la Fig. 7 [13] se muestra un dermatoscopio comercial que posee las opciones de luz polarizada y no polarizada. Los dermatoscopios de inmersión permiten observar los tonos marrones y azules de la melanina en la epidermis, estructuras azul-blanquecinas, capas profundas como la unión entre epidermis y dermis, y la capa superior de la dermis. Por otro lado, los dermatoscopios de luz polarizada permiten reducir la reflexión de la luz sobre la superficie cutánea mejorando la observación de las estructuras rojizas y los vasos sanguíneos [12]. Estos dispositivos actualmente traen diversas mejoras, como, por ejemplo, el acoplamiento a un smartphone para tomar inmediatamente una imagen de lo que el dermatólogo está observando.

Específicamente, en el caso del melanoma, existen dos pruebas para conocer el pronóstico de supervivencia: el Espesor de Breslow y el Nivel de Clark. En el primero, se hace uso de un micrómetro ocular para realizar la medición del espesor del tumor; en este, la medición se realiza desde la capa granular de la epidermis hasta el punto más profundo de invasión. A medida que va aumentando el espesor de Breslow, la supervivencia decrece [11]: la supervivencia a 5 años es del 100% a un espesor menor de 0.76mm y del 22.2% a espesores mayores de 3mm [14].

En cuanto al nivel de Clark, este se basa en la definición de 5 niveles de invasión del melanoma en la piel: Nivel I: El melanoma se encuentra confinado en la epidermis, Nivel II: se extiende hacia la capa papilar de la dermis, Nivel III: Ocupa toda la capa papilar de la dermis y alcanza la interfaz entre la capa papilar y la reticular, Nivel IV: Se extiende hacia la capa reticular y Nivel V: Las células de melanoma invaden el tejido subcutáneo. Clark encontró una correlación entre el nivel de invasión y la supervivencia; varios estudios han comprobado esto, sin embargo, otros han encontrado que el espesor de Breslow es más poderoso para dichos pronósticos [11], [14].

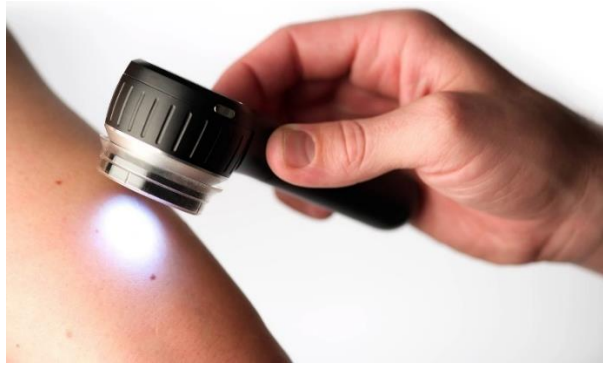


Figura 7. Dermatoscopio, Imagen tomada de DermLite [13]

Dado el caso en que el médico sospeche de la lesión, se realiza una biopsia, en la cual, el área afectada o una parte de esta es removida y enviada al laboratorio para su análisis bajo el microscopio por parte de un patólogo o dermatólogo quien tiene un entrenamiento especial en observar muestras de piel. Otro tipo de biopsias son realizadas bajo diagnóstico del médico tratante, lo cual depende de si el melanoma ya ha sido diagnosticado [15] o si los ganglios linfáticos bajo la piel se sienten duros o de mayor tamaño, lo cual puede ser el caso del cáncer de células basales o escamosas [16]. Para conocer si el cáncer se ha esparcido hacia estas zonas, se realizan biopsias a los nódulos linfáticos cercanos.

Ante las técnicas clásicas de observación de lesiones cutáneas, nuevas técnicas como la microscopía confocal han empezado a tener mayor auge en Europa y en algunas partes de Estados Unidos. Esta es una alternativa de diagnóstico en zonas ya extraídas [17] o en zonas afectadas sin la necesidad de realizar biopsias [18]. Un equipo comercial de microscopía confocal para dichos fines, se puede apreciar en la Fig. 8 [19]. Asimismo, algunos investigadores actualmente se encuentran en etapa de desarrollo de equipos de microscopía confocal portables [20].



Figura 8. Equipo comercial para examinar la piel in vivo basado en microscopía confocal. Imagen tomada de VivaScope [19].



Figura 9. Equipo comercial de DHM. Imagen tomada de Phase Holographic Imaging PHI AB [21].

En cuanto a la microscopía holográfica digital, de acuerdo con nuestro conocimiento, además de ser empleada en estudios de análisis de muestras biológicas, también ha empezado a ser ampliamente usada en el estudio de piel. Este es el caso de Mojsiewicz-Pieńkowska et al. [22], quienes por medio de DHM observan muestras de piel ex vivo de humanos para entender los mecanismos bajo los cuales algunas sustancias presentes en determinados productos permean la epidermis y la dermis, causando diversos tipos de daños. Asimismo, en líneas celulares de melanoma, la microscopía holográfica digital ha sido empleada para clasificar tres tipos de muerte celular programada (Apoptosis, Ferroptosis y Necroptosis) [23], estudiar los efectos de la aplicación de pulsos eléctricos [24], clasificar distintas etapas de transición entre estados celulares [25], evaluación de motilidad celular [26] (siendo estos últimos dos con un sistema de DHM comercial como el de la Fig. 9 [21]), entre otros.

Por otro lado, también existen estudios por medio de una variante de la holografía digital, como lo es la interferometría digital holográfica [27], con la cual, se han realizado

mediciones de coeficientes de rigidez en piel porcina después de ser expuesta a altas dosis de radiación UV, una de las principales causantes del cáncer de piel.

Como se mencionó en el capítulo anterior, estudios con microscopía holográfica han arrojado información sobre los índices de refracción en células cancerígenas, los cuales presentan valores más altos que para las células normales [28]. Además de este parámetro, se ha mostrado que, otros tales como el área, espesor y volumen celular presentan cambios ante la aplicación de medicamentos para combatir el cáncer [29], así como el proceso apoptótico que podría generarse al ser aplicado bajo determinadas concentraciones [30]. Por otro lado, el módulo de Young, principalmente estudiado con microscopía de fuerza atómica, presenta valores pequeños en el caso de células cancerígenas, comparadas con las sanas [31].

Los tres tipos de cáncer de piel que aquí se describieron presentan determinadas características que permiten diferenciar las capas epidérmica y dérmica con lesiones de una sana. En el caso del melanoma, el más letal, se habló sobre el crecimiento vertical hacia el que puede avanzar. Un estudio sobre lo que ocurre en la morfología celular con el avance de estas patologías es necesario para generar más información tanto a nivel de bases de datos como de la técnica que en esta tesis doctoral se trabajó. Con esto, se conocerían más variables medibles además de la información 2D que usualmente se adquiere por técnicas clásicas.

A continuación, en los capítulos tres y cuatro, se describirán los arreglos experimentales que fueron configurados. Esto con el fin de mostrar la capacidad de la técnica de DHM para realizar mediciones tanto de índice de refracción como de espesor en muestras de cáncer de piel; así como de determinar si estos parámetros ofrecen cierta correlación entre muestras sanas Vs. muestras con lesiones asociadas a esta patología.

## Referencias.

1. T. Takai, "Advances in histopathological diagnosis of keratoacanthoma," *J. Dermatol.* **44**, 304–314 (2017).
2. M. H. Ross and W. Pawlina, *Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology, 6th Edition* (Lippincott, 1979).
3. A. Mescher, *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Fifteenth Edition* (McGraw-Hill Education, 2018).
4. L. P. Gartner, *BRS Cell Biology and Histology, Board Review Series* (Wolters Kluwer Health, 2018).
5. P. Takizawa, "Histology at Yale,"

<http://medcell.med.yale.edu/histology/histology.php>.

6. P. Goon, C. Banfield, O. Bello, and N. J. Levell, "Skin cancers in skin types IV–VI: Does the Fitzpatrick scale give a false sense of security?," *Ski. Heal. Dis.* **1**, 1–5 (2021).
7. "The Histology Guide by the Faculty of Biological Sciences at Leeds," [www.histology.leeds.ac.uk](http://www.histology.leeds.ac.uk).
8. V. Kumar, A. K. Abbas, J. C. Aster, and S. L. Robbins, *Robbins Basic Pathology* (Elsevier/Saunders, 2013).
9. "Can Basal and Squamous Cell Skin Cancers Be Found Early?," <https://www.cancer.org/cancer/basal-and-squamous-cell-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/detection.html>.
10. "Can Melanoma Skin Cancer Be Found Early?," <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/detection.html>.
11. K. Wolff, L. A. Goldsmith, S. I. Katz, B. A. Gilchrest, A. S. Paller, and D. J. Leffell, eds., *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, Seventh (McGraw-Hill Medical, 2008).
12. D. Palacios-Martínez and R. A. Díaz-Alonso, "Dermatoscopia para principiantes (I): características generales," *Semergen* **43**, 216–221 (2017).
13. "DERMLITE DL4W," <https://dermlite.com/collections/pocket-dermoscopy-devices/products/dermlite-dl4w>.
14. M. J. Payette, M. Katz, and J. M. Grant-Kels, "Melanoma prognostic factors found in the dermatopathology report," *Clin. Dermatol.* **27**, 53–74 (2009).
15. "Tests for Melanoma Skin Cancer," <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html>.
16. "Tests for Basal and Squamous Cell Skin Cancers," <https://www.cancer.org/cancer/basal-and-squamous-cell-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html>.
17. V. Ahlgrimm-Siess, H. S. Rabinovitz, M. Oliviero, R. Hofmann-Wellenhof, A. A. Marghoob, S. González, and A. Scope, "Confocal Microscopy in Skin Cancer," *Curr. Dermatol. Rep.* 105–118 (2018).
18. "What's New in Melanoma Skin Cancer Research?," <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/new-research.html>.
19. "VivaScope," <https://www.vivascope.de/products/vivascope1500-3000/>.
20. T. U. of Arizona, "'The Future is Now' in New Skin Cancer Diagnosis Technology," <https://healthsciences.arizona.edu/connect/features/future-now-new->

skin-cancer-diagnosis-technology.

21. "Phase Holographic Imaging PHI AB," <https://phiab.com/holomonitor/system-components/>.
22. K. Mojsiewicz-Pieńkowska, E. Stachowska, D. Krenczkowska, D. Bazar, and F. Meijer, "Evidence of skin barrier damage by cyclic siloxanes (Silicones)—using digital holographic microscopy," *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–18 (2020).
23. K. L. Barker, K. M. Boucher, and R. L. Judson-Torres, "Label-free classification of apoptosis, ferroptosis and necroptosis using digital holographic cytometry," *Appl. Sci.* **10**, (2020).
24. V. L. Calin, M. Mihailescu, N. Tarba, A. M. Sandu, E. Scarlat, M. G. Moiescu, and T. Savopol, "Digital holographic microscopy evaluation of dynamic cell response to electroporation," *Biomed. Opt. Express* **12**, 2519 (2021).
25. M. Hejna, A. Jorapur, J. S. Song, and R. L. Judson, "High accuracy label-free classification of single-cell kinetic states from holographic cytometry of human melanoma cells," *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
26. Y. Zhang and R. L. Judson, "Evaluation of holographic imaging cytometer holomonitor M4® motility applications," *Cytom. Part A* **93**, 1125–1131 (2018).
27. L. Silva-Acosta, M. del S. Hernández-Montes, F. Mendoza-Santoyo, M. H. De la Torre-I., J. M. Flores-Moreno, G. Frausto-R., and S. Muñoz-S., "Study of skin rigidity variations due to UV radiation using digital holographic interferometry," *Opt. Lasers Eng.* **126**, (2020).
28. P. Y. Liu, L. K. Chin, W. Ser, H. F. Chen, C. M. Hsieh, C. H. Lee, K. B. Sung, T. C. Ayi, P. H. Yap, B. Liedberg, K. Wang, T. Bourouina, and Y. Leprince-Wang, "Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: Past, present and future," *Lab Chip* **16**, 634–644 (2016).
29. Z. El-Schich, A. Mölder, H. Tassidis, P. Härkönen, M. F. Miniotis, and A. G. Wingren, "Induction of morphological changes in death-induced cancer cells monitored by holographic microscopy," *J. Struct. Biol.* **189**, 207–212 (2015).
30. K. Alm, Z. El-Schich, M. Falck Miniotis, A. Gjörlöf Wingren, B. Janicke, and S. Oredsson, "Cells and Holograms – Holograms and Digital Holographic Microscopy as a Tool to Study the Morphology of Living Cells," in *Intech* (IntechOpen, 2013), Vol. 11, p. 13.
31. F. Quan and K. Kim, "Medical applications of the intrinsic mechanical properties of single cells," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **48**, 865–871 (2016).

## Capítulo 3.

### Obtención simultánea del índice de refracción y espesor en un arreglo de Microscopía Holográfica Digital.

Por medio de la microscopía holográfica digital se puede obtener gran cantidad de información de las muestras analizadas. Esta información, es obtenida a partir de dos variables que se pueden medir directamente: espesor e índice de refracción en el caso de la técnica de DHM por transmisión; y altura (topografía) en el caso de muestras reflectivas y con la técnica de DHM por reflexión.

En un arreglo interferométrico por transmisión, tanto el índice de refracción así como el espesor se obtienen por medio de la Diferencia de Camino Óptico (DCO), generada entre el frente de onda del haz objeto y el del haz referencia: el camino óptico del haz objeto, al atravesar la superficie de la muestra se ve modificado debido a la distribución morfológica e índice de refracción de la misma, lo cual genera una DCO distinta a cero; por lo tanto, el haz objeto es el que lleva la información relacionada con la muestra a analizar, formando un holograma al interferir con el haz referencia, de donde se pueden extraer la amplitud y fase del objeto.

En una configuración de DHM por transmisión, debido a que existe una dependencia entre el índice de refracción ( $n$ ) y el espesor ( $d$ ), es necesario conocer una variable para calcular la segunda, a esto es a lo que se conoce como un acoplamiento entre  $n$  y  $d$ . Hasta el momento, existen gran variedad de soluciones a este problema, como lo son el uso de dos técnicas distintas (una de estas DHM, por supuesto), la obtención de dos mediciones interferométricas a partir de la variación del índice de refracción que rodea la muestra o la longitud de onda



del arreglo, el limitar la muestra a un espesor conocido, o incluso aproximar la muestra a un modelo conocido. Además de todas estas soluciones, existen técnicas mucho más complejas, que incluso brindan información 3D del índice de refracción como lo es la Microscopía Tomográfica de Fase (o TPM por su sigla en inglés, Tomographic Phase Microscopy).

En este capítulo, se describen brevemente las implementaciones que, a nuestro conocimiento, se han realizado para el desacoplamiento entre el índice de refracción del espesor de una muestra en una configuración de DHM. Luego, se presenta un método propio que propone la introducción de una inclinación en la muestra en conjunto con un modelo polinomial de segundo grado que está en capacidad de brindar información del índice de refracción independiente del espesor. Este modelo matemático fue simulado en Matlab e implementado experimentalmente en el laboratorio. Las mediciones se realizaron sobre una muestra de sustrato de SiO<sub>2</sub> depositado en un portaobjetos con  $n$  y  $d$  conocidos y para la línea celular de melanoma A375. Los resultados de estas mediciones y el modelo matemático fueron reportados en una revista de circulación internacional [1].

### 3.1. Técnicas de desacoplamiento entre índice de refracción y espesor de muestras en sistemas DHM.

Dardikman y Shaked [2] clasifican las diversas técnicas y modelos de desacoplamiento entre índice de refracción y espesor de muestras en tres tipos: obtención del índice de refracción por evaluación directa del espesor, desacoplamiento por medio de dos mediciones interferométricas, y métodos donde se obtienen no sólo mapas de índices de refracción en 2D sino también 3D. A continuación, se dará una breve descripción de algunos de estos.

#### 3.1.1. Obtención del índice de refracción por evaluación directa del espesor.

Para el método de la evaluación directa del espesor implica conocer esta variable a priori, para lo cual existen, tres subclasificaciones: aproximación del espesor a una esfera o elipsoide, medición directa del espesor por otra técnica y confinamiento de la muestra a una celda de espesor conocido [2].

##### 3.1.1.1. Aproximación del espesor a una esfera o elipsoide.

En esta técnica, como su nombre lo dice, la morfología de la muestra es aproximada a modelos geométricos de una esfera o uno elipsoidal, en el caso en que las células no sigan

un modelo esférico [2], [3]. Kosmeier et al. [4] han empleado el modelo matemático de esfera en mediciones de microscopía holográfica para células de tumor de páncreas. En este modelo, las variables desconocidas (espesor, índice de refracción y posición  $x,y$  de la célula) son halladas por medio de un ajuste no lineal basado en el método de Gauss-Newton. Otros autores, hallan el radio de la célula a partir de la información morfológica en 2D; en pocas palabras, en la imagen de fase, la célula es ajustada a un círculo [5].

#### 3.1.1.2. Medición directa del espesor por otra técnica.

Otro método para obtener el espesor o el índice de refracción de la muestra en DHM es por medio de la medición de una de las dos variables por otra técnica. Ese es el caso de Cardenas et al. [6] quienes integran un sistema de DHM en conjunto con uno de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM por su sigla en inglés: Atomic Force Microscopy), con el que obtienen el espesor de la muestra para así desacoplarlo del índice de refracción, obtenido por la medición de fase con DHM. En esta clasificación, también se encuentran trabajos donde se combinan Microscopía Tomográfica de Fase (TPM: Tomographic Phase Microscopy) con DHM sobre fibroblastos [7] y Microscopía Confocal con DHM para mediciones en células HeLa [8].

También existen trabajos de obtención de hologramas multiplexados con DHM y Microscopía holográfica de reflexión total interna (TIR, por su sigla en inglés: Total Internal Reflection) [9], [10], donde el índice de refracción se mide por TIR. En este caso, se tiene en cuenta el tratamiento de Fresnel en el que la reflexión total interna ocurre cuando el haz de luz pasa de un medio con índice de refracción mayor (un prisma, en esta configuración) hacia uno de índice menor (muestra). Una vez el índice de refracción es medido con TIR, el espesor se mide con DHM.

Para llevar a cabo este método, el espesor no puede cambiar entre técnicas [2]. Muchos de los autores realizan las mediciones casi de forma simultánea, exigiendo así que ambos arreglos estén configurados en conjunto.

#### 3.1.1.3. Confinamiento de la muestra en una cavidad de espesor conocido.

Este método es el implementado por Lue et al. [11], donde células HeLa son confinadas en microcanales de tamaño conocido; sin embargo, dicho parámetro no es necesario conocerlo a priori, ya que se realizan mediciones de fase relativas, donde el espesor es eliminado. Estas mediciones de fase relativas permiten conocer el índice de refracción, primero en la interfaz Agua-Medio de Inmersión y luego en la interfaz Célula-Medio de Inmersión.

### 3.1.2. Desacoplamiento de índice de refracción y espesor por medio de dos mediciones interferométricas.

El principio básico de este método es el registro de al menos dos hologramas con dos longitudes de onda distintas o con dos medios de inmersión con índices de refracción distintos.

#### 3.1.2.1. Introducción de una segunda longitud de onda.

Autores como Rappaz et al. [12] y Jafarfard [13] han implementado sistemas de DHM con dos longitudes de onda  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$ . Debido a la dependencia del índice de refracción con la longitud de onda, se hace necesario que el medio que está rodeando la muestra sea más dispersivo que la muestra misma. En esta técnica, el índice de refracción  $n_c$  de la muestra de espesor  $d$ , a la longitud de onda  $\lambda_1$ , rodeado por un medio de índice de refracción  $n_m$  está dado por:

$$n_{c1} = DCO_1 \left( \frac{\Delta n_{m1,2}}{DCO_2 - DCO_1} \right) + n_{m1} \quad (1)$$
$$DCO = (n_c - n_m) d$$

Donde DCO es la Diferencia de Camino Óptico para  $\lambda_1$  ( $DCO_1$ ) y  $\lambda_2$  ( $DCO_2$ ).

Existen trabajos como el de Turko y Shaked [14] de citometría volumétrica en glóbulos rojos, donde se da solución al problema de acoplamiento agregando una tercera longitud de onda, esto para implementar un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas: el espesor de la muestra, su concentración de hemoglobina y el índice de refracción de moléculas citoplasmáticas. El tratamiento que le dan es el de un sistema no lineal y lo resuelven mediante mínimos cuadrados.

#### 3.1.2.2. Variación del medio que rodea la muestra.

La variación del medio que rodea la muestra implica una variación en su índice de refracción ( $n_m$ ), este es el método empleado por Rappaz et al. [15] para la medición en neuronas sometidas a estrés hipotónico. En este trabajo, una primera medición de fase se realiza con la muestra puesta en una celda de perfusión con manitol, y en la segunda medición el manitol es reemplazado por el Nycodenz, una molécula hidrofílica, de la misma molaridad que el

primero para evitar variaciones de volumen de la célula. Agregar este compuesto hace que el índice de refracción original se incremente ( $\delta n$ ); obteniéndose las ecuaciones:

$$\begin{aligned}\varphi_{1,i} &= \frac{2\pi}{\lambda} (\overline{n_{c,i}} - n_m) d_i \\ \varphi_{2,i} &= \frac{2\pi}{\lambda} (\overline{n_{c,i}} - (n_m + \delta n)) d_i\end{aligned}\quad (2)$$

Resolviendo este sistema, se logra despejar el espesor  $d$  para cada píxel  $i$  y el índice de refracción de la muestra  $\overline{n_c}$  de la forma:

$$\begin{aligned}\overline{n_{c,i}} &= \frac{\delta n \varphi_{1,i}}{(\varphi_{1,i} - \varphi_{2,i})} + n_m \\ d_i &= \frac{\lambda}{2\pi} \frac{\varphi_{1,i}}{(\overline{n_{c,i}} - n_m)}\end{aligned}\quad (3)$$

3.1.2.3. Desacoplamiento de índice de refracción y espesor introduciendo una inclinación en la muestra.

Pastrana-Sanchez y Rodriguez-Zurita et al. [16] proponen un desacoplamiento de índice de refracción y espesor por medio de la introducción de una inclinación en la muestra. En su trabajo, analizan una placa plano-paralela, como la de la Fig. 1, sometida a una inclinación  $\varphi$  en un interferómetro tipo Mach-Zehnder, de donde deducen la expresión matemática para la fase de la forma:

$$\phi(\varphi) = \frac{2\pi d}{\lambda} \left\{ n_p \sqrt{1 - \frac{\sin^2 \varphi}{n_p^2}} - \sqrt{1 - \sin^2 \varphi} \right\}\quad (4)$$

Donde  $n_p$  y  $d$  son el índice de refracción y el espesor de la placa, los cuales son desacoplados mediante la solución de la relación no lineal de la Ec. 4 para varias inclinaciones de la muestra y midiendo la fase introducida para cada ángulo  $\varphi$  por conteo de franjas.

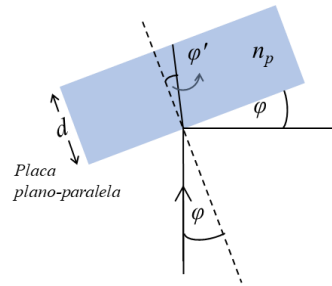


Figura 1. Placa plano-paralela sometida a una inclinación  $\varphi$ , donde  $\varphi'$  es el ángulo de refracción. Imagen modificada de Rodríguez-Zurita et al. [17].

### 3.1.3. Microscopía Tomográfica de Fase.

Esta técnica permite medir el índice de refracción de la muestra en 3D, gracias al mapeo desde una transformada de Fourier en 2D hacia una transformada en 3D, la cual es una de las ventajas que presenta frente a las técnicas descritas previamente.

Para implementar la Microscopía Tomográfica de Fase (TPM), los hologramas son capturados a distintos ángulos, esto se puede lograr bien sea rotando la muestra o el haz de iluminación. La TPM, a su vez, tiene dos variantes: Tomografía de Proyección Óptica y la Tomografía de Difracción Óptica, u OPT y ODT (por sus siglas en inglés: Optical Projection Tomography, y Optical Diffraction Tomography), respectivamente.

En el caso de la Tomografía de Proyección Óptica, el índice de refracción de la muestra se obtiene por medio de una transformada de Fourier inversa en 3D de la DCO; esto se entiende desde el fundamento de que la DCO es la transformada de Radon del índice de refracción. La rotación de la muestra o del haz que la ilumina a distintos ángulos permite realizar un mapeo de cada transformada de Fourier en 2D para cada DCO a cada ángulo hacia el espacio de Fourier en 3D [2].

En la Tomografía de Difracción Óptica, a diferencia de la OPT, sí se tiene en cuenta la difracción, es decir, la interacción del campo electromagnético incidente con la materia. En esta técnica, los campos esparcidos para cada ángulo cubren una superficie hemisférica en 2D (esfera de Ewald); formándose para todos los ángulos, una figura similar a una mariposa [18]. El mapa de índices de refracción de la muestra en 3D se genera por medio de una transformada de Fourier 3D inversa, todo el proceso de reconstrucción implica inicialmente el uso de la aproximación de Rytov.

## 3.2. Obtención de índice de refracción y espesor en la línea celular de melanoma A375<sup>1</sup>.

### 3.2.1. Desacoplamiento del índice de refracción y espesor por dos mediciones interferométricas, introduciendo un ángulo de inclinación.

Una vez conocidos algunos métodos para el desacoplamiento de índice de refracción y espesor en configuraciones de DHM, se propuso uno basado en el trabajo de Rodríguez-Zurita [17], que introduce una inclinación sobre la muestra y de forma simultánea, por un método de ajuste no lineal obtiene tanto el espesor como el índice de refracción de un cubreobjetos. En este trabajo [16], las mediciones las realizan por medio de conteo de franjas para conocer el valor de fase introducido por cada ángulo de inclinación al que se somete la muestra. Nuestro método, publicado a inicios del 2021 [1], hace uso de la propuesta de Rodríguez-Zurita [17], es decir, de la introducción de una inclinación sobre la muestra así como de una parte del planteamiento matemático, el cual se describirá a continuación.

De acuerdo con el trabajo de Rodríguez-Zurita [17], al introducir una inclinación a una muestra de placa plano-paralela en un arreglo de un interferómetro tipo Mach Zehnder, la fase estaría dada por la Ec. 4, la cual, si se analiza detenidamente, al ingresar un ángulo de inclinación nulo ( $\varphi=0^\circ$ ), retornaría a la ecuación clásica de fase ( $\phi$ ) introducida en este mismo tipo de configuración:

$$\phi(\varphi=0^\circ) = \frac{2\pi d}{\lambda} (n_p - 1) \quad (5)$$

Tanto la Ec. 4 como la Ec. 5 son dos mediciones de fase distintas para una misma muestra, una con inclinación de  $0^\circ$  y la otra con una inclinación distinta de cero. Operando ambas ecuaciones se obtiene la expresión:

$$\frac{\phi_2(\varphi_2 = \varphi)}{\phi_1(\varphi_1 = 0^\circ)} = \frac{n_p \sqrt{1 - \frac{\sin^2 \varphi}{n_p}} - \sqrt{1 - \sin^2 \varphi}}{n_p - 1} \quad (6)$$

---

<sup>1</sup> Método publicado en el artículo: Measurement of morphology-thickness and refractive index in Melanoma A375 cell line using digital holographic microscopy [1].

La Ec. 6 representa la relación entre las fases ópticas  $\phi_1$  y  $\phi_2$  para una muestra en un arreglo interferométrico tipo Mach Zehnder con ángulos de inclinación  $\varphi_1=0^\circ$  y  $\varphi_2\neq 0^\circ$  respectivamente. De acuerdo con la clasificación de Dardikman y Shaked [2], el método aquí propuesto, se encontraría en el de desacoplamiento de índice de refracción y espesor por medio de dos mediciones interferométricas. Aplicando series de Taylor a los radicales de la Ec. 6 y reorganizando, se obtiene:

$$2n_p^2 \left[ \frac{\phi_2}{\phi_1} - 1 \right] - n_p \left[ 2 \frac{\phi_2}{\phi_1} - 2 + \sin^2 \varphi \right] + \sin^2 \varphi = 0 \quad (7)$$

Esta ecuación es un polinomio de grado 2 que depende de los mapas de fase a la inclinación introducida  $\varphi_2=\varphi$  y  $\varphi_1=0^\circ$ . Las raíces de este polinomio entregarían entonces información del índice de refracción. Además del modelo matemático que se propone, la medición de fase no se realiza por conteo de franjas sino por métodos de reconstrucción como se verá más adelante.

### 3.2.2. Arreglo experimental.

Se implementó una configuración de DHM en transmisión con un arreglo de interferómetro tipo Mach-Zehnder como el que se muestra en la Fig. 2. Este sistema cuenta con una fuente de luz láser de 638nm y modulador acusto óptico (AOM) que brinda mayor estabilidad al haz; el cual, una vez filtrado y colimado (etapa de filtraje espacial y lente  $L$ ), es separada en haz objeto y haz referencia por medio del divisor  $BS1$ . El haz objeto es dirigido hacia la muestra con el espejo  $M1$  y el haz referencia hacia un segundo divisor  $BS2$  y objetivo de microscopio  $MO2$  con el espejo  $M2$ . Un objetivo de microscopio  $MO1$  de magnificación 50x, apertura numérica  $NA = 0.55$  y distancia de trabajo  $WD = 10.1\text{mm}$  se encarga de amplificar la muestra. Ambos objetivos de microscopio  $MO1$  y  $MO2$  se encuentran pareados, es decir, tienen las mismas características para que los frentes de onda tanto del haz objeto como del haz referencia sean lo más idénticos posible. El haz objeto, ya con la información de la muestra interfiere con el haz referencia gracias al divisor de haz  $BS2$  y el holograma formado es capturado con un sensor Allied Vision CMOS Mako U-503B con una resolución de 1944x2592 pixeles y tamaño de píxel de 2.2 $\mu\text{m}$ .

La inclinación de la muestra fue introducida por medio de una montura mecánica que tiene una precisión de  $0.02^\circ$ , los ángulos introducidos fueron desde  $0.02^\circ$  hasta  $0.1^\circ$  a un paso de  $0.02^\circ$ . El detalle de la muestra con índice de refracción  $n_p$ , espesor  $d$ , ángulo de inclinación  $\varphi$  y ángulo de refracción  $\varphi'$  se presenta a la izquierda de la figura.

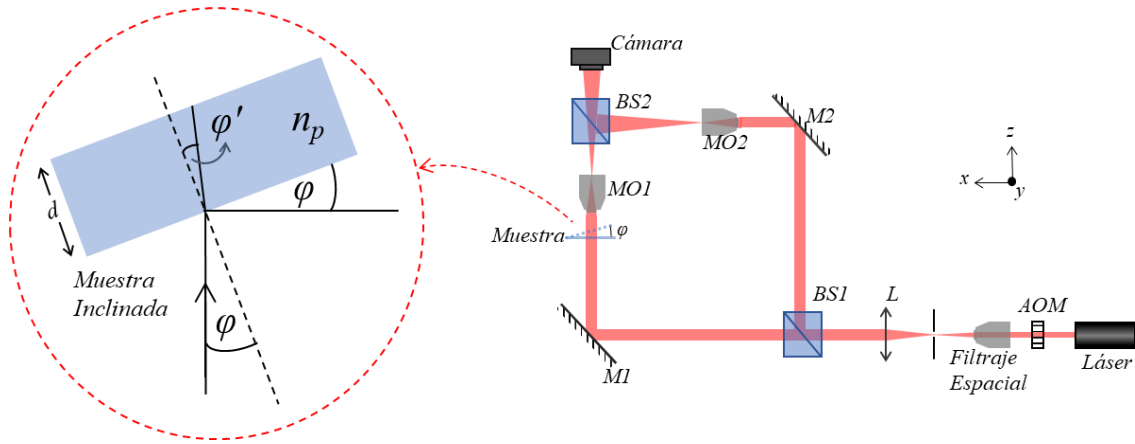


Figura 2. Arreglo experimental para la obtención de índice de refracción y espesor introduciendo una inclinación sobre la muestra.

### 3.2.3. Línea celular A375.

Un cultivo celular hace referencia a la extracción de células de un animal o planta y su subsecuente crecimiento en un medio artificial favorable, esto es lo que se conoce como un cultivo primario; una vez que las células ocupan todo el sustrato disponible, deben ser subcultivadas, es decir, deben pasarse a un nuevo contenedor con un medio de crecimiento fresco para proveerles más espacio y continúen creciendo. Después del primer subcultivo, el cultivo primario se conoce como una línea celular o subclon [19].

Como muestra biológica a evaluar se empleó la línea celular A375 [A375] (ATCC® CRL-1619™) [20] que corresponde a melanoma de una mujer de 54 años. Esta línea celular puede ser adquirida comercialmente y la empresa que las provee, brinda información respecto de esta muestra. Para las mediciones que se presentarán a continuación, las muestras fueron donadas por el Dr. German Plascencia Villa de la Universidad de Texas en San Antonio, quien las preparó en un cubreobjetos y las deshidrató.

La muestra observada en un microscopio comercial marca Leica se presenta en la Fig. 3.



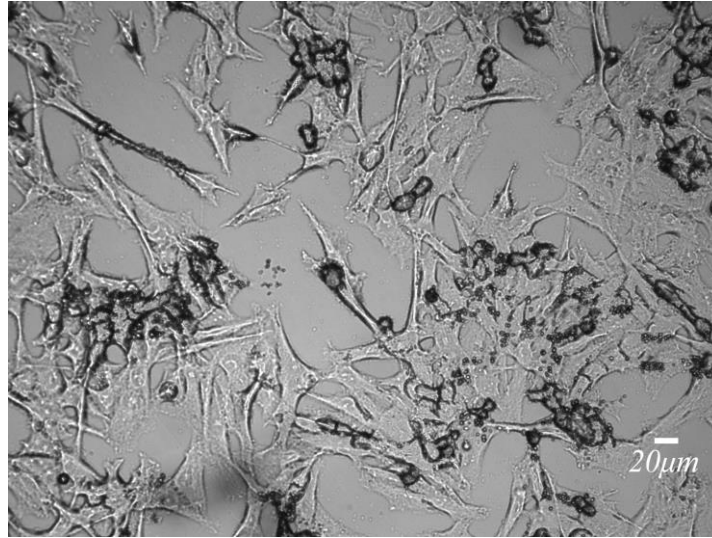


Figura 3. Línea celular de melanoma A375 [20] vista a través de un microscopio comercial Leica.

### 3.2.4. Método experimental.

A continuación, en la Fig. 4, mediante un diagrama se explica paso a paso el método experimental que se siguió para obtener las mediciones de índice de refracción y espesor en muestras de melanoma.

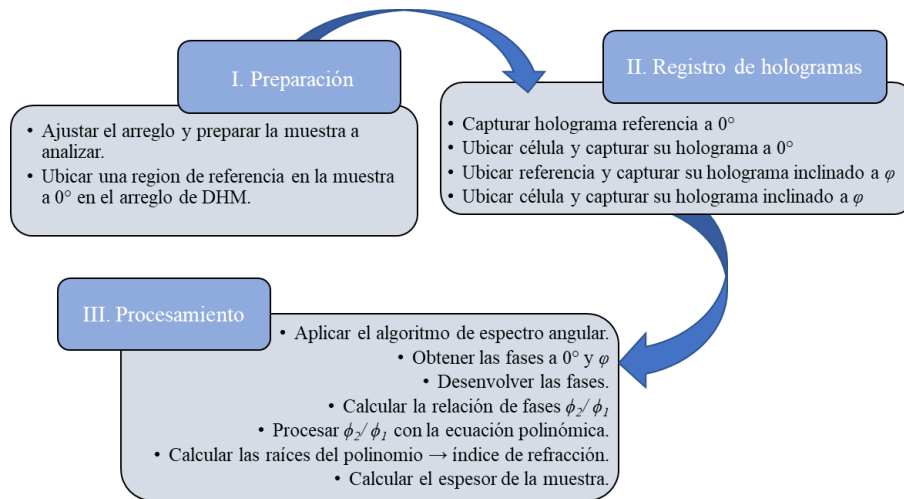


Figura 4. Método experimental paso a paso.

### I. Preparación de la muestra.

Ya que la muestra se recibió preparada, no se tuvo que realizar ningún procesamiento adicional. Sin embargo, fue necesario observarla inicialmente en un microscopio comercial para ubicar una zona libre de células y se pudiera emplear como referencia.

A continuación, se procedió a montar la muestra en el arreglo de DHM previamente ajustado, donde fue ubicada sobre la zona de referencia a  $0^\circ$ .

### II. Registro de hologramas (Método del holograma de referencia).

Para realizar medidas sobre la muestra a dos ángulos de inclinación, fue necesario registrar cuatro hologramas:

- Holograma de referencia a  $0^\circ$ : para este holograma, se ubicó sobre la muestra a  $0^\circ$  una región donde no se observaron células y, en dicha región se realizó un primer registro. A continuación, manteniendo la inclinación de  $0^\circ$ , se ubicó una región con células para el holograma del objeto.
- Holograma de célula (objeto) a  $0^\circ$ : con la célula de interés ubicada, se procedió a registrar su respectivo holograma a  $0^\circ$ .
- Holograma de referencia inclinado: se ubicó nuevamente la muestra sobre la misma zona del primer holograma, y se introdujo el ángulo de inclinación  $\varphi$ , a continuación, se registró su holograma.
- Holograma de célula (objeto) inclinado: Manteniendo el ángulo de inclinación  $\varphi$ , se ubicó la misma célula de interés del segundo paso para registrar su holograma con una inclinación  $\varphi$ .

### III. Procesamiento.

Los hologramas fueron procesados mediante el algoritmo de espectro angular y Fourier-Takeda, de ahí se obtuvo la fase envuelta tanto a  $0^\circ$  como a una inclinación  $\varphi$ . Para obtener la fase no envuelta, se aplicó el algoritmo de desenvolvimiento de fase [21] basado en el trabajo de Ghiglia y Romero [22]. Ya que se está aplicando el método de holograma de referencia, no fue necesario realizar corrección de aberraciones [23].

Una vez recuperados los mapas de fase  $\phi_2$  y  $\phi_1$ , se procedió a calcular  $\phi_2/\phi_1$  para aplicar la Ec. 7 que relaciona  $\phi_2/\phi_1$  con el índice de refracción de la muestra mediante un polinomio de grado 2.

Con las raíces del polinomio de grado 2 de la Ec. 7 el índice de refracción de la muestra es hallado; el espesor de esta se calcula por reemplazo directo del valor del índice de refracción en la Ec. 5.

### 3.2.5. Reconstrucción del holograma y filtraje del DC.

El método seleccionado para la reconstrucción del holograma fue el de espectro angular, el cual, como se describió en el capítulo 1, tiene la ventaja de que no depende de la distancia de reconstrucción; este método depende de dos transformadas de Fourier (una de ellas, una transformada de Fourier inversa).

Respecto del filtraje del DC del holograma, se trabajó basándose en el método de Takeda et al. [24], el cual hace uso de una máscara que filtra tanto el DC como la imagen gemela del holograma, dejando así solo uno de los lóbulos en la transformada de Fourier; este método se puede aplicar debido a que los hologramas fueron capturados en una configuración fuera de eje. Matemáticamente se puede ver como se describirá a continuación:

El patrón de intensidad capturado por el sensor de la cámara está descrito por la ecuación en forma compleja [25]:

$$I(r) = a(r) + I_{\phi}^*(r) \exp(if_0 r) + I_{\phi}(r) \exp(-if_0 r), \text{ donde: } I_{\phi} = \frac{1}{2} b(r) \exp(-i\phi(r)) \quad (8)$$

Donde  $I(r)$  y  $\phi(r)$  son la intensidad y fase del holograma descritos en forma compleja, y  $f_0$  es la frecuencia de la portadora (carrier en inglés), propia de la configuración fuera de eje. En el espacio de Fourier, la Ec. 8 está dada por:

$$I(f) = a(f) + I_f(f - f_0) + I_f^*(f + f_0) \quad (9)$$

La Ec. 9 representa en el espacio de Fourier la imagen real y virtual del holograma (lóbulos  $I_f$  e  $I_f^*$ ) y el dc:  $a(f)$ . Aplicando un filtraje en la frecuencia  $f_0$ , y luego aplicando una transformada de Fourier inversa se puede recuperar la información de fase  $\phi(r)$ :

$$\phi(r) = \tan^{-1} \left\{ \left\{ \mathfrak{F}^{-1} \left[ \exp(-if_0 r) \mathfrak{F}(A_0 \exp(-i\phi(r) + if_0 r)) \right] \right\}^* \right\} \quad (10)$$

La Ec. 10 representa la fase envuelta del holograma, donde  $A_0$  es la amplitud de la señal filtrada a la frecuencia  $f_0$ .

### 3.2.6. Resolución del sistema.

De acuerdo con las definiciones de resolución lateral y axial para una configuración DHM presentadas en el primer capítulo, en el arreglo experimental se tiene:

$$\delta x_0 \approx \frac{\lambda}{NA} = 1.16 \mu\text{m} \quad \delta z_0 \approx \frac{2\lambda}{NA^2} = 4.22 \mu\text{m} \quad (11)$$

Para calcular estos valores se tuvo en cuenta la apertura numérica del objetivo  $NA=0.55$ .

Así mismo, se evaluó una tarjeta de resolución USAF: las imágenes que se muestran a continuación corresponden a este elemento observado con el objetivo de 50x, con el haz objeto del sistema. En la Fig. 5, se puede diferenciar el elemento 6 del grupo 7 marcado con una línea roja punteada, este elemento corresponde a  $228 \text{ lp/mm}$ :

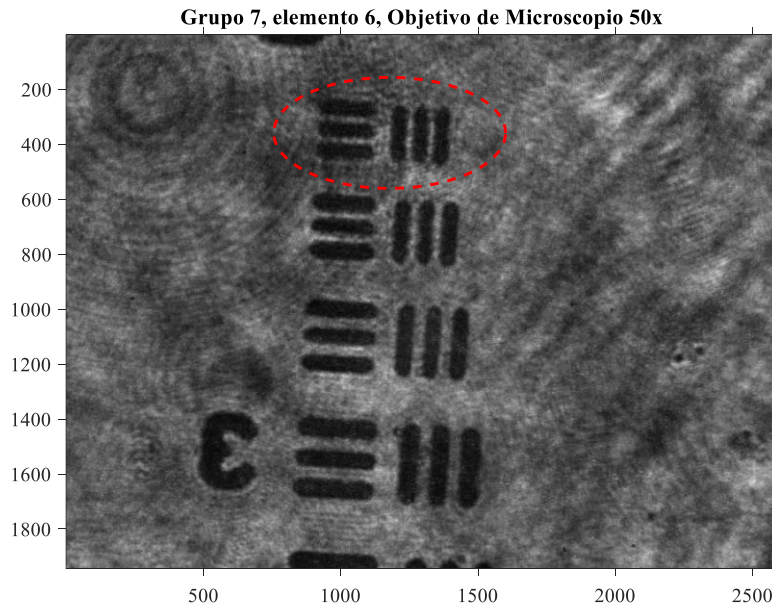


Figura 5. Detalle de la tarjeta USAF observada con el haz objeto del arreglo de DHM y un objetivo de microscopio de 50x.

La introducción de una inclinación sobre la muestra añade una distancia adicional, esta fue calculada de acuerdo con los valores obtenidos para la tarjeta USAF para un campo de visión aproximado de  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ . En la Fig. 6 se puede observar el detalle de este cálculo, donde el valor adicional es de  $0.17 \mu\text{m}$  y fue hallado por medio de una operación trigonométrica básica, para un ángulo de inclinación de  $0.1^\circ$ . Respecto a esta altura adicional se debe tener en cuenta que, así como se añade para el holograma objeto, también lo hace para el holograma referencia, y, ya que la técnica empleada es la del holograma de referencia, se podría decir que, para todo propósito práctico, dicha altura es eliminada.

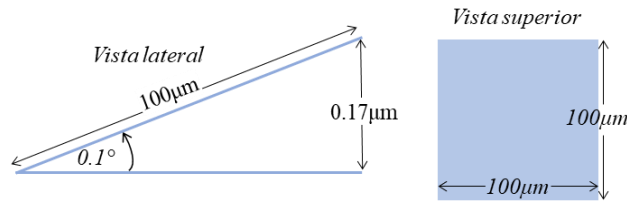


Figura 6. Vista lateral y superior de la muestra: detalle de la altura adicional debido al ángulo de inclinación.

### 3.2.7. Resultados.

En la Fig. 7 se muestran imágenes de la línea celular A375 capturadas en el microscopio comercial Leica, en estas se da el detalle de algunas de las morfologías que pueden presentar estas células, esto es importante tener en cuenta para la imagen que se presentará a continuación en la Fig. 8, que corresponde al holograma capturado con la configuración de DHM. En esta imagen se aprecian dos células, etiquetadas como I y II, las cuales tienen morfologías similares a las de la Fig. 7.

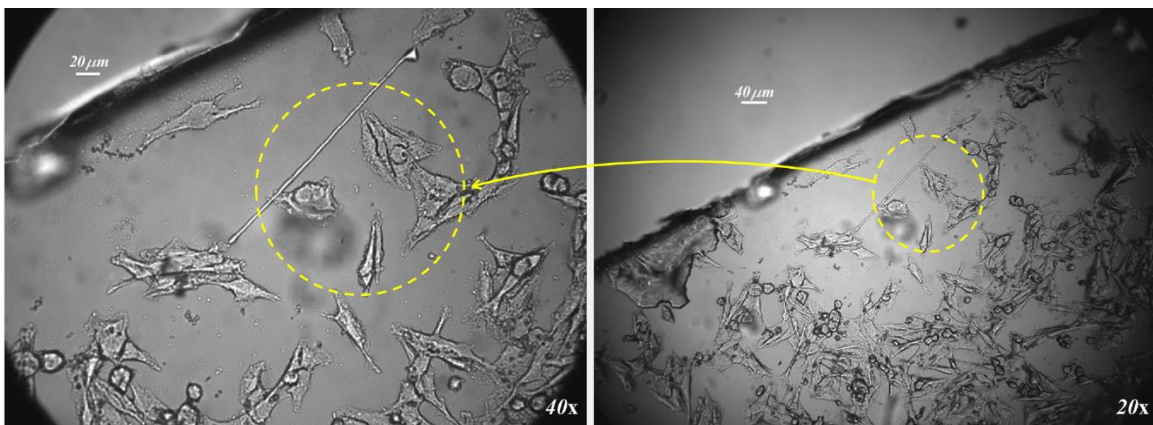


Figura 7. Detalle de algunas morfologías de la línea celular A375.

La célula I de este holograma reconstruido, y procesado se presenta en la Fig. 9, que corresponde a un detalle de su morfología 2D; así mismo, se pueden observar algunos puntos donde se indican sus correspondientes índices de refracción recuperados con el método propuesto.

Una vez recuperado el índice de refracción, se obtuvo el espesor, que permitió conocer la morfología mostrada en la Fig. 10(a). En trabajos realizados anteriormente con métodos similares, (ver Fig. 10(b)) también se encontró una morfología similar para la misma línea celular en células con una forma un poco más alargada [26]. Aunque la identificación de

organelos aún no se ha llevado a cabo, se presume que una o las dos crestas que en esta imagen se observan, podrían corresponder a un núcleo o dos núcleos [27]. Así mismo, en general, la morfología de la célula se asemeja a la vista en otros trabajos de líneas celulares similares o iguales [28], [29].

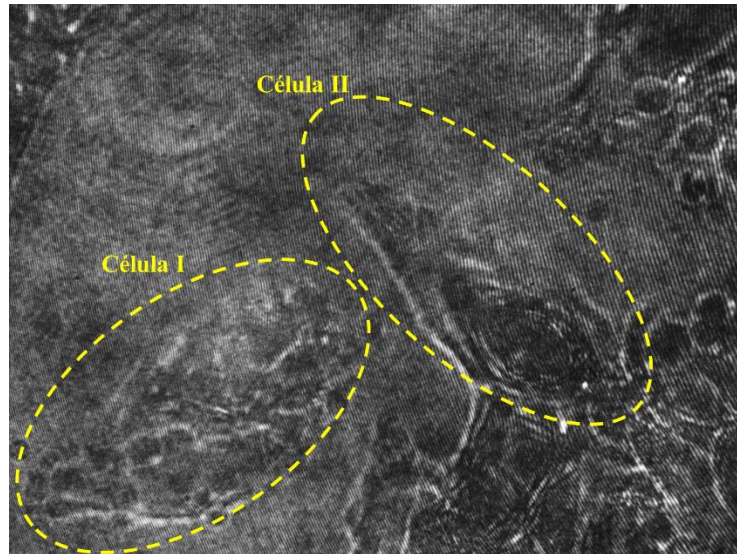


Figura 8. Holograma de la línea celular A375.

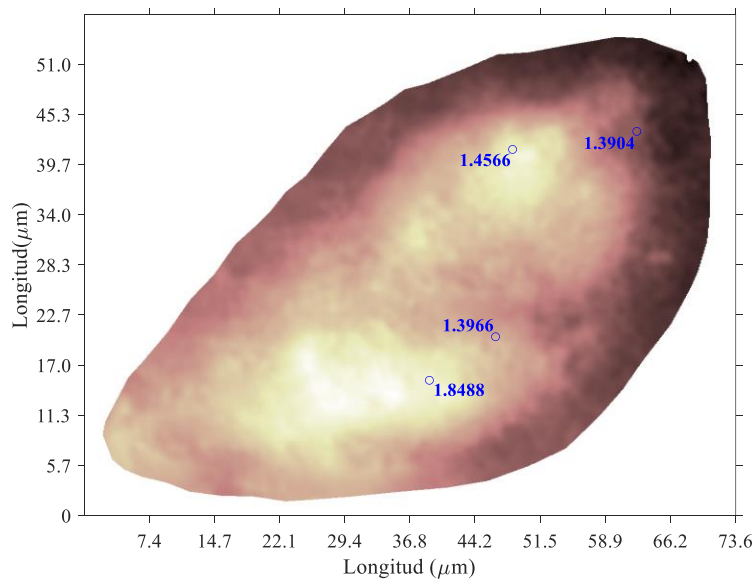


Figura 9. Holograma reconstruido de la línea celular A375, Célula I. Detalle de la morfología 2D y algunos de sus índices de refracción.

Analizando los valores recuperados de los índices de refracción de la muestra, se puede detallar que estos son más altos que el índice de refracción del agua, lo cual era de esperarse, ya que las muestras se encontraban secas y deshidratadas. En promedio, el índice de

refracción calculado arrojó un valor de  $n_p=1.5813$ ; para la misma línea celular, en el trabajo de Hejna et al. [30] se reporta un índice de refracción de 1.38. La diferencia entre estos valores se puede deber a la diferencia de protocolos de preparación.

La técnica propuesta permite recuperar el índice de refracción en distintas áreas de la muestra, lo cual indica que presenta el potencial para brindar información de identificación de algunas organelas celulares, especialmente, núcleo, nucleolo y citoplasma. Observando la Fig. 9, se encuentra que en zonas de mayor espesor, probablemente núcleo (como se mencionó previamente) corresponden a índices de refracción altos.

Para identificar organelas como lo han realizado otros autores [31], [32] y además comparar con valores reportados como los de Hejna et al. [30], se requiere realizar mediciones y análisis sobre un mayor número de variables y de muestras, con protocolos de preparación similares. Así mismo, tener una mayor población de muestras a medir con más de una variable, podría diferenciar el estado de una y otra célula de acuerdo con la existencia o no de algunas patologías. La importancia de realizar mediciones sobre un mayor número de muestras también radica en que no todas las células tienen la misma morfología, esto, en el caso de los melanocitos de la muestra que se trabajó fue muy notorio.

Aunque para ciertos propósitos es importante realizar mediciones en muestras sin deshidratar, también lo es en muestras deshidratadas como las que en este capítulo se trabajaron, ya que, de acuerdo con nuestra experiencia, presentaron ciertas ventajas como una conservación más duradera, lo que permitía realizar varias mediciones en el tiempo. Sin embargo, se requiere conocer más sobre su método de preparación para definir a partir de qué momento ya no son viables para realizar mediciones.

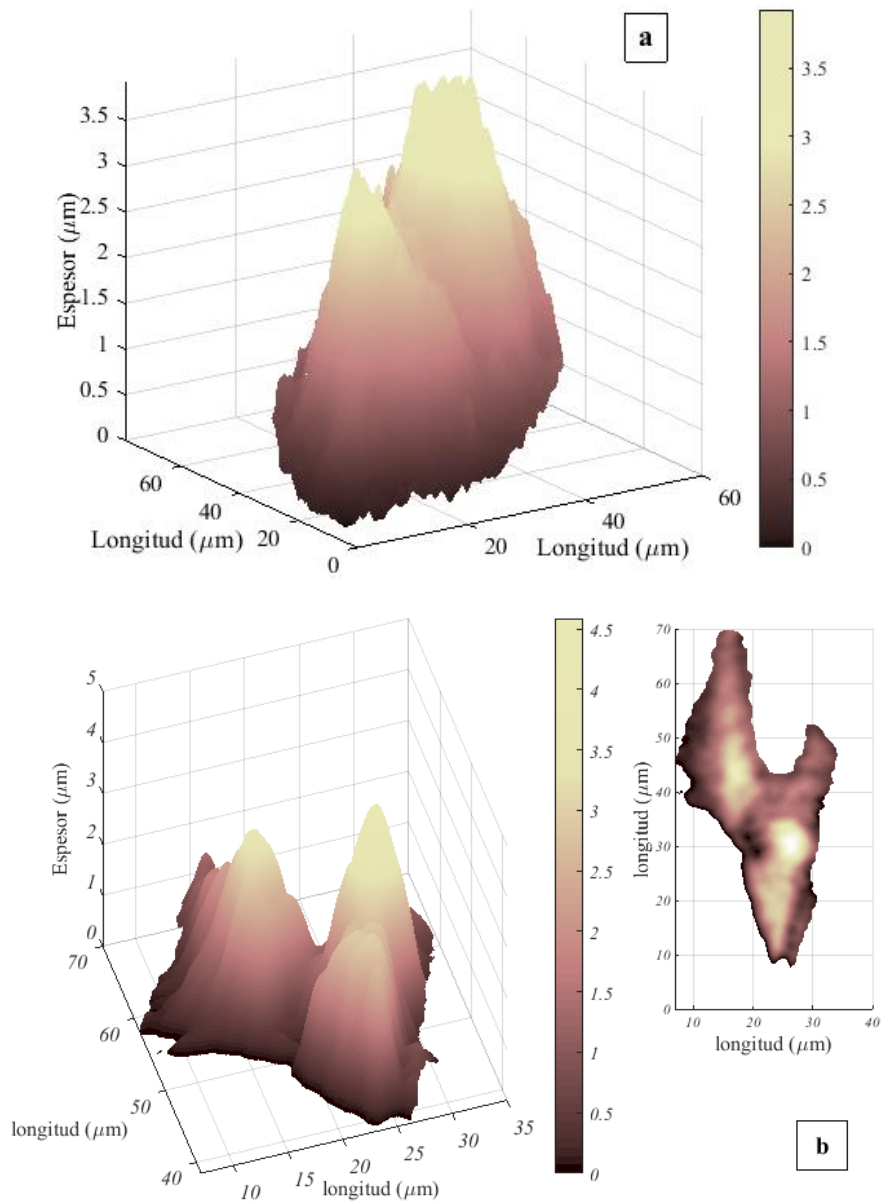


Figura 10. Holograma reconstruido de la línea celular A375, a) Célula I. Detalle de la morfología 3D. b) Célula reconstruida con un método similar [26].

Recapitulando, si la muestra fuese de índice de refracción y espesor constantes, la curva polinómica para cada píxel debería ser la misma. Debido a que la muestra de la línea celular presenta índices de refracción y espesores distintos, se espera que, a cada punto le corresponda una curva polinómica (Ec. 7) distinta. La Fig. 11 corresponde a una gráfica de la Ec. 7 Vs. índice de refracción, donde una de las dos raíces del polinomio es el índice de refracción de la muestra en determinado punto; en este caso, dicha raíz corresponde al punto con índice de refracción de 1.3904 de la Fig. 9; en la misma figura se detalla con un zoom la posición de dicha raíz. Esta gráfica fue posible de realizar reemplazando los valores



correspondientes a la fase  $\phi_1$  tanto en un ángulo nulo ( $0^\circ$ ) así como la fase  $\phi_2$  correspondiente a un ángulo de inclinación de  $\varphi=0.1^\circ$ .

De acuerdo con el método propuesto, cada píxel presenta una curva polinómica característica representada por la Ec. 7, la cual tiene por raíces dos números reales ( $n \leq 1$  y  $n > 1$ ). Matemáticamente ambos valores son correctos, sin embargo, se seleccionó la raíz del polinomio tal que el índice de refracción sea mayor que 1 ( $n > 1$ ), ya que todo el método fue propuesto a partir del comportamiento clásico que presenta un frente de onda al pasar de aire a otro material con un índice de refracción mayor.

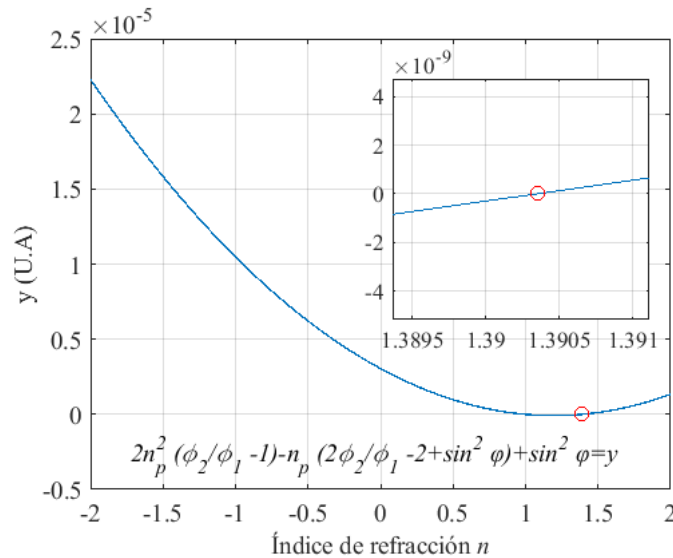


Figura 11. Gráfica del polinomio de la Ec. 7, para un único píxel correspondiente al índice de refracción de 1.3904 de la Fig. 9.

### 3.2.8. Análisis del método propuesto con una muestra conocida.

Se llevaron a cabo simulaciones del método propuesto en Matlab® introduciendo valores de inclinación de la muestra desde  $0^\circ$  hasta  $0.2^\circ$  con un paso de  $0.02^\circ$ . La muestra simulada consistió en un escalón de  $\text{SiO}_2$  de  $2\mu\text{m}$  e índice de refracción de 1.4760 de acuerdo con Gao et al. [33]. Las raíces calculadas para cada polinomio consisten en planos sobre los valores correspondientes al índice de refracción recuperado, esta simulación se puede apreciar en la Fig. 12, donde se detalla el valor teórico de 1.4760 y el índice de refracción desacoplado dependiendo del valor del ángulo de inclinación introducido. En esta figura es notorio que cuanto más alto el ángulo de inclinación, más se empieza a alejar el índice de refracción experimental del valor teórico, sin embargo, para estos datos simulados, sin ruido, este cambio es muy pequeño y se da hacia la sexta cifra decimal.

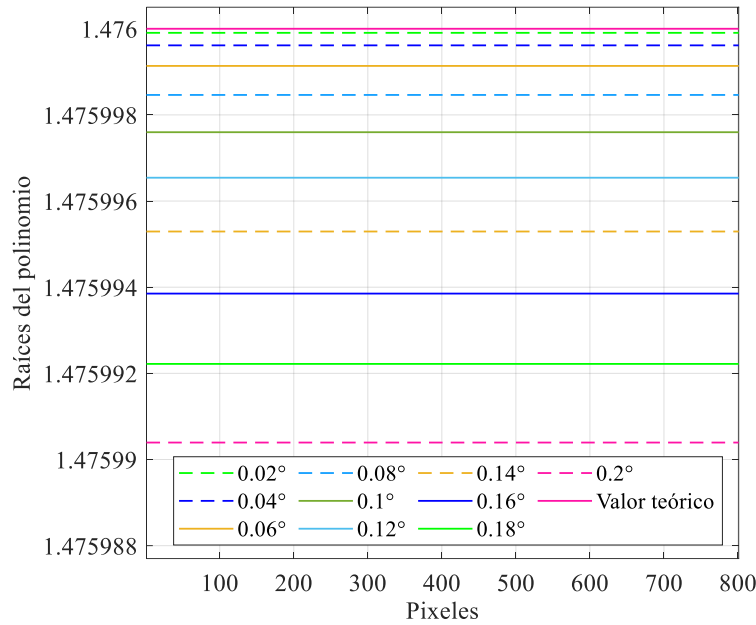


Figura 12. Simulación de la recuperación del índice de refracción con el método propuesto para una muestra conocida. Análisis sin ruido para distintos ángulos de inclinación ( $\varphi_2$ ).

Adicionalmente, se agregó un ruido blanco correspondiente al 1% de la señal de fase simulada; aplicando el método de recuperación de índice de refracción, se obtuvieron planos con valores de índices de refracción alrededor de 1. Estos resultados se pueden apreciar en la Fig. 13, que corresponden a una vista lateral, y son las raíces (índices de refracción) de cada polinomio para cada píxel, en estas imágenes se hace mucho más notorio el efecto del ruido.

En laboratorio se cuenta con una muestra igual a la simulada, la cual fue sometida a mediciones experimentales. Los resultados correspondientes se muestran en la Fig. 14. Los mapas de índice de refracción recuperados para esta muestra presentaron un comportamiento muy similar al de las simulaciones.

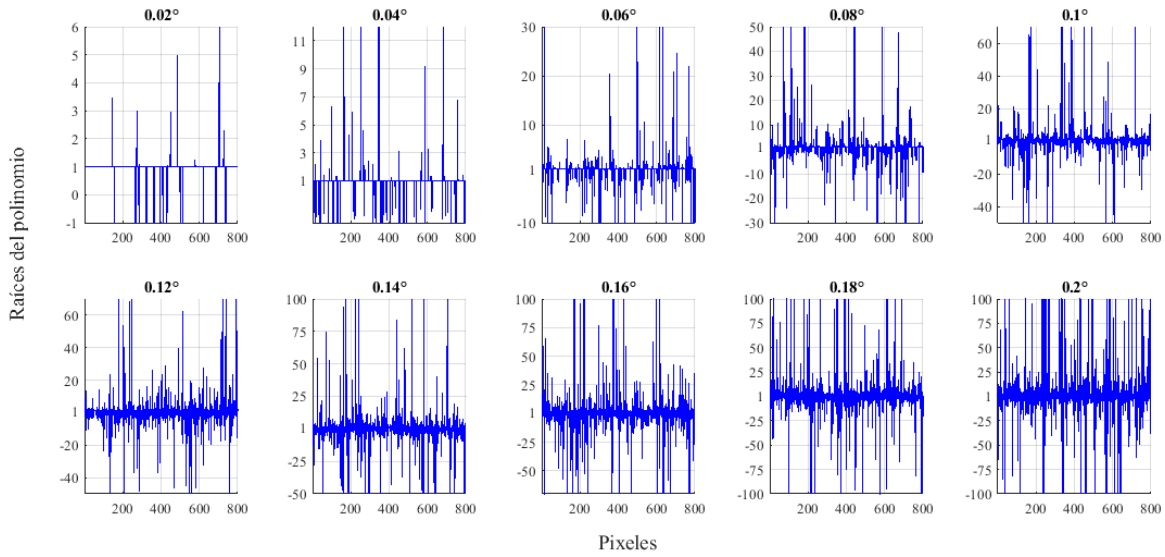


Figura 13. Simulación de la recuperación del índice de refracción con el método propuesto para una muestra conocida. Análisis con ruido para distintos ángulos de inclinación ( $\varphi_2$ ).

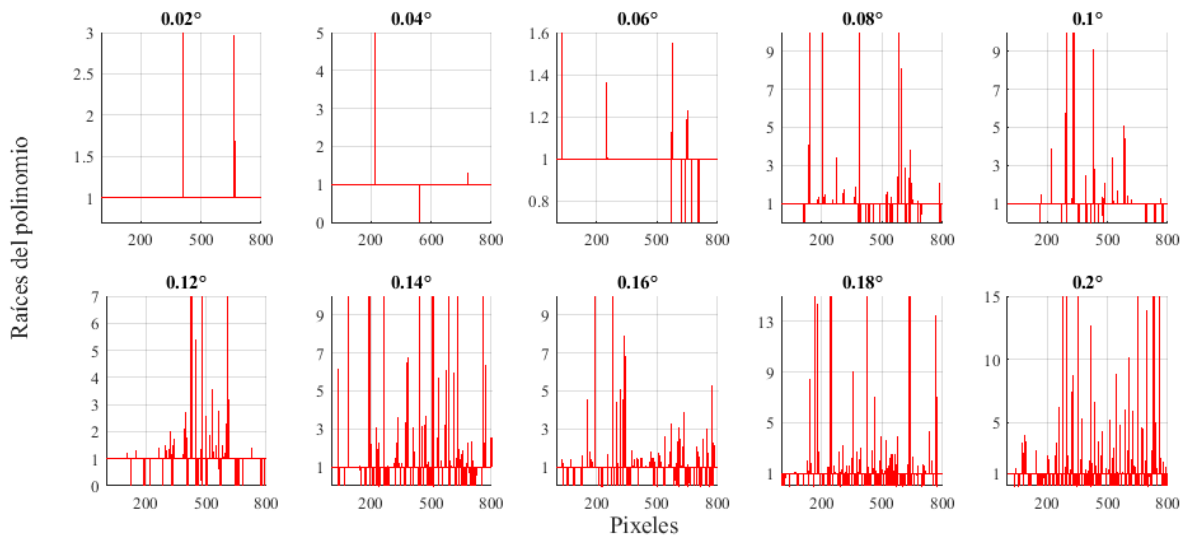


Figura 14. Valores experimentales de índice de refracción recuperado con el método propuesto para una muestra conocida. Análisis del ruido para distintos ángulos de inclinación ( $\varphi_2$ ).

Los índices de refracción recuperados tanto experimentalmente como simulados, se presentan en la Tabla 1, donde es notorio el comportamiento de la desviación estándar a medida que se incrementa el ángulo de inclinación introducido: la desviación estándar es menor para mayores ángulos, lo cual puede deberse a que se recuperaron más datos hacia estos valores. Para el ángulo de inclinación de  $0.02^\circ$  el índice de refracción no fue calculado debido a que no se recuperó suficiente información, lo cual también se presentó en los resultados experimentales para el ángulo de  $0.04^\circ$ .

El comportamiento de los índices de refracción promedio y sus correspondientes desviaciones estándar se pueden apreciar con mayor detalle en la Fig. 15, donde se encuentra

que, las desviaciones estándar para los valores experimentales son mucho mayores que para los valores simulados. Esto también se puede deber a que la cantidad de resultados recuperados en las simulaciones fueron mayores que en los otros.

Finalmente, también se calculó un porcentaje de error del índice de refracción promedio Vs. el teórico de 1.4760 [33], arrojando un valor de 2.1320% en el caso de los resultados experimentales y 5.6738% para los simulados.

**Tabla 1. Índice de refracción y desviación estándar para un escalón de SiO<sub>2</sub> de 2μm de espesor.**

Ángulo de inclinación $\varphi_2$	Datos Experimentales		Datos Simulados	
	Índice de refracción promedio	Desviación Estándar	Índice de refracción promedio	Desviación Estándar
0.04°	---	---	1.5081	0.0647
0.06°	1.4561	0.1346	1.5783	0.0364
0.08°	1.5295	0.0774	1.5230	0.0244
0.10°	1.5201	0.0871	1.5951	0.0204
0.12°	1.5268	0.0513	1.5598	0.0163
0.14°	1.6247	0.0599	1.5646	0.0152
0.16°	1.5299	0.0363	1.5716	0.0115
0.18°	1.5493	0.0310	1.5682	0.0116
0.20°	1.5189	0.0384	1.5692	0.0099
<b>Índice de refracción promedio:</b>	1.5075		1.5597	
<b>%error</b>	2.1320		5.6738	

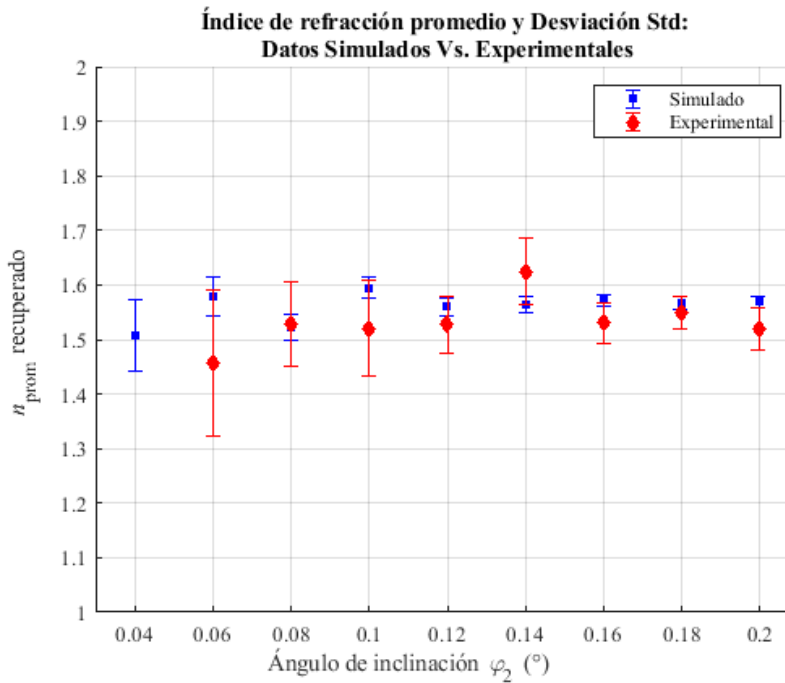


Figura 15. Índices de refracción promedio y desviaciones estándar para la muestra de SiO<sub>2</sub>

Analizando las Fig. 13 y Fig. 14, se observa que el método es altamente sensible al ruido, la cual deberá ser una variable para mejorar en futuras implementaciones; sin embargo, la recuperación de los datos de índice de refracción como un plano de valores alrededor de 1, además de las simulaciones que le respaldan, brinda a este método de desacoplamiento de índice de refracción y espesor un buen potencial para ser empleado con este fin.

Una de las mejoras que se podría implementar en el sistema es el de inclinar la muestra de forma automática, para evitar el error introducido al inclinarla manualmente; así como la introducción experimental y de simulación de ángulos mayores cuidando la distancia de trabajo del objetivo.

En el presente capítulo se realizó una breve descripción de los métodos que a nuestro conocimiento existen para el desacoplamiento del índice de refracción y espesor en muestras para configuraciones de microscopía holográfica digital. Se propuso un novedoso modelo matemático que fue implementado experimentalmente con una muestra conocida de un sustrato de SiO<sub>2</sub> depositado en un portaobjetos, se simuló en Matlab®, y se analizó su respuesta al ruido.

El método experimental y modelo matemático también fueron probados en la línea celular de melanoma A375, donde los resultados para esta muestra se encuentran dentro de los rangos esperados. Este trabajo de investigación fue publicado en el artículo: *Measurement of*

*morphology thickness and refractive index in a melanoma A375 cell line using digital holographic microscopy* [1]

En el siguiente Capítulo se presentará una segunda configuración de DHM, esta vez con dos longitudes de onda para la obtención de fase no envuelta en muestras de cortes de una biopsia de piel de mano diagnosticadas con la patología de queratoacantoma, de la cual se ha reportado que, dependiendo de su estado puede avanzar hacia un cáncer de células escamosas.

## Referencias.

1. N. Palacios-Ortega, M. del S. Hernández-Montes, F. Mendoza-Santoyo, and J. M. Flores-Moreno, "Measurement of morphology thickness and refractive index in a melanoma A375 cell line using digital holographic microscopy," *Appl. Opt.* **60**, 815 (2021).
2. G. Dardikman and N. T. Shaked, "Review on methods of solving the refractive index–thickness coupling problem in digital holographic microscopy of biological cells," *Opt. Commun.* **422**, 8–16 (2018).
3. G. Dardikman, Y. N. Nygate, I. Barnea, N. A. Turko, G. Singh, B. Javidi, and N. T. Shaked, "Integral refractive index imaging of flowing cell nuclei using quantitative phase microscopy combined with fluorescence microscopy," *Biomed. Opt. Express* **9**, (2018).
4. S. Kosmeier, B. Kemper, P. Langehanenberg, I. Bredebusch, J. Schnekenburger, A. Bauwens, and G. von Bally, "Determination of the integral refractive index of cells in suspension by digital holographic phase contrast microscopy," *Proc. SPIE* **6991**, 699110 (2008).
5. M. Schürmann, J. Scholze, P. Müller, C. J. Chan, A. E. Ekpenyong, K. J. Chalut, and J. Guck, "Chapter 9 - Refractive index measurements of single, spherical cells using digital holographic microscopy," in *Biophysical Methods in Cell Biology*, E. K. B. T.-M. in C. B. Paluch, ed. (Academic Press, 2015), Vol. 125, pp. 143–159.
6. N. Cardenas, N. Ingle, L. Yu, and S. Mohanty, "Development of a digital holographic microscopy system integrated with atomic force microscope," *Proc. SPIE* **7904**, 790409 (2011).
7. M. Baczewska, E. Skrzypek, D. Śladowski, and M. Kujawińska, "Feasibility study of investigation of skin at cellular level by digital holographic microscopy," *Proc. SPIE* **10834**, (2018).
8. N. Lue, W. Choi, G. Popescu, Z. Yaqoob, K. Badizadegan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Live cell refractometry using Hilbert phase microscopy and confocal reflectance microscopy," *J. Phys. Chem. A* **113**, 13327–13330 (2009).

9. J. Zhang, C. Ma, Y. Li, J. Di, T. Xi, and J. Zhao, "Simultaneous measurement of thickness and refractive index using spectrum multiplexing digital holographic microscopy," in *Imaging and Applied Optics Congress* (OSA, 2016).
10. J. Zhang, J. Di, T. Xi, and J. Zhao, "Dynamical measurement of refractive index distribution using digital holographic interferometry based on total internal reflection," *Opt. Express* **23**, (2015).
11. N. Lue, G. Popescu, T. Ikeda, R. R. Dasari, K. Badizadegan, and M. S. Feld, "Live cell refractometry using microfluidic devices," *Opt. Lett.* **31**, 2759–2761 (2006).
12. B. Rappaz, F. Charrière, T. Colomb, C. Depeursinge, P. J. Magistretti, and P. Marquet, "Simultaneous cell morphometry and refractive index measurement with dual-wavelength digital holographic microscopy," *Opt. Lett.* **33**, 744–746 (2008).
13. M. R. Jafarfard, S. Moon, B. Tayebi, and D. Y. Kim, "Dual-wavelength diffraction phase microscopy for simultaneous measurement of refractive index and thickness," *Opt. Lett.* **39**, 2908 (2014).
14. N. A. Turko and N. T. Shaked, "Erythrocyte volumetric measurements in imaging flow cytometry using simultaneous three-wavelength digital holographic microscopy," *Biomed. Opt. Express* **11**, 6649 (2020).
15. B. Rappaz, P. Marquet, E. Cuhe, Y. Emery, C. Depeursinge, and P. J. Magistretti, "Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy," *Opt. Express* **13**, 9361 (2005).
16. R. Pastrana-Sánchez, G. Rodríguez-Zurita, and J. Vazquez-Castillo, "Estimación simultánea de índice de refracción y de espesor de placas dieléctricas plano-paralelas contando franjas de interferencia: un caso para regresión generalizada," *Rev. Mex. Física* **45**, 623–628 (1999).
17. G. Rodríguez-Zurita, *Apuntes de Interferometría Óptica Contemporánea: Ideas Fundamentales* (2013).
18. K. Kim, H. Yoon, M. Diez-Silva, M. Dao, R. R. Dasari, and Y. Park, "High-resolution three-dimensional imaging of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and in situ hemozoin crystals using optical diffraction tomography," *J. Biomed. Opt.* **19**, (2013).
19. "Introduction to Cell Culture," <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>.
20. "A-375 [A375] ATCC ® CRL-1619™ *Homo sapiens* skin malignant melanoma," <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1619.aspx>.
21. M. Kasim, "2D Weighted Phase Unwrapping," [https://ww2.mathworks.cn/matlabcentral/fileexchange/60345-2d-weighted-phase-unwrapping?s\\_tid=FX\\_rc1\\_behav](https://ww2.mathworks.cn/matlabcentral/fileexchange/60345-2d-weighted-phase-unwrapping?s_tid=FX_rc1_behav).

22. D. C. Ghiglia and L. A. Romero, "Robust two-dimensional weighted and unweighted phase unwrapping that uses fast transforms and iterative methods," *J. Opt. Soc. Am. A* **11**, 107–117 (1994).
23. T. Colomb, J. Kühn, F. Charrière, C. Depeursinge, P. Marquet, and N. Aspert, "Total aberrations compensation in digital holographic microscopy with a reference conjugated hologram," *Opt. Express* **14**, 4300–4306 (2006).
24. M. Takeda, H. Ina, and S. Kobayashi, "Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computer-based topography and interferometry," *J. Opt. Soc. Am.* **72**, 156 (1982).
25. M. Servin, J. A. Quiroga, and M. Padilla, *Fringe Pattern Analysis for Optical Metrology: Theory, Algorithms, and Applications* (John Wiley & Sons, 2014).
26. N. Palacios-Ortega, F. Mendoza Santoyo, J. M. Flores Moreno, M. D. S. Hernández-Montes, M. H. De La Torre Ibarra, and G. Plascencia, "3D morphology of melanoma cells using digital holographic interferometry," in *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* (2019), Vol. 11102.
27. S. Tavaddod, B. Shojaedin-Givi, M. Mahmoudi-Rad, and H. Naderi-Manesh, "Morphometry and Modeling of Label-Free Human Melanocytes and Melanoma Cells," *Cell Biochem. Biophys.* **79**, 253–260 (2021).
28. A. Sobiepanek, M. Milner-Krawczyk, M. Lekka, and T. Kobiela, "AFM and QCM-D as tools for the distinction of melanoma cells with a different metastatic potential," *Biosens. Bioelectron.* **93**, 274–281 (2017).
29. M. Hejna, A. Jorapur, J. S. Song, and R. L. Judson, "Supplementary material: High accuracy label-free classification of single-cell kinetic states from holographic cytometry of human melanoma cells.," *Sci. Rep.* **7**, (2017).
30. M. Hejna, A. Jorapur, J. S. Song, and R. L. Judson, "High accuracy label-free classification of single-cell kinetic states from holographic cytometry of human melanoma cells," *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
31. A. Kus, W. Krauze, and M. Kujawinska, "Active limited-angle tomographic phase microscope," *J. Biomed. Opt.* **20**, 111216 (2015).
32. W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, S. Oh, N. Lue, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Tomographic phase microscopy," *Nat. Methods* **4**, 717–719 (2007).
33. L. Gao, R. Lemarchand, and M. Lequime, "Refractive index determination of SiO<sub>2</sub> layer in the UV/Vis/NIR range: Spectrophotometric reverse engineering on single and bi-layer designs," *J. Eur. Opt. Soc.* **8**, 13010 (2013).



## Capítulo 4.

### Microscopía Holográfica Digital con doble longitud de onda para el análisis de muestras de queratoacantoma.

Como se describió en capítulos previos, son variadas las aplicaciones de la microscopía holográfica digital; así como las mejoras que se le han implementado a esta técnica: desacoplar el índice de refracción y el espesor es una de ellas. Lo anterior despliega todo un abanico de posibilidades, ya que permite conocer variables que se pueden emplear en un grupo de características para diferenciar estados celulares, avanzar en la identificación de algunas patologías, entre otros.

La técnica de DHM a doble longitud de onda, además de ser usada para el desacoplamiento entre el índice de refracción y espesor también ofrece la posibilidad de obtener imágenes de fase no envueltas, gracias al método conocido como OPU (Optical Phase Unwrapping) [1], en español: Desenvolvimiento Óptico de Fase. Este método se fundamenta en el principio bajo el cual la fase envuelta es producto del tamaño del objeto analizado Vs. la longitud de onda ( $\lambda$ ) empleada: a mayor espesor del objeto comparable con  $\lambda$ , la fase del holograma será envuelta. El uso de más de una longitud de onda permite obtener una longitud de onda sintética, la cual será mayor que las originales y de tamaño comparable al objeto del holograma registrado, obteniéndose así una fase no envuelta, sin necesidad de aplicar algoritmos de desenvolvimiento.

Antes de emplearse las dos longitudes de onda en arreglos de holografía digital para desenvolver ópticamente la fase, en sus inicios, esta técnica fue usada principalmente para ampliar el rango de medición. Algunos arreglos buscaban realizar mediciones sobre superficies esféricas, donde el registro lo realizaban con una longitud de onda y la reconstrucción con la segunda [2], en otros trabajos, el registro lo realizaban en cristales

fotorrefractivos para la medición sobre lentes oftálmicas [3]. De acuerdo con Kreis [4] y Polhemus [5], el patrón de franjas generado a partir de la reconstrucción con la segunda longitud de onda, es un patrón tipo moirè.

En este último capítulo, se describirá la técnica del desenvolvimiento óptico, y el arreglo experimental que se configuró para realizar mediciones sobre muestras de tejido proveniente de una biopsia de piel de un paciente diagnosticado con queratoacantoma.

El queratoacantoma es una patología que ha presentado cierta controversia, ya que, para algunos especialistas debe ser clasificada como un cáncer de células escamosas de bajo grado, mientras que para otros es un tumor benigno que puede progresar hacia un SCC (SCC por su sigla en inglés: Squamous Cell Carcinoma).

Con la técnica de desenvolvimiento óptico aplicado a las muestras de queratoacantoma, se obtendrán imágenes de fase no envuelta, correspondientes a las capas de estrato córneo, estrato basal y estrato espinoso de la epidermis. Además del detalle de algunas lesiones típicas a nivel celular de la patología de interés.

Al final, se presentarán mediciones de espesor y longitudes aplicadas a las imágenes de fase con sus correspondientes estadísticas y se correlacionarán con el estado de presencia o no de lesión en las muestras.

#### 4.1. Desenvolvimiento Óptico de Fase.

En un sistema de DHM, en la etapa de la reconstrucción de los hologramas, se habla de la recuperación de fase y amplitud del objeto registrado. Respecto de la información de fase, se pueden extraer el índice de refracción y espesor de las muestras analizadas.

Dependiendo de las características de la longitud de onda del arreglo de DHM, la fase se puede recuperar, inicialmente, de forma envuelta o desenvuelta; lo cual significa que la información se encuentra entre valores periódicos que van desde  $-\pi$  hasta  $\pi$ . Dondequiera que el espesor sea un múltiplo de la longitud de onda, se verá representado en los mapas de fase como discontinuidades de  $2\pi$  [6].

Varios autores se han ocupado del problema de desenvolver la fase, especialmente a partir de algoritmos de programación; el principio básico en estos algoritmos es encontrar las regiones donde se generan los saltos de fase. Existen diversas variantes y mejoras de los mismos, el análisis de la derivada local en dichas regiones, el seguimiento de un camino de acuerdo a la potencia en la imagen, entre otros [7], [8]. Este proceso requiere cuidado, ya que en algunas ocasiones los algoritmos pueden entregar información que no corresponde a

la fase esperada del objeto analizado; sin contar el tiempo computacional que se puede llegar a necesitar.

Un arreglo de DHM donde la longitud de onda sea mayor o comparable al espesor de la muestra brinda la ventaja de obtener la fase no envuelta sin necesidad de aplicar algoritmos de desenvolvimiento, sin embargo, contar con un sistema donde la longitud de onda del láser corresponda al tamaño de la muestra, no siempre es posible: es ahí donde el desenvolvimiento óptico se hace útil.

La técnica, consiste en la generación de una longitud de onda sintética ( $\Lambda$ ), a partir de dos y hasta tres longitudes de onda [9]. Dicha longitud de onda sintética es mayor que las dos que la generaron, lo cual implica que el rango libre de discontinuidades será mayor [6] que con una única longitud de onda de menor valor. Para un arreglo de DHM con dos fuentes de longitudes de onda  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  que generan a su vez dos mapas de fase envuelta:  $\Delta\phi_1$  y  $\Delta\phi_2$  respectivamente, la longitud de onda sintética está dada por:

$$\Lambda = \frac{\lambda_1 \lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1} \quad (1)$$

Con mapa de fase desenvuelta ópticamente ( $\Phi$ ):

$$\Phi = \Delta\phi_1 - \Delta\phi_2 \quad (2)$$

El ruido es un elemento clave para tener en cuenta en esta técnica; ya que se está realizando una resta (o suma) de dos mapas de fase, que, además ya acarrean la típica información de ruido, al realizar la operación de resta, este ruido se verá amplificado. Algunos autores se han encargado de implementar soluciones para resolver o reducir este efecto [6].

Otro factor al que se recomienda prestar atención, es, que al capturar los hologramas de forma simultánea, la disposición ideal de los elementos deberá ser tal que permita que las franjas de interferencia sean ortogonales entre sí, lográndose una repartición óptima de los lóbulos en el espacio de frecuencias, evitándose que se traslapen para una y otra longitud de onda [10]; más adelante, en la implementación experimental del método se explicará cómo se logró una configuración cercana a esta.

La técnica no sólo ha sido aplicada en elementos como tarjetas USAF, escalones y similares [11], sino también en muestras biológicas como la línea celular SKOV-3 correspondiente a cáncer de ovario [12], y en muestras porosas de carbón [13], en estos trabajos además realizan una comparación del método con los algoritmos de desenvolvimiento de fase.

## 4.2. Captura y reconstrucción de hologramas de muestras de tejido de biopsia de piel.

### 4.2.1. Preparación del tejido analizado bajo la técnica del desenvolvimiento óptico de fase.

La muestra observada bajo la técnica de desenvolvimiento óptico consistió en la biopsia extraída de la piel de la mano izquierda de un paciente masculino, de 91 años, previamente diagnosticado con queratoacantoma.

Esta biopsia fue llevada con un anatomopatólogo, este especialista observó las muestras al microscopio y diagnosticó un queratoacantoma o carcinoma epidermoide bien diferenciado, es decir, un cáncer de células escamosas. El anatomopatólogo clasificó las muestras en dos grupos: con lesión y sin lesión.

De acuerdo con nuestro conocimiento, las muestras fueron preparadas bajo el siguiente protocolo:

- Fijación

Se realiza por medio de agentes conocidos como fijadores, el más común es el formol o formalina. Este paso busca detener la vida de las células e impedir modificaciones post-mortem que pueda sufrir la célula [14], matar microorganismos patógenos como bacterias, hongos y virus, y generar dureza a los tejidos [15].

- Lavado

Se emplea agua o alcohol, la finalidad de esta etapa es eliminar el fijador de las muestras. De esta forma, se evita que la muestra se endurezca demasiado o que algunos componentes del fijador introduzcan modificaciones en los tejidos, impidiendo un adecuado corte o tinción [14].

- Inclusión

Con este paso se busca brindar una dureza adicional a la muestra para realizar los cortes adecuados con el microtomo en la siguiente etapa. Las sustancias de inclusión se incorporan y filtran al interior de las células, brindándoles soporte. De esta forma, tanto la sustancia de inclusión como el tejido forman un bloque homogéneo de consistencia y dureza [14]. La inclusión consiste en: Deshidratación, Aclarado e Inclusión en parafina.

En la deshidratación se extrae el agua de los tejidos fijados aplicando alcohol en series de concentración ascendente hasta llegar al 100%. El aclarado busca eliminar el alcohol antes

de la inclusión, (ya que la parafina no es soluble en alcohol); esto por lo general se realiza con xilol o toluol [15].

Finalmente, se forman bloques de parafina en moldes donde se vierte este material caliente puro, se toma una pieza del tejido y se sumerge al interior del molde aplicando una leve presión [14].

- **Microtomía**

Cuando el bloque de parafina se encuentra frío y endurecido, es llevado a un microtomo, que consiste en una máquina que realiza cortes muy delgados que son montados en portaobjetos con resinas acrílicas como adhesivo [15].

Por lo general, después de este paso se continúa con la tinción, de la cual, su objetivo es mostrar determinados componentes de la muestra histológica. Las tinciones más comunes se basan en la química de ácidos y bases; por ejemplo, la eosina, que es un ácido (carga neta negativa en su porción coloreada), reacciona con los grupos catiónicos presentes en células y tejidos (eosinofílicos). En el caso de la hematoxilina, que tiene propiedades cercanas a una base (carga neta positiva en su porción coloreada), reacciona con los componentes celulares de tipo aniónico (basofílicos [16]) [15].

Un total de cuatro muestras: dos con lesión y dos sin lesión fueron llevadas al arreglo de DHM así como a un microscopio comercial Leica, donde se identificaron y registraron 69 hologramas para las dos muestras con lesión y 49 en el caso de las muestras sin lesión. La discriminación de estos hologramas y regiones se detallará más adelante.

#### 4.2.1.1. Queratoacantoma.

El queratoacantoma es un tumor de bajo grado que se inicia en los folículos capilares, y que tiene diversas variantes, de las cuales la más común se genera en áreas del cuerpo expuestas al sol en pacientes de edad avanzada. Esta variante es conocida como queratoacantoma solitario, la cual, para algunos autores clasifica como cáncer de células escamosas de bajo grado, debido a que han reportado casos con características de comportamiento biológico maligno como metástasis o muerte tumoral. Para otros autores, el queratoacantoma es una lesión benigna que se puede transformar en un cáncer de células escamosas [17].

En el trabajo de Takai [17], se presentan las características histopatológicas del queratoacantoma, haciéndose énfasis, entre otras a: lóbulos con células alargadas de color rosa pálido que carecen de atipia nuclear, lóbulos compuestos por células alargadas de color pálido con aspecto eosinofílico y con algunas capas de células basofílicas en su periferia,

posible atipia nuclear limitada a células basofílicas de la periferia y bordes mínimamente infiltrados (ver Fig. 1).

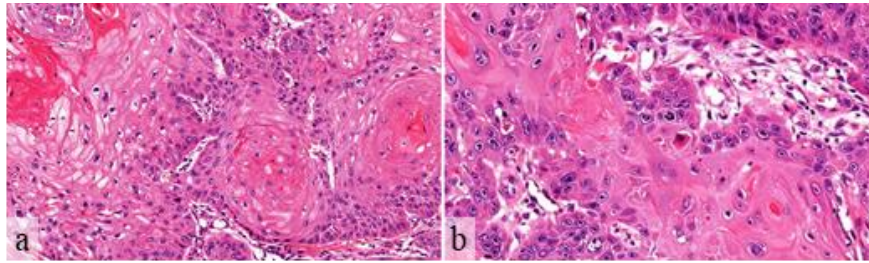


Figura 1. (a) Lóbulos con células alargadas de color rosa pálido que carecen de atipia nuclear. (b) Atipia nuclear limitada a células basofílicas de la periferia. Imagen tomada de: Takai [17].

#### 4.2.2. Arreglo experimental de DHM para el desenvolvimiento óptico.

En laboratorio se configuró un sistema para el desenvolvimiento óptico a partir del sistema DHM con el que ya se contaba para una longitud de onda. Para esto, se agregó una segunda longitud de onda de 532nm. El arreglo experimental se muestra en la Fig. 2. En este, el láser de 532nm, que se encuentra en la mesa holográfica contigua, es dirigido por medio del divisor de haz BS2 y espejos M3 y M4 hacia el divisor de haz, BS3 que se encarga de dividir en haz objeto y referencia. El primero es reflejado hacia la muestra por medio de un filtro dicroico (DF) que refleja longitudes de onda hacia el verde y transmite las del rojo, permitiendo así que el arreglo con la longitud de onda original, de 638nm continúe funcionando. El haz referencia se dirige por medio de un espejo M5 hacia el divisor de haz BS4 donde se recombina con el haz objeto; para finalmente pasar por transmisión por el divisor de haz BS5 del arreglo original.

La importancia de este arreglo radica en dos elementos: el filtro dicroico (DF) y la disposición del divisor de haz BS4, el cual, como se puede notar se encuentra a  $90^\circ$  respecto al divisor de haz BS5. Esto permite diferenciar las franjas a 532nm de las de 638nm como se verá más adelante en la disposición de los interferogramas simultáneos, así como en sus correspondientes 4 lóbulos de la transformada de Fourier. Adicionalmente, los tres objetivos de microscopio: MO1, MO2 y MO3 son de igual magnificación con las mismas características, para generar frentes de onda iguales tanto en el haz objeto como haz referencia. El arreglo presentado en la Fig. 2 no sólo tiene la capacidad de generar interferogramas de los cuales se recuperará la fase no envuelta, sino también permitirá, a futuro, realizar medición simultánea de índice de refracción y espesor en muestras.

En la Fig. 3 se puede apreciar una fotografía del arreglo tomada en el laboratorio con los componentes mencionados.

Con el arreglo experimental de 532nm y 638nm, la longitud de onda sintética, obtenida a partir de la Ec. 1 es de  $3.2\mu\text{m}$ ; la potencia configurada para cada láser fue de 30mW.

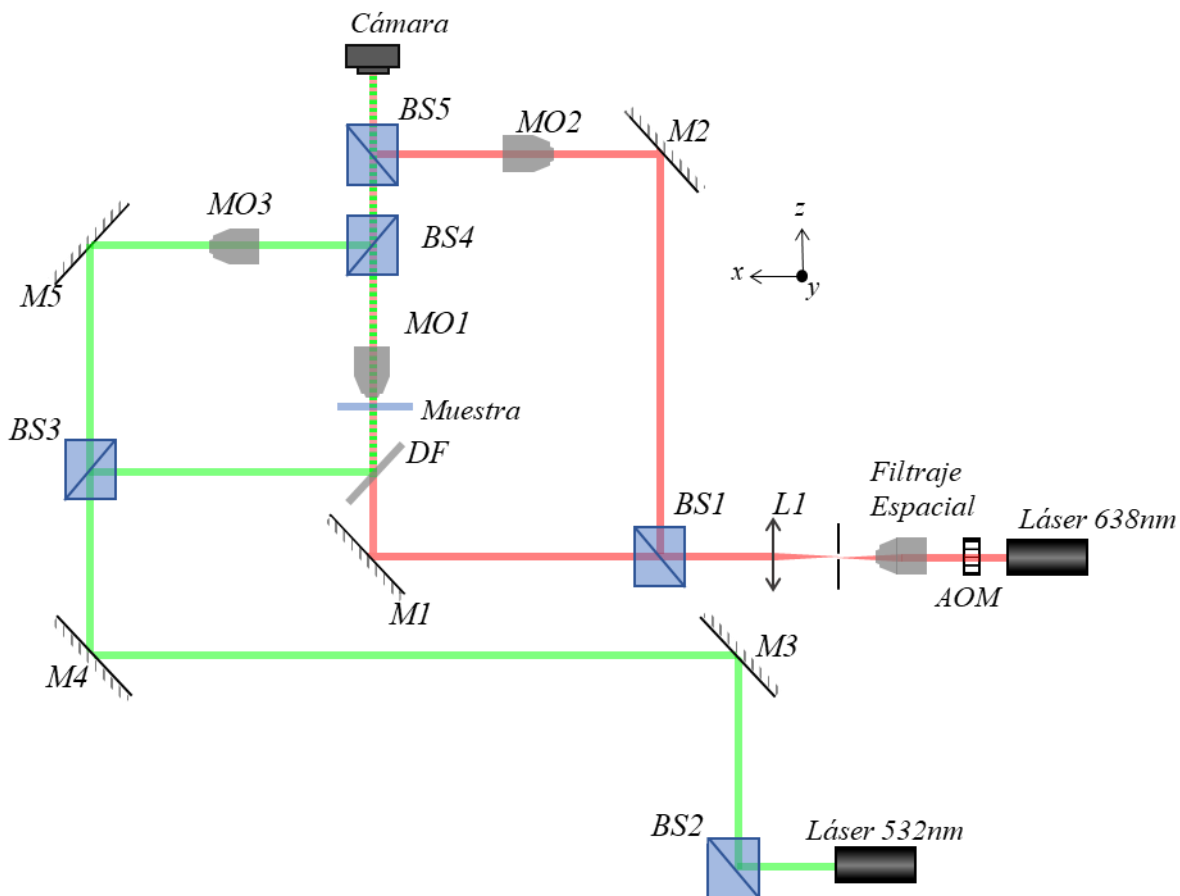


Figura 2. Arreglo experimental para el registro de hologramas a doble longitud de onda de forma simultánea.



Figura 3. Fotografía del arreglo experimental en laboratorio para la técnica de OPU.

#### 4.2.3. Metodología para registrar hologramas de forma simultánea a doble longitud de onda.

Las muestras entregadas por el patólogo se observaron inicialmente en un microscopio comercial marca Leica, esto para poder detallarlas con distintas magnificaciones y así ver qué capas de la epidermis se podrían identificar y algunas de las lesiones características de la patología diagnosticada. En este paso, se reconocieron sobre todo el estrato córneo, estrato espinoso y una parte de estrato basal; además de los lóbulos característicos del queratoacantoma. Se distinguió también una parte de la dermis, sin embargo, no fue muy clara.

Conocer e identificar tanto las capas de piel, así como posibles lesiones a nivel microscópico es un trabajo de experticia de patólogos que conlleva tiempo, experiencia y requiere conocer a profundidad el tejido, su contenido y las lesiones propias de cada patología. Este trabajo muestra solo un acercamiento a la patología en cuestión y el análisis de esta bajo la técnica de DHM.

Con la identificación de las regiones de interés a observar (epidermis principalmente), las muestras fueron llevadas al arreglo de DHM. El procedimiento que se llevó a cabo para el registro de hologramas se muestra en la Fig. 4.

- I. Preparación y localización: refiere al ajuste previo de todo el sistema DHM, preparar la muestra a analizar y localizar la región de interés en el microscopio comercial. Una vez identificada dicha región, se puede llevar al microscopio holográfico para observar y enfocar la muestra con luz blanca, y así ubicar la región de interés. En este paso, bien se pueden identificar capas de la epidermis e incluso lesiones sobre la misma; la ubicación de esta zona en  $x,y$  debe ser guardada, lo cual es posible gracias a la interfaz de la bandeja motorizada que tiene el equipo y permite retornar a esta región y otras dentro de la misma muestra sin perder la localización. Después se ubica una zona donde no se observen células sobre el mismo portaobjetos de la muestra para ser usada como referencia, su posición  $x,y$  también deberá ser guardada.
- II. Registro de hologramas: con la referencia ubicada en  $x,y$  se registra el holograma correspondiente a esta, a continuación, se ubica en  $x,y$  la zona de interés (lesión o alguna capa epidérmica) y se registra el holograma objeto. En caso de que se haya identificado más de una zona de interés, también se registra su holograma.
- III. El último paso consiste en reconstruir los hologramas. Ya que están registrados simultáneamente para cada longitud de onda, se separarán al ser reconstruidos por medio del algoritmo de espectro angular; al final, se aplica el holograma de



referencia. Con los mapas de fase envueltos correspondientes para cada longitud de onda, se realiza una resta entre ambos para obtener el mapa de fase no envuelta definido por la Ec. 2. A continuación, se agrega  $2\pi$  a aquellos pixeles donde la fase sea menor a cero; hasta este punto, se deben ir obteniendo zonas donde la fase se detalle desenvuelta, además de algunas donde el ruido es notorio. Como paso final, se realiza un filtraje.

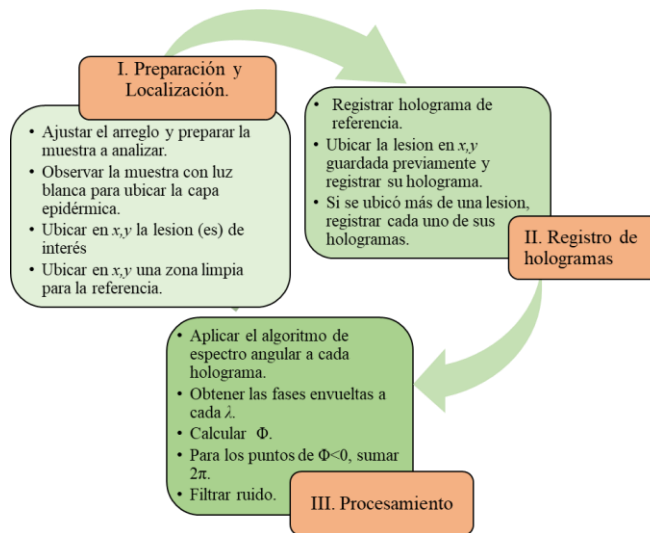


Figura 4. Método paso a paso para registrar y reconstruir hologramas con doble longitud de onda simultáneamente.

#### 4.2.4. Resultados.

Con el fin de mostrar el detalle de un holograma registrado a doble longitud de onda simultáneamente, en la Fig. 5 se presenta un holograma para una muestra de prueba (Fig. 5. a), donde se pueden observar las franjas que se entrecruzan, correspondientes a 532nm y 638nm (ampliación sobre la Fig. 5(b)) y su respectiva transformada de Fourier, con cuatro lóbulos, dos para cada longitud de onda.

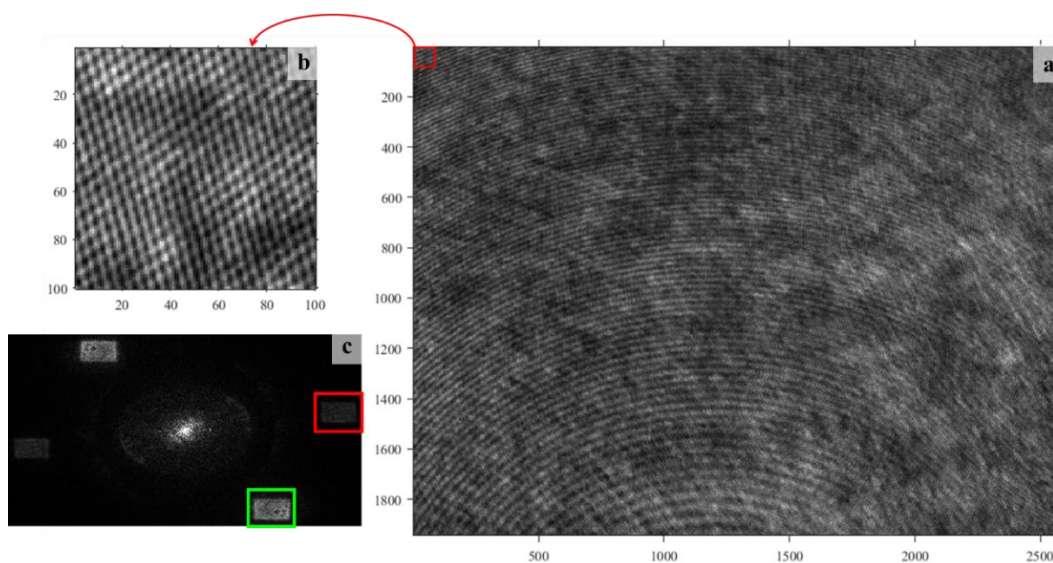


Figura 5. Holograma registrado para una muestra de prueba (a), detalle de las franjas entrecruzadas para ambas longitudes de onda (b), transformada de Fourier correspondiente a las franjas simultáneas a 532nm y 638nm (c).

Una vez procesados los hologramas capturados, se clasificaron aquellos de los cuales se logró recuperar información de fase correspondiente a la capa córnea (SC), a los queratinocitos de las capas basal (SB) y espinosa (SS), así como a algunos lóbulos en las muestras con lesión. Para llegar a este punto, en el registro de las muestras se realizó una selección detallada de las zonas que podrían ser útiles para la medición y análisis de parámetros como: espesor máximo, espesor promedio, y longitud transversal. El proceso de esta selección se describe en el esquema de la Fig. 6 y consistió en los siguientes pasos:

La cantidad de muestras fueron dos para aquellas que estaban clasificadas con lesión y dos sin lesión; a continuación, se registraron hologramas para todas las muestras de acuerdo con las zonas o regiones de interés que fueron identificadas en cada muestra: en total fueron 69 zonas de interés para las muestras con lesión y 49 sin lesión. Para cada región se registraron 50 hologramas. Dichas regiones o zonas fueron identificadas de acuerdo con un estudio previo de muestras similares en textos de patología e histología, permitiendo así registrar

hologramas de regiones principalmente sobre capas de la epidermis, incluyendo: zonas de estrato basal y espinoso con el detalle de algunas células, zonas de estrato córneo y zonas donde se identificaron algunos lóbulos.

Una vez registrados los hologramas para todas las zonas de interés, se procedió a llevar a cabo la reconstrucción digital. En este paso, se identificaron zonas que servirían para extraer la información de interés a medir. Estas zonas fueron seleccionadas en las imágenes de fase reconstruidas con poco ruido y que además permitieran identificar algunas capas de la epidermis. La cantidad de zonas que se recuperaron para este paso fueron 37 para las muestras con lesión y 22 para las muestras sin lesión, esto es, de acuerdo a la cantidad de hologramas capturados por región fueron 37x50 y 22x50. Capturar más de un holograma por región es importante, ya que así durante la etapa de procesamiento se puede llevar a cabo una etapa de promediado de los 50 hologramas para cada región.

Para las 37 regiones seleccionadas en las muestras con lesión, se lograron reconstruir 17 regiones con células de estrato basal (SB) y estrato espinoso (SS) identificables a 638nm, 15 regiones con las mismas células identificables a 532nm, 16 regiones con estrato córneo a 3.2µm y 6 con lóbulos a la misma longitud de onda. Para las 22 regiones recuperadas en la muestra con lesión, la identificación de estas características fue menor: 6 a 638nm y 14 a 532nm en SB y SS, y 8 regiones de estrato córneo a 3.2µm.

La cantidad de datos medidos en cada una de las regiones de la etapa previa también se describen en la parte inferior del esquema de la Fig. 6. De esta forma, se obtuvieron la cantidad de medidas que se resumen en la Tabla 1.

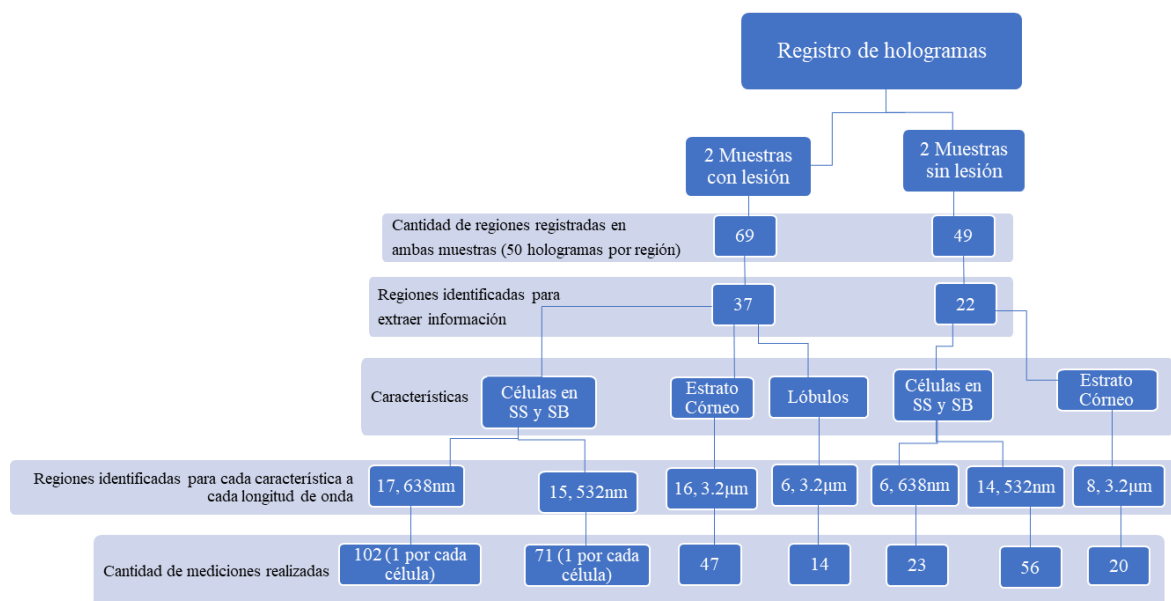


Figura 6. Mapa con el detalle del registro de hologramas, muestras, regiones y cantidad de mediciones realizadas.

**Tabla 1. Datos procesados para las muestras de biopsia de piel.**

Detalle/Tipo de muestra	Muestra con lesión			Muestra sin lesión		
	532nm	638nm	3.2 $\mu$ m	532nm	638nm	3.2 $\mu$ m
Queratinocitos en SB y SS	71	102	--	56	23	--
Estrato córneo (SC)	--	--	47	--	--	20
Lóbulos	--	--	14	--	--	--

Para los hologramas procesados, se realizaron mediciones de espesor y longitud. La fase, así como las imágenes vistas con luz blanca tipo LED en el mismo arreglo experimental para algunas de las muestras se presenta a continuación.

En la Fig. 7 se aprecia la capa de estrato córneo para una muestra con lesión vista con una fuente de luz tipo LED y sus correspondientes imágenes de fase envueltas para cada láser; los resultados de fase no envuelta con la técnica de desenvolvimiento óptico se enseñan en la Fig. 8, donde se tomaron algunas regiones para presentar sus correspondientes perfiles de fase recuperada. En la imagen de fase también se pueden detallar algunas regiones remanentes de fase envuelta, lo cual indica zonas de tamaños mayores a los de la longitud de onda sintética o también ruido, el cual, hasta el momento no ha sido procesado.

La identificación de la capa de estrato córneo que se observa en la Fig. 7 se realizó por medio de un entrenamiento corto que consistió en estudio y análisis con imágenes de epidermis vistas en textos y bases de datos de histología y patología. Dichas imágenes son similares a las presentadas previamente, en el capítulo 2.

Una vez realizado este estudio, se observaron las muestras en un microscopio comercial Leica, para después ser llevadas al microscopio holográfico, donde se observaron tanto con luz LED como con sus fuentes de luz láser. De esta forma, se realizaron comparaciones de lo observado en la bibliografía y en los arreglos. Gracias a estos pasos de observación y análisis, se identificó la capa epidérmica que se estaba observando. El mismo procedimiento se llevó a cabo para las células de las Fig. 9(a), 10(a), 11(a), y 12(a).

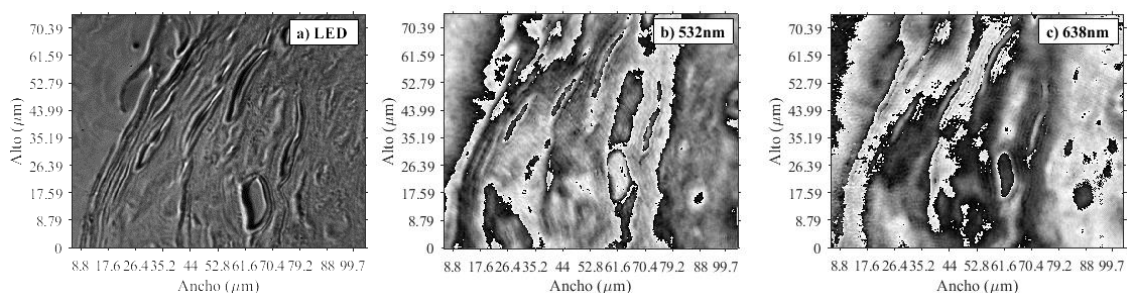


Figura 7. Estrato córneo correspondiente a una muestra con lesión: (a) Iluminada con luz LED, Imagen de fase envuelta recuperada a 532nm (b) y a 638nm (c).

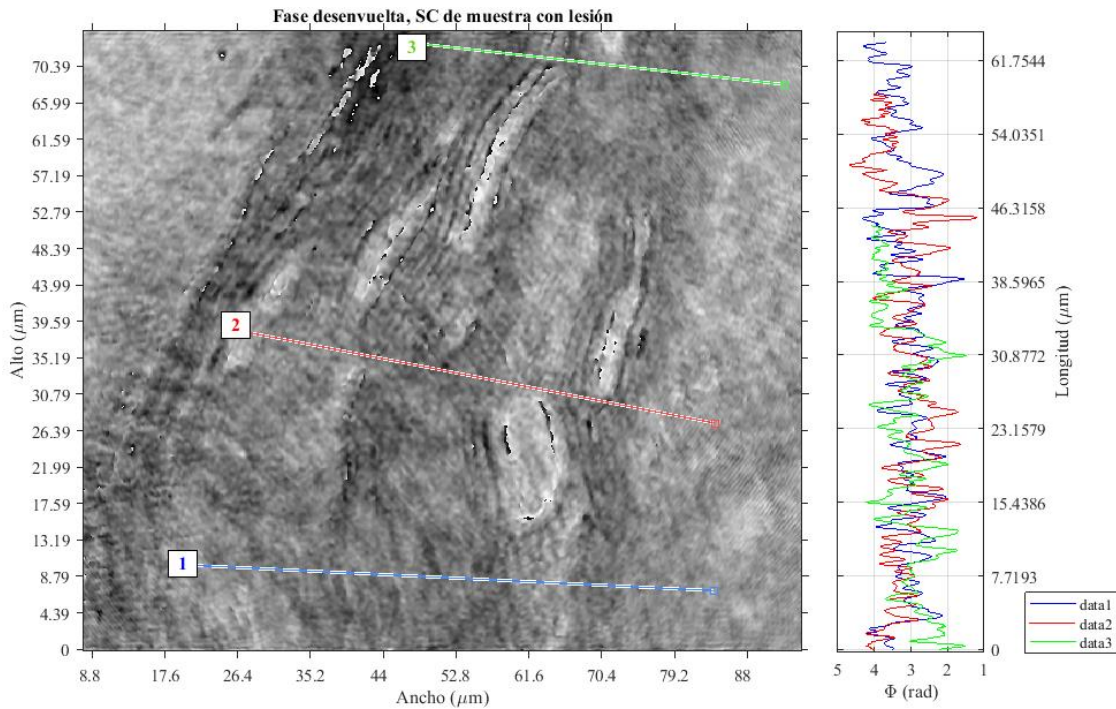


Figura 8. Estrato córneo correspondiente a una muestra con lesión, fase desenvuelta obtenida por desvolvimiento óptico, detalle de algunas zonas de interés y sus perfiles de fase.

A continuación, en las Figuras 9 y 10 se pueden apreciar los queratinocitos observados con los láseres de 638nm y 532nm. En estas imágenes no se aplicó el método de desvolvimiento óptico, ya que, debido al espesor de las células, la fase se obtuvo directamente desenvuelta, especialmente para la longitud de onda mayor de 638nm.

En las imágenes de las Figuras 9 y 10 se puede apreciar que la morfología de las células no es homogénea, lo cual además puede indicar que se estarían observando células en las capas espinosa y basal. Esto debido a las morfologías identificadas en las imágenes: ovaladas y pequeñas para estrato basal, y un poco más redondas y grandes en estrato espinoso, además de diferenciación de las características espinas en esta capa (espaciado blanco entre células) y de su mayor grosor comparado con el estrato basal. Respecto del estrato granuloso, no se pudieron observar células en esta capa ya que no se identificaron con la característica morfología alargada que estas presentan.

Las mediciones realizadas en las Fig. 9 y 10 corresponden a espesores (en radianes) así como diámetros en el caso de células con morfología circular o semiejes menor y mayor en aquellas de morfología elíptica. A modo descriptivo, algunas de las células sobre las imágenes de fase fueron etiquetadas con números y color para indicar sus respectivos tamaños de semiejes y perfiles de espesores a la derecha de cada imagen.

Un comportamiento muy común en las muestras observadas con lesión fue la clara diferenciación de los queratinocitos, lo cual no se logró en las muestras sin lesión (ver Fig.

11): tanto en la muestra iluminada con la fuente de luz LED, así como con los láseres, los queratinocitos se observaron con mayor dificultad, (motivo por el cual, la cantidad de células para un adecuado análisis estadístico para realizar comparaciones con las muestras con lesión no fue el esperado). En las muestras sin lesión, se logró identificar que la fase desvuelta para los queratinocitos a 532nm fue recuperada con menores inconvenientes que a 638nm, lo cual puede indicar que el espesor de las células en las muestras sin lesión podría ser menor que en aquellas con lesión.

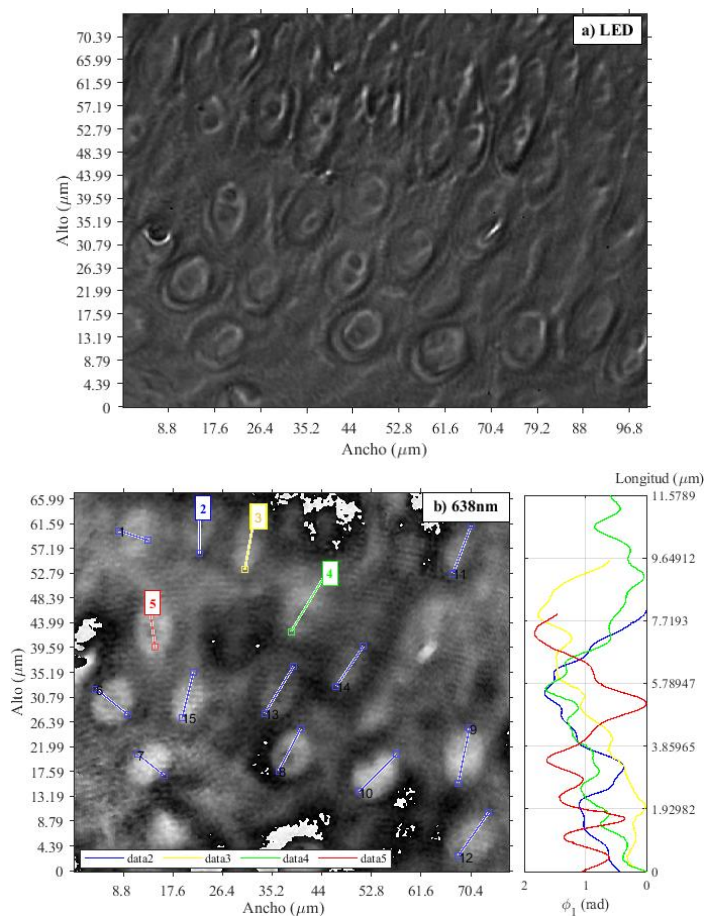


Figura 9. Queratinocitos en una muestra con lesión: (a) Iluminada con luz LED, (b) Imagen de fase recuperada a 638nm, detalle del perfil de fase de algunas células.

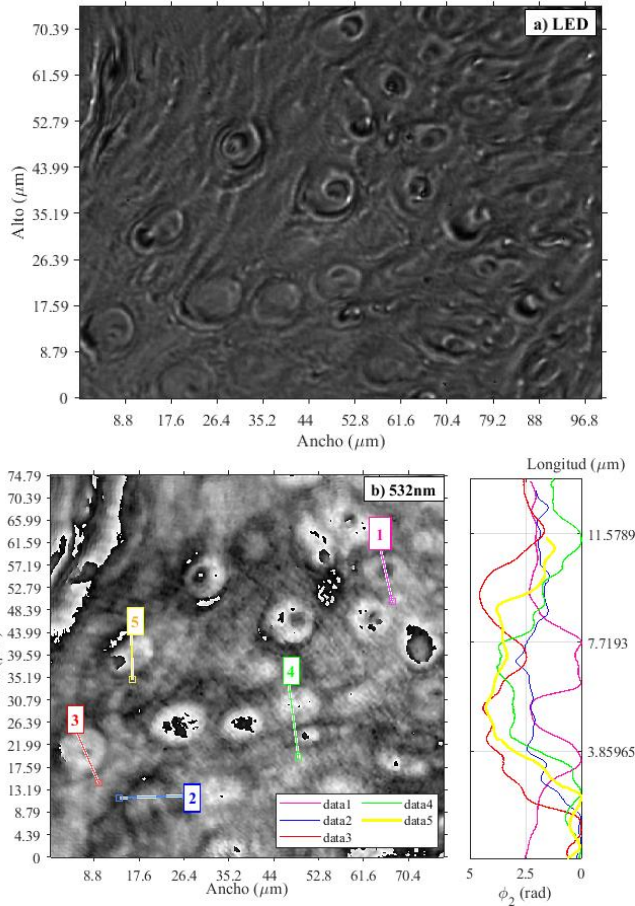


Figura 10. Queratinocitos en una muestra con lesión: (a) Iluminada con luz LED, (b) Imagen de fase recuperada a 532nm, detalle del perfil de fase de algunas células.

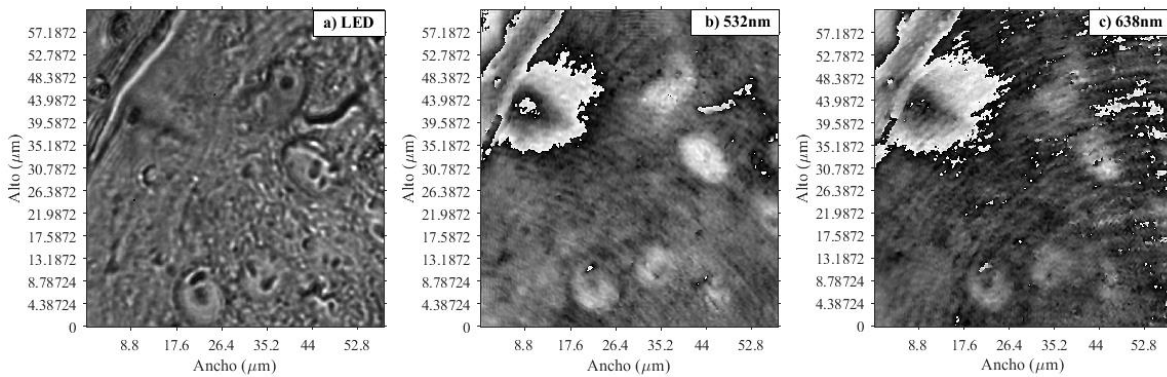


Figura 11. Queratinocitos en una muestra sin lesión: (a) Iluminada con luz LED, (b) Imagen de fase recuperada a 532nm, y a (c) 638nm.

En la Fig. 12 se presentan algunos de los lóbulos característicos del queratoacantoma, en estas regiones se observan crecimientos de queratinocitos alrededor de un punto central; en la imagen se pueden apreciar tres lóbulos: uno inferior, uno central y otro a la izquierda de la Fig. 12 (a) identificados con los números 1, 2, y 3 respectivamente.

En la Fig. 13 se presentan resultados de información de fase obtenida con la técnica de desenvolvimiento óptico para los lóbulos 2 y 3, etiquetados con estos números y colores para indicar sus respectivos espesores en radianes en la misma figura; así como sus longitudes transversales. El espesor de estos lóbulos corresponde a valores altos, comparables a los espesores máximos de queratinocitos en muestras con lesión, lo que se presentará en las figuras subsiguientes.

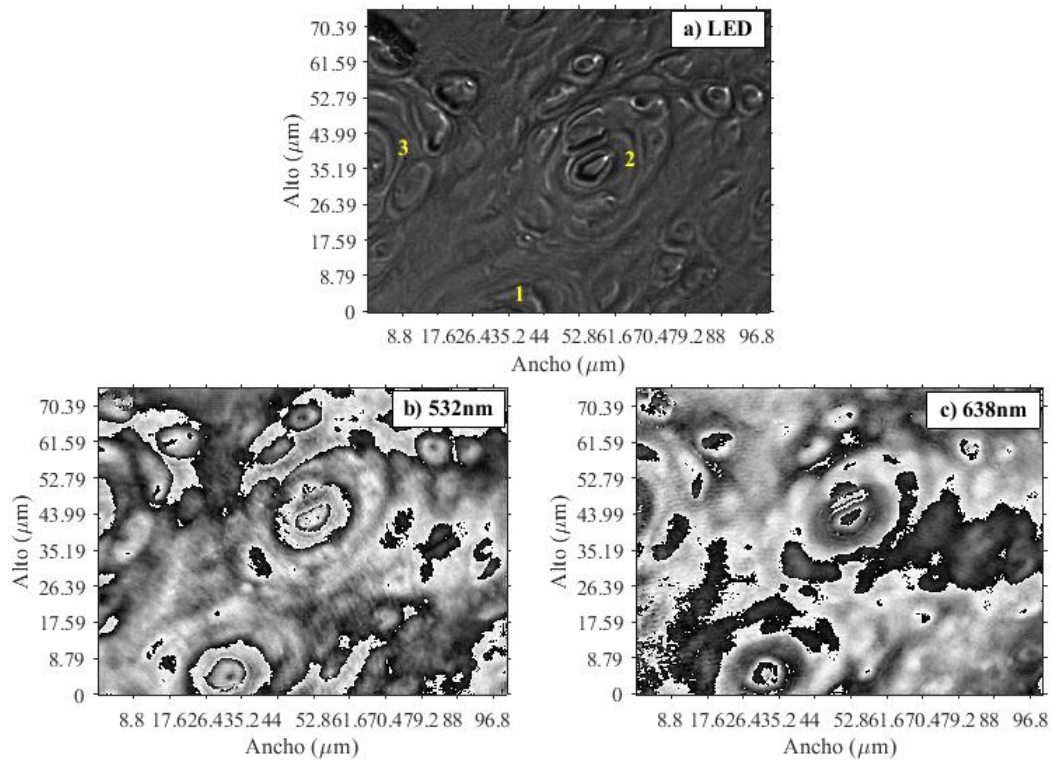


Figura 12. Lóbulos característicos en una muestra con queratoacantoma (a) Iluminada con luz LED, (b) Fase envuelta recuperada a 532nm, y a (c) 638nm.



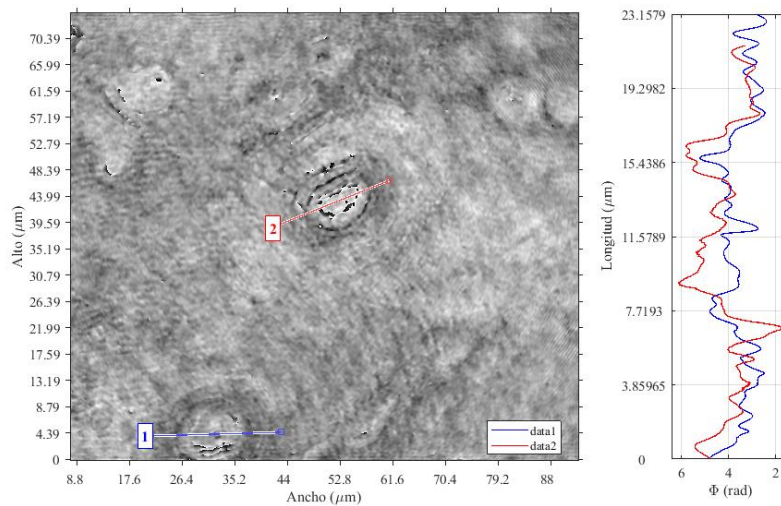


Figura 13. Lóbulos característicos en una muestra con queratoacantoma, fase no envuelta obtenida por OPU, detalle de sus perfiles de fase.

De acuerdo con la Fig. 14, donde se aprecia el espesor máximo y espesor promedio de los queratinocitos en muestras sanas y con lesión a 532nm, es notorio que, en el caso de los queratinocitos en muestras sin lesión, el espesor promedio tiene un comportamiento entre un valor medio y hacia valores bajos, mientras que para los queratinocitos en muestras con lesión el espesor promedio presenta tendencias desde valores medios hacia valores altos.

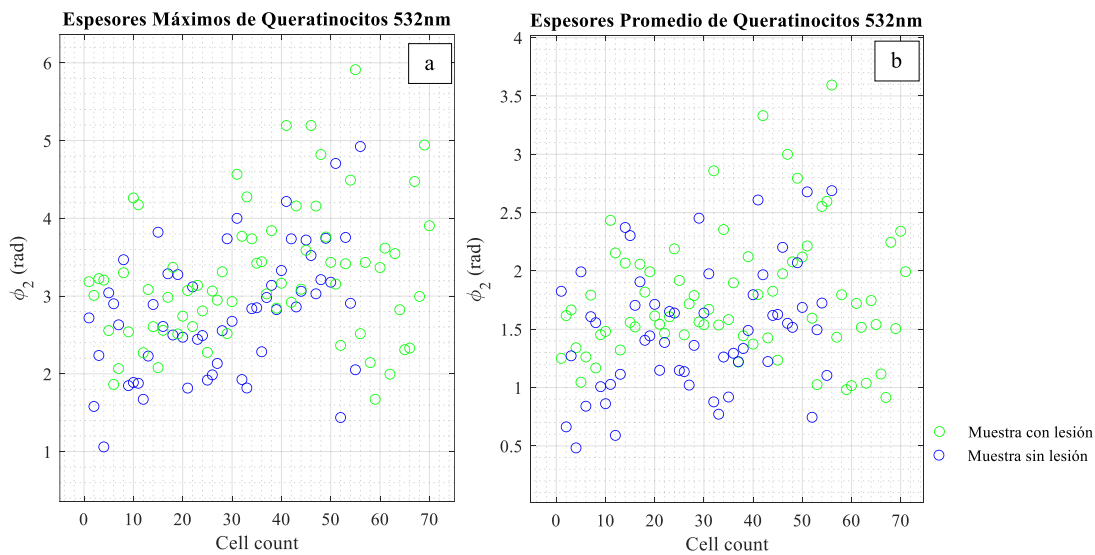


Figura 14. Espesor máximo (a) y espesor promedio (b) en queratinocitos de las capas basal y espinosa a 532nm.

En las mediciones realizadas con 638nm, se observa que los espesores de los queratinocitos en muestras sanas se mantienen dentro de una región promedio (Ver. Fig. 15); comportamiento similar al de su longitud mostrado en la Fig. 16(a).

En las Fig. 14, 15 y 16, se encuentra que, la cantidad de información recuperada a 638nm en muestras con lesión fue más alta que la recuperada en las mismas muestras a 532nm; mientras que en las muestras sin lesión se logró recuperar más información a esta longitud de onda. En general, las células en las muestras con lesión se observaron con mayor facilidad tanto en el microscopio comercial como en el arreglo de DHM, razón por la cual, se recuperó más información para dichas células.

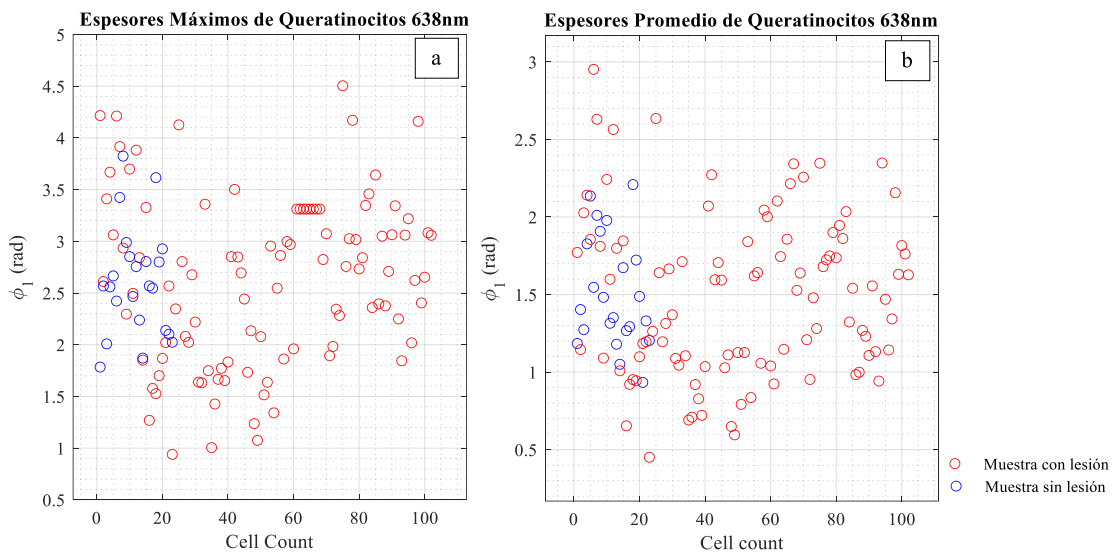


Figura 15. Espesor máximo (a) y espesor promedio (b) en queratinocitos de las capas basal y espinosa a 638nm.



Figura 16. Longitudes en queratinocitos de las capas basal y espinosa, (a) 638nm y (b) 532nm.

Respecto a la información recuperada para la capa de estrato córneo, desenvuelta con la longitud de onda sintética, es notorio que tanto el espesor máximo como el espesor promedio de las muestras sin lesión es más alto que el de las muestras con lesión: siendo más marcado en los espesores máximos (ver Fig. 17). En el caso de las longitudes transversales medidas, este parámetro se mantiene en un valor medio para las muestras sin lesión (ver Fig. 18).

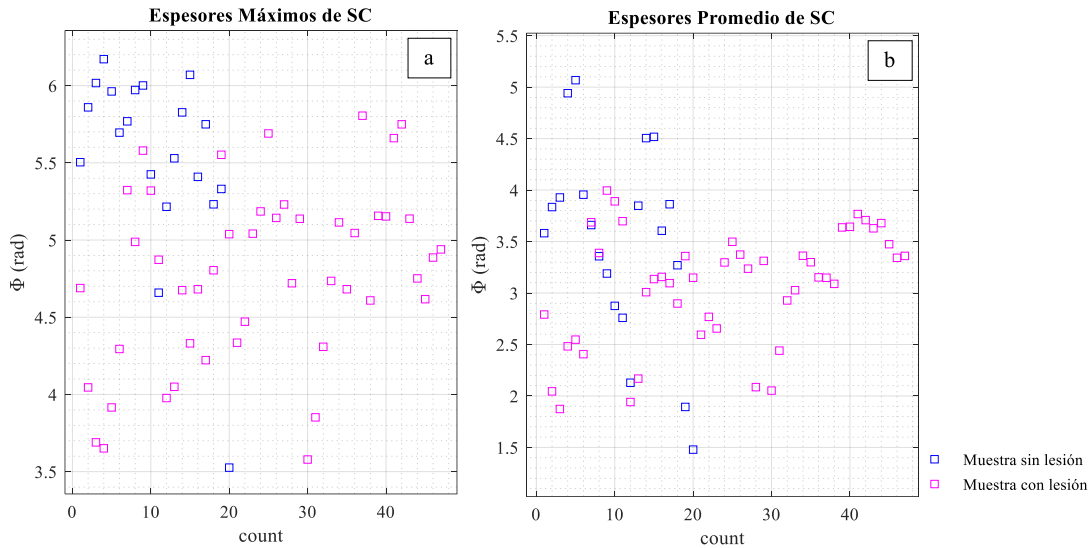


Figura 17. Espesor máximo (a) y espesor promedio (b) en la capa córnea (SC) obtenidos con la longitud de onda sintética.

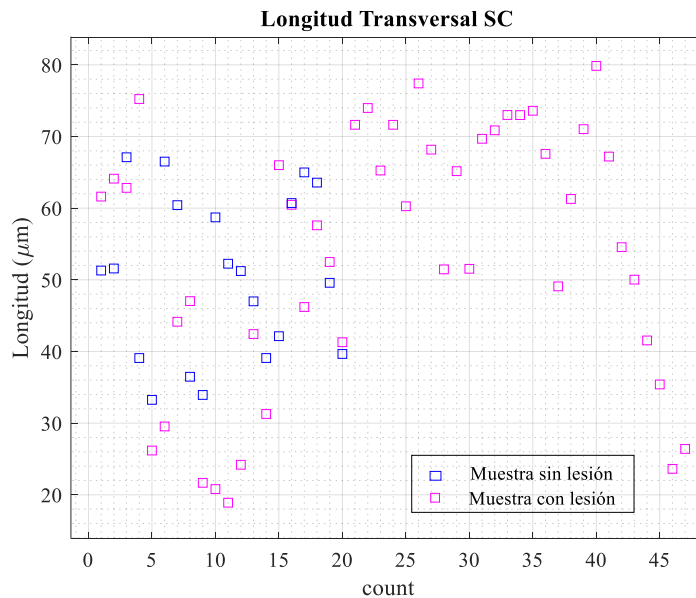


Figura 18. Longitud transversal en la capa córnea (SC) obtenida con la longitud de onda sintética.

Para las mediciones realizadas sobre los lóbulos (ver Fig. 19), se puede identificar que tanto en los espesores máximos como los espesores promedio, sus valores superan a los espesores

promedio y máximo en células individuales de muestras sin lesión y con lesión; un comportamiento similar se identificó en las mediciones de sus longitudes.

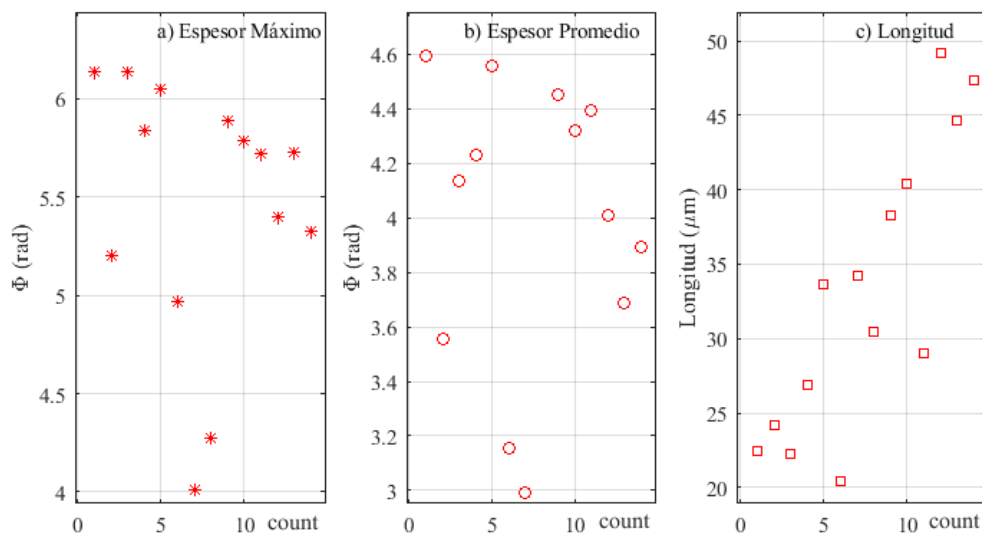


Figura 19. Espesor (a), (b) y longitud (c) de los lóbulos característicos en muestras de piel diagnosticadas con queratoacantoma; mediciones obtenidas con la longitud de onda sintética.

Una recopilación de las características medidas con la técnica se presentan en la Tabla 2. Donde además se puede identificar el comportamiento de un espesor promedio mayor en células de muestras con lesión comparable con las células de muestras sin lesión, esto también se identificó en los promedios de los espesores máximos; caso contrario ocurre con las longitudes: a mayor espesor, menor longitud y viceversa.

Respecto de los datos medidos en el estrato córneo con la longitud de onda sintética, se encuentra que en muestras con lesión el espesor es menor comparado a las muestras sin lesión. En cuanto a su longitud, esta es mayor en muestras con lesión; estos resultados son similares a lo observado en las gráficas de las Fig. 17. y 18.

**Tabla 2. Datos medidos en las muestras de biopsia de piel.**

Capa, $\lambda$	Con lesión	Sin lesión	Espesor promedio (rad)	Desv. STD.	Espesor máximo (rad)	Desv. STD.	Longitud media ( $\mu\text{m}$ )	Desv. STD.
SS y SB 638nm	x		1.5487	0.0523	3.5773	0.0800	11.6277	0.3254
		x	1.5407	0.0761	3.2356	0.2641	12.5289	0.7329
SS y SB 532nm	x		1.7693	0.0650	3.9878	0.1026	12.1762	0.3474
		x	1.6125	0.0715	3.6274	0.1096	12.5383	0.3801
SC 3.2 $\mu\text{m}$	x		3.0642	0.0821	5.1171	0.0855	50.9326	2.5562
		x	3.6074	0.2172	5.8409	0.1382	48.8064	2.4971
Lóbulos 3.2 $\mu\text{m}$	x		4.0128	0.1625	5.8198	0.1832	28.7961	2.5806

Como prueba de concepto del desenvolvimiento óptico, se registraron hologramas para un escalón de SiO<sub>2</sub> de espesor e índice de refracción conocidos (2 $\mu\text{m}$ , 1.4760 [18]), los resultados se presentan en la Fig. 20, donde se muestra la fase envuelta a 532nm y 638nm, así como la fase desenvuelta ópticamente con su respectivo perfil detallando el espesor experimental de la muestra. De esta forma, se confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

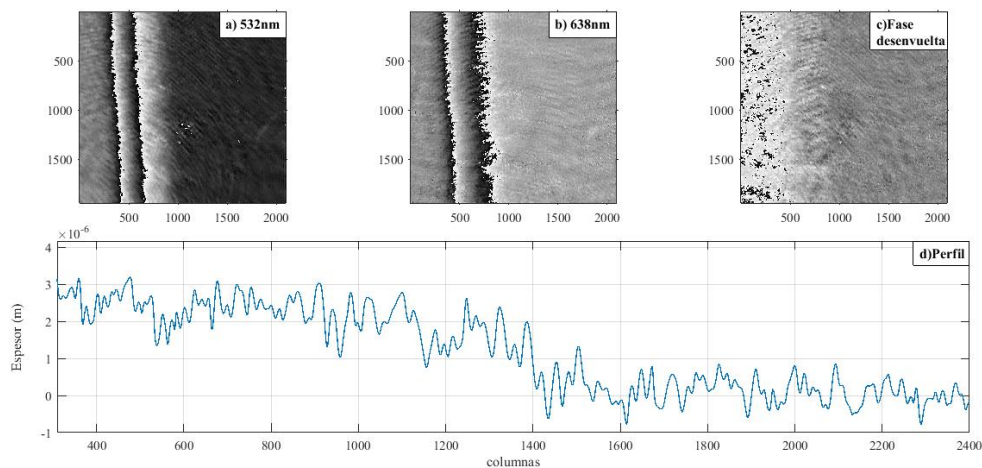


Figura 20. Escalón de SiO<sub>2</sub>, fase envuelta a: 532nm (a), 638nm (b), fase desenvuelta con desenvolvimiento óptico (c) y perfil detallando el espesor del escalón (d).

En este último capítulo se implementó la técnica de desenvolvimiento óptico, con el fin de obtener la información de fase de muestras de piel de un paciente previamente diagnosticado con queratoacantoma sin la necesidad de aplicar algoritmos de desenvolvimiento de fase. Los

hologramas registrados permitieron realizar mediciones de espesor y longitud en muestras con y sin lesión.

A partir de las mediciones realizadas en los queratinocitos de los estratos basal y espinoso, se identificó que podría existir una correlación entre la presencia o ausencia de lesión y la variable medida. Específicamente, esta correlación corresponde a espesores altos en células de SS y SB de muestras con lesión y bajos en aquellas sin lesión. La posible causa de dichos resultados puede estar relacionada con un comportamiento de los queratinocitos en la patología del SCC, donde tienden a hincharse como resultado de un citoplasma hidrópico o acumulación de vacuolas lipídicas, lo que además les da un aspecto más diferenciable [19]; esto podría explicar la buena visibilidad de las células obtenida en todos los resultados.

En el caso del estrato córneo, los espesores fueron bajos ante la presencia de lesión y altos sin lesión; las longitudes se comportaron también de forma contraria, es decir, longitudes altas para muestras con lesión y bajas en muestras sin lesión. De acuerdo con Ratushny et al. [20], el estrato córneo en presencia de SCC tiende a ser grueso, lo cual se encuentra de acuerdo con los resultados obtenidos para la longitud: entiéndase que, en el caso de los estudios típicos de patología, grosor se refiere a un análisis en 2D, lo cual corresponde a la presente tesis a las mediciones de longitud transversal del estrato córneo.

Como trabajo a futuro, se planea realizar mediciones sobre una mayor cantidad de muestras, especialmente en cortes sin lesión para contar con información concluyente respecto del estado de la muestra: con o sin lesión. Así como realizar un análisis más profundo sobre el comportamiento de la longitud de las células en las capas espinosa y basal.

Otras mediciones que también se podrían realizar a futuro son las de desacoplamiento de índice de refracción y espesor a doble longitud de onda. Para esto se requiere de muestras que estén inmersas en materiales de índices de refracción más dispersivos que la muestra misma; de esta forma, se obtendría otra variable para una caracterización más completa.

Adicional a esto, se deberá implementar un algoritmo de corrección del ruido en las imágenes de fase no envueltas obtenidas por desenvolvimiento óptico.

## Conclusiones Generales.

En la presente tesis doctoral se implementó un sistema de Microscopía Holográfica Digital (Digital Holographic Microscopy: DHM) para la medición y análisis de muestras de células de piel. Este sistema se configuró con dos variantes: una primera para la medición simultánea de índice de refracción y espesor por medio de la introducción de una pequeña inclinación sobre la muestra, y una segunda para la implementación de la técnica del desenvolvimiento óptico de fase mediante la introducción de una segunda longitud de onda para el registro simultáneo de dos hologramas.

Se configuró un sistema de DHM para el desacoplamiento de índice de refracción y espesor en muestras de la línea celular A375, correspondiente a melanoma. La técnica implementada en este sistema hace parte de la clasificación de desacoplamiento de índice de refracción y espesor por medio de dos mediciones interferométricas. Para estas dos mediciones se introdujo una pequeña inclinación sobre la muestra, de esta forma, se tendría un holograma registrado a  $0^\circ$  y otro a un ángulo  $\varphi$ , no mayor a  $0.1^\circ$ . En este sistema también se propuso un nuevo modelo matemático, basado en la propuesta de otros autores, donde introducen una inclinación sobre la muestra y desacoplan las dos variables por conteo de franjas. En el caso de la presente tesis doctoral, el modelo matemático usa los dos mapas de fase obtenidos y el ángulo de inclinación para generar una ecuación polinómica de grado dos, donde el índice de refracción de la muestra se recupera a partir de las raíces de dicho polinomio. Este método se aplicó en mediciones realizadas sobre la línea celular A375 y sobre una muestra de prueba, que consistió en un escalón de  $\text{SiO}_2$  con espesor e índice de refracción conocidos; los resultados obtenidos para la línea celular fueron cercanos a los que corresponden a una muestra que ha sido deshidratada; así como para el escalón, los resultados también fueron los esperados. El sistema requiere mejoras en cuanto al elemento que introduce la inclinación,

ya que este procedimiento se realiza manualmente; así mismo, un manejo del ruido para recuperar una mayor y más limpia cantidad de información.

La técnica del desenvolvimiento óptico de fase fue implementada con un arreglo experimental a partir de la configuración de DHM con la que ya se contaba, esto se llevó a cabo introduciendo una segunda longitud de onda de 532nm. A esta configuración se le agregaron un filtro dicróico y otros dos divisores de haz para lograr realizar el registro de hologramas de forma simultánea. Con este arreglo experimental se capturaron hologramas de muestras de biopsia de piel de un paciente diagnosticado con queratoacantoma; dichas muestras fueron preparadas por un patólogo quien previamente las clasificó como muestras con y sin lesión. Con la técnica de DHM se recuperó información de fase de forma individual para los queratinocitos de las capas basal y espinosa a 532nm y 638nm en muestras con y sin lesión; dicha fase permitió medir la longitud y espesor de estas, donde se encontró cierta correlación entre los valores medidos Vs. el estado de la muestra. El estrato córneo en muestras con y sin lesión, así como los lóbulos característicos de la patología de queratoacantoma fueron desenvueltos de forma exitosa con la técnica del desenvolvimiento óptico; con esta información se midió también espesor y longitud, obteniéndose una correlación. El desenvolvimiento óptico fue corroborado con el escalón de SiO<sub>2</sub> de espesor e índice de refracción conocidos, obteniéndose resultados satisfactorios.

La correlación encontrada entre la presencia o ausencia de lesión y las mediciones realizadas se identificó como un mayor espesor para las células en SS y SB de muestras con lesión; mientras que en las células de muestras sin lesión este comportamiento fue contrario. Con estos valores, se podría decir que las células en estas capas, especialmente de la espinosa podrían presentar un citoplasma hinchado o acumulación de vacuolas lipídicas. Otro factor diferenciador fueron las medidas de longitud realizadas sobre el estrato córneo, donde se presentaron valores altos para muestras con lesión; lo cual es característico en el SCC y patologías similares.

Con el presente trabajo de tesis doctoral se logró identificar el potencial de la Microscopía Holográfica Digital para realizar mediciones en muestras de células de piel y correlacionarlas con su estado en determinada patología, lo cual confirma que la técnica podría ser empleada como herramienta de diagnóstico que acompañe la actividad del especialista. Adicional a esto, se caracterizó la morfología en 2D y 3D así como el índice de refracción de la línea celular de melanoma A375 en estado deshidratado. Así mismo, se identificaron las capas de



la epidermis, los queratinocitos en las capas basal y espinosa en muestras con y sin lesión de queratoacantoma con sus característicos lóbulos y sus respectivas morfologías en 2D y 3D.

Con las dos configuraciones de DHM puestas a punto en laboratorio se realizaron mediciones interferométricas sobre muestras patológicas que permitirán, en un trabajo futuro diferenciar mediante un conjunto de características si se presenta o no determinada patología. Para esto se requiere contar con un mayor número de muestras, y, en algunos casos prepararlas mediante métodos distintos al de conservación en resina, ya que algunas características como el índice de refracción requieren muestras sin procesos de secado; lo cual también permitiría emplear el arreglo a doble longitud de onda para la técnica de desacoplamiento de índice de refracción y espesor. Sin embargo, el contar con muestras preparadas por los procesos clínicos de rutina también presenta ventajas, como su conservación en el tiempo. Caracterizar este tipo de muestras por medio de DHM permitiría acceder a su información en 3D, complementando así las herramientas de microscopía óptica convencionales.

## Referencias.

1. M. K. Kim, *Digital Holographic Microscopy : Principles, Techniques, and Applications* (Springer, 2011).
2. J. C. Wyant, B. F. Oreb, and P. Hariharan, "Testing aspherics using two-wavelength holography: use of digital electronic techniques," *Appl. Opt.* **23**, 4020 (1984).
3. P. Lam, J. D. Gaskill, and J. C. Wyant, "Two-wavelength holographic interferometer," *Appl. Opt.* **23**, 3079 (1984).
4. T. Kreis, *Handbook of Holographic Interferometry : Optical and Digital Methods* (Wiley-VCH, 2005).
5. C. Polhemus, "Two-Wavelength Interferometry," *Appl. Opt.* **12**, 2071–2074 (1973).
6. J. Gass, A. Dakoff, and M. K. Kim, "Phase imaging without  $2\pi$  ambiguity by multiwavelength digital holography," *Opt. Lett.* **28**, 1141 (2003).
7. D. C. Ghiglia and L. A. Romero, "Robust two-dimensional weighted and unweighted phase unwrapping that uses fast transforms and iterative methods," *J. Opt. Soc. Am. A* **11**, 107–117 (1994).
8. M. Servin, J. A. Quiroga, and M. Padilla, *Fringe Pattern Analysis for Optical Metrology: Theory, Algorithms, and Applications* (John Wiley & Sons, 2014).

9. N. A. Turko, P. J. Eravuchira, I. Barnea, and N. T. Shaked, "Simultaneous three-wavelength unwrapping using external digital holographic multiplexing module," *Opt. Lett.* **43**, 1943 (2018).
10. J. Kühn, T. Colomb, F. Montfort, F. Charrière, Y. Emery, E. Cuche, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Real-time dual-wavelength digital holographic microscopy with a single hologram acquisition," *Opt. Express* **15**, 7231 (2007).
11. R. Guo and F. Wang, "Compact and stable real-time dual-wavelength digital holographic microscopy with a long- working distance objective," *Opt. Express* **25**, 24512–24520 (2017).
12. A. Khmaladze, M. Kim, and C.-M. Lo, "Phase imaging of cells by simultaneous dual-wavelength reflection digital holography," *Opt. Express* **16**, 16900 (2008).
13. A. Khmaladze, A. Restrepo-Martínez, M. K. Kim, R. Castañeda, and A. Blandón, "Dual-wavelength reflection digital holographic microscopy applied to the detection of pores in coal samples," *Appl. Opt.* **47**, 3203–3210 (2008).
14. C. E. Montalvo-Arenas, *Técnica Histológica. UNAM, Facultad de Medicina, Departamento de Biología Celular y Tisular* (2010).
15. M. H. Ross and W. Pawlina, *Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology, 6th Edition* (Lippincott, 1979).
16. A. Mescher, *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Fifteenth Edition* (McGraw-Hill Education, 2018).
17. T. Takai, "Advances in histopathological diagnosis of keratoacanthoma," *J. Dermatol.* **44**, 304–314 (2017).
18. L. Gao, R. Lemarchand, and M. Lequime, "Refractive index determination of SiO<sub>2</sub> layer in the UV/Vis/NIR range: Spectrophotometric reverse engineering on single and bi-layer designs," *J. Eur. Opt. Soc.* **8**, 13010 (2013).
19. K. Wolff, L. A. Goldsmith, S. I. Katz, B. A. Gilchrest, A. S. Paller, and D. J. Leffell, eds., *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, Seventh* (McGraw-Hill Medical, 2008).
20. V. Ratushny, M. D. Gober, R. Hick, T. W. Ridky, and J. T. Seykora, "From keratinocyte to cancer: The pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma," *J. Clin. Invest.* **122**, 464–472 (2012).