

Tesis defendida por
Cindy Grethel Fuentes Corona
y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Israel Rocha Mendoza
Director del Comité

Dr. Raúl Rangel Rojo
Miembro del Comité

Dr. Anatoly Khomenko
Miembro del Comité

Dr. Víctor Ruiz Cortés
Miembro del Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Miembro del Comité

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Coordinador
Programa de Posgrado en Óptica

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director
Dirección de Estudios de Posgrado

27 de Febrero de 2013

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



Programa de Posgrado en Ciencias
en Óptica

Construcción de un microscopio no lineal basado en la generación de segundo armónico para el estudio *in vitro* de la fibrogénesis del colágeno

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestro en Ciencias

Presenta:

Cindy Grethel Fuentes Corona

Ensenada, Baja California, México
2013

Resumen de la tesis de Cindy Grethel Fuentes Corona, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Óptica con orientación en Optoelectrónica.

Construcción de un microscopio no lineal basado en la generación de segundo armónico para el estudio *in vitro* de la fibrogénesis del colágeno

Resumen aprobado por:

Dr. Israel Rocha Mendoza

El área de la biofotónica involucra el desarrollo y la aplicación de técnicas ópticas para manipular y/o estudiar moléculas, células y tejido biológico (Prasad, 2003). En esta tesis se presenta un trabajo experimental en el área de la microscopía no-lineal, la cual cae dentro del espectro de la biofotónica. En particular se construyó un microscopio no lineal en base al proceso óptico no lineal (de allí su nombre) de segundo orden conocido como generación de segundo armónico (SHG, por sus siglas en inglés). Dicho microscopio no lineal se utilizó para estudiar la no linealidad óptica de segundo orden en fibras de colágeno generadas *in vitro*. El microscopio fue construido en el CICESE (microscopio no comercial) y está conformado por tres sistemas: i) el sistema de iluminación: compuesto por un láser de pulsos ultracortos en el régimen de femtosegundos como fuente de excitación; ii) el sistema de barrido óptico: compuesto por un par de espejos galvano-métricos, un arreglo telescópico y un objetivo de microscopio que en su conjunto barren el haz de luz láser en el plano focal, y iii) el sistema de detección: compuesto por una lente, un filtro interferométrico y un tubo fotomultiplicador, a través de los cuales se colecta y detecta únicamente la señal armónica generada. Para la generación de fibras de colágeno se utilizó una solución con monómeros de colágeno la cual se preparó químicamente y se llevó a condiciones de temperatura y pH adecuados para inducir la fibrogénesis. Este proyecto de tesis inicia con la calibración del barrido láser y la resolución del sistema óptico, pasando por la metodología para preparar fibras de colágeno mediante la inducción de fibrogénesis *in vitro* y termina con un análisis de la señal de segundo armónico generada en las muestras de fibras de colágeno crecidas *in vitro*.

Palabras Clave: **Generación de Segundo Armónico, Colágeno, Microscopía no lineal, Fibrogénesis del colágeno.**

Abstract of the thesis presented by Cindy Grethel Fuentes Corona as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Optics with orientation in Optoelectronics.

Construction of a nonlinear microscope based in on second harmonic generation for the *in vitro* study of the collagen fibrogenesis

Abstract approved by:

Dr. Israel Rocha Mendoza

The biophotonics field involves the development and application of optical techniques to manipulate and/or study molecules, cells and biological tissue (Prasad, 2003). This thesis presents an experimental work in the area of nonlinear microscopy, a field considered a major branch of biophotonics. In particular, a nonlinear microscope based on the second-order nonlinear optical process known as second harmonic generation (SHG) was built. This nonlinear microscope was used to study the second order nonlinearity in collagen fibers grown *in vitro*. The microscope was built in CICESE (microscope non commercial) and is divided in three systems: i)the illumination system: consisting of an ultrashort laser pulse (in the femtosecond range) as the excitation source; ii)the optical scanning system: including galvanometric mirrors, a telescopic array and a microscope objective which together scan the laser beam in the focal plane; and iii)the detection system: consisting on a lens, an interferometric filter and a photomultiplier tube, through which the harmonic signal generated is collected, filtered and detected, respectively. To generate collagen fibers a solution containing collagen monomers was prepared and brought to temperature and pH conditions suitable for fibrogenesis ignition. This thesis work started with the calibration of the optical scanning and optical resolution; followed by mastering the methodology to prepare collagen fibers obtained from fibrogenesis induced *in vitro*; and finally concludes with the analysis and discussion of the second harmonic signal generated from the collagen fibers generated.

Keywords: **Second Harmonic Generation, Collagen, Nonlinear microscopy, Collagen Fibrogenesis.**

Dedicatorias

A mis padres, porque creyeron en mí, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final.

A mis hermanos, gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

Agradecimientos

-Agradezco especialmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) quien me brindó el apoyo económico para realizar mis estudios de Maestría (Apoyo No.370778).

-Asimismo agradezco al CONACyT nuevamente y a UCMexus (The University of California Institute for Mexico and the United States) quienes en conjunto brindaron el apoyo económico para realizar exitosamente este trabajo de investigación, a través de los proyectos:

- UC-MEXUS. 2010 CN-10-475: "Estudio del autoensamble del colágeno utilizando microespectroscopia cars".
- SEP-CONACYT-CB-2010-01-155803: "Microespectroscopía óptica no lineal y su uso en investigaciones de microbiología y medicina".

-Quiero agradecer de forma muy especial a mi Director de tesis el Dr. Israel Rocha Mendoza por su valiosa guía como excelente investigador comprometido con la ciencia.

-Un muy especial agradecimiento al M.C. Jacob Licea Rodríguez por su compromiso con este trabajo, y por su amistad.

- Agradezco el compromiso, paciencia, dedicación y orientación académica, así como las facilidades brindadas para utilizar sus respectivos laboratorios y/o equipo, de mis sinodales: La Dra. Meritxell Riquelme, el Dr. Anatoly Komenko, el Dr. Raúl Rangel y el Dr. Víctor Ruiz.

-Finalmente, Al Dr. Eric Potma quién me confió el equipo que utilice en su laboratorio en la Universidad de Irvine, California.

Contenido

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Formación de imágenes en microscopía no lineal	3
1.3. Objetivos	7
1.4 Estructura de la tesis	7
Capítulo 2. Conceptos Básicos	9
2.1 Óptica lineal y procesos no lineales	9
2.1.1 Régimen lineal	9
2.1.2 Régimen no lineal	12
2.1.3 Generación del segundo armónico	14
2.2 El Colágeno	18
2.2.1 Estructura del colágeno	20
2.2.2 Fibrogénesis: Proceso de autoensamble del colágeno	23
2.3 Generación de segundo armónico del colágeno	25
2.3.1 Efectos de birrefringencia, polarización cruzada y diatenuación	27
Capítulo 3. Materiales y Métodos Experimentales	32
3.1 Arreglo experimental	32
3.1.1 Sistema de iluminación	33
3.1.2 Sistema óptico de barrido	34
3.1.3 Sistema de detección	35
3.1.4 Sincronización entre el barrido y la detección	36
3.2 Caracterización del microscopio	37
3.2.1 Medición del perfil de intensidad del haz de excitación	38
3.2.2 Caracterización del barrido y resolución del microscopio	41
3.2.3 Medición del campo de visión del microscopio	42

3.2.4 Calibración de los fotomultiplicadores y fuentes de voltaje	42
3.2.5 Caracterización de la señal de segundo armónico	45
3.3 Preparación de muestras con fibras de colágeno tipo I	46
3.3.1 Muestras de fibras de colágeno natural	46
3.3.1 Muestras de fibras de colágeno crecidas in vitro	47
3.3.2 Monitoreo de la fibrogénesis de colágeno	49
3.4 Microscopía de segundo armónico	50
Capítulo 4. Resultados y Discusiones	53
4.1 Caracterización del microscopio	53
4.1.1 Medición del perfil de intensidad del haz de excitación	53
4.1.2 Caracterización del barrido y resolución del microscopio	56
4.1.3 Medición del campo de visión del microscopio	59
4.1.4 Calibración de los fotomultiplicadores y fuentes de voltaje	60
4.1.5 Caracterización de la señal de segundo armónico	64
4.2 Preparación de muestras de colágeno	67
4.2.1 Fibras de colágeno crecidas in vitro	67
4.2.2 Monitoreo de la fibrogénesis de colágeno	69
4.3 Microscopía de segundo armónico en fibras de colágeno	73
4.3.1 GSA en fibras de colágeno natural	74
4.3.2 Segundo armónico en fibras de colágeno crecidas in vitro	77
Capítulo 5. Conclusiones	83
5.1 Respecto a la construcción y caracterización del microscopio	83
5.2 Respecto a la preparación de muestras de fibras de colágeno crecidas in vitro	85
5.3 Respecto a la no linealidad de segundo orden en fibras de colágeno crecidas in vitro	85
5.4 Aportaciones realizadas	86
5.2 Propuestas para de trabajos futuros	86
Referencias bibliográficas	87

Lista de figuras

Figura		Página
1	a) Modelo de Lorentz, b) Respuesta dipolar del medio sin campo eléctrico incidente, c) bajo la influencia de un campo eléctrico E incidente.	10
2	Generación del segundo armónico GSA desde el punto de vista cuántico.	17
3	Estructura del colágeno.	19
4	Importancia de la glicina en la estructura de la molécula de colágeno.	22
5	Proceso de autoensamble del colágeno.	24
6	Dependencia polar de la intensidad del GSA en colágeno.	28
7	Esquema del arreglo experimental para la implementación de microscopía lineal.	32
8	a) Rejilla de transmisión de periodo de modulación de 25 micras b) modulación del índice.	41
9	Arreglo experimental para la calibración de fotomultiplicadores.	43
10	Extracción de fibras de colágeno natural.	47
11	Configuración para el monitoreo de la fibrogenesis de colágeno.	50
12	Esquema para la tabulación de datos del GSA en regiones específicas de una imagen de barrido.	52

13	Gráficas de intensidad obtenidas con la prueba de la navaja en las posiciones D1 (a), D2 (c) y D3 (d), de la Figura 1.	54
14	Caracterización del barrido con objetivos de magnificación 40x y 10x.	57
15	a) Campo de visión del microscopio. b) Grafica del perfil de intensidad en una fibra de colágeno natural.	59
16	Calibración de los fotomultiplicadores y fuentes de voltaje.	61
17	Caracterización de la señal de segundo armónico.	65
18	Fibras de colágeno crecidas in vitro.	68
19	Monitoreo de la fibrogénesis del colágeno en una muestra preparada con PH de 7.5.	69
20	Monitoreo de la fibrogénesis del colágeno en una muestra preparada con PH de 7.3.	72
21	Dependencia de la señal de segundo armónico en función de la polarización y la potencia de la luz excitante, en una muestra con fibras de colágeno natural.	75
22	Dependencia de la señal de segundo armónico en una muestra con fibras de colágeno crecidas in vitro con PH = 7.	78
23	Imágenes de fibras de colágeno crecidas in vitro con PH 7.3 (a), PH 7 (d) y PH 7 (g), respectivamente.	80
24	Cuantificación de la no linealidad de segundo orden en fibras de colágeno crecidas in vitro.	82

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Objetivos de microscopio utilizados en esta tesis y su resolución lateral (lineal y no lineal) estimada.	40
2	Valores teóricos y experimentales del perfil del haz en D1, D2 y D3.	53
3	Constantes de calibración del PMT a diferentes valores de alto voltaje.	63

Capítulo I

Introducción

1.1 Antecedentes

El estudio de los mecanismos de enlace y de la organización de proteínas fibrosas que forman el tejido conectivo, tales como el colágeno es un tema de gran interés en medicina. Comprender estos mecanismos a nivel de su estructura molecular es importante para entender el origen y desarrollo de procesos patológicos relacionados con alteraciones del tejido humano (Sellaro, 2003) (Nadkarni, et al., 2009). Con el surgimiento de la microscopía electrónica fue posible visualizar la estructura y morfología del colágeno (Meyer, et al., 1978) (Thomson , et al., 1987) (Nan-Chang Su, et al., 2003) (Kaya, et al., 2012). No obstante, la alta resolución de esta técnica (decenas o hasta unidades de nanómetros) es opacada por su inevitable característica destructiva; ya que es necesario preparar las muestras para su visualización. Dicha característica destructiva de la microscopía electrónica imposibilita desarrollar estudios biológicos *in vivo e in situ*.

Por su parte, la microscopía no lineal de segundo armónico (GSA¹) también ha sido utilizada prácticamente desde sus orígenes para estudiar la no linealidad de segundo orden en colágeno (Roth & Freund, 1979) (Roth & Freund, 1981) (Roth & Freund, 1982) (Freund, et al., 1986) (Freund & Deutsch., 1986). Sin embargo, éste tema sufrió un “estancamiento” debido en gran parte al alto costo y baja eficiencia de los sistemas de pulsos ultracortos de la época; siendo poco accesibles incluso en los laboratorios científicos más avanzados. Era de esperarse que en años recientes, como resultado del gran avance tecnológico y la relativa accesibilidad que existe para adquirir este tipo de fuentes a bajo costo, la microscopia no lineal de GSA resurgiera como la técnica ideal para obtener

¹ A partir de aquí utilizaremos el acrónimo ‘GSA’ para referirnos al proceso de Generación de Segundo Armónico.

imágenes en tejido biológico a nivel supracelular (Campagnola, et al., 1999) (Reiser, et al., 2007) (Campagnola & Dong, 2009). Esto se debe, por un lado, a que el colágeno presenta buena respuesta óptica no lineal de segundo orden (Erikson, et al., 2007) (Rocha Medoza, et al., 2007) y, por otro lado, a que este tipo de microscopía es una técnica no destructiva/invasiva que utiliza láseres de pulsos ultracortos de luz infrarroja para generar luz en el visible (sin absorción de energía) únicamente en el plano focal. Por lo que, a través de un barrido láser sobre la muestra (o de la muestra alrededor del haz láser enfocado) y la colección síncrona de la señal generada, se logran obtener imágenes con resolución lateral y axial similares a las de la microscopía confocal (~300 y 400 nm, respectivamente) llegando a profundidades de hasta varios cientos de micrómetros.

Existen trabajos previos en los cuales han utilizado microscopía no lineal, tanto de GSA como de fluorescencia por absorción de dos fotones (TPEF, por sus siglas en inglés), como una técnica no destructiva para estudiar córneas tomadas *ex vivo* y colágeno polimerizado *in vitro* (Tan, et al., 2006) (Teng, et al., 2007) (Raub, et al., 2007). Raub *et al.* estudiaron microestructuras de colágeno localizadas, a profundidades de hasta 1 mm de la superficie corneal, a temperaturas de polimerización en un rango de 4-37 °C utilizando glutaraldehído para manipular el diámetro de las fibras de colágeno. Junto con la microscopía electrónica de barrido revelaron que a medida que disminuye la temperatura de polimerización, aumenta el diámetro de la fibra de colágeno y el tamaño del poro, disminuyendo el promedio de la señal de segundo armónico (GSA), con un cambio mínimo en la señal de TPEF. En contraste, el glutaraldehído aumenta significativamente el promedio de la señal de TPEF, sin afectar la señal de segundo armónico. Dichos estudios demostraron que la técnica de GSA puede caracterizar microscópicamente el hidrogel del colágeno y que una imagen óptica puede ser una herramienta útil no invasiva para evaluar la mecánica del tejido. Por otro lado, Tan *et al.*, y Teng *et al.*, demostraron la capacidad de la microscopía de GSA para estudiar alteraciones estructurales de la córnea.

Sin embargo, existe poca literatura donde se utilice la microscopía de GSA para estudiar la fibrogénesis del colágeno. Recientemente, Bancellin et. al. (Bancellin, et al., 2012), monitorearon y cuantificaron la dinámica de la fibrogénesis a temperatura ambiente y concluyen que a menor pH la velocidad de la generación de fibras disminuye. No obstante, en este trabajo los autores no analizan la susceptibilidad de segundo orden en las fibras de colágeno recién generadas. Para una buena cuantificación del proceso es necesario primero verificar si la susceptibilidad de segundo orden en fibras de colágeno generadas *in vitro* es igual a la susceptibilidad de segundo orden en fibras de colágeno natural. Siendo las fibras de colágeno el resultado de un ordenamiento jerárquico, iniciando por sub-microfibras formadas por una estructura pentamérica (con cinco moléculas de colágeno), la calidad de ensamblaje define el ordenamiento macroscópico de las fibras, y por tanto, la señal de segundo armónico. En este contexto, con este trabajo de tesis se contribuye en esta dirección estudiando la susceptibilidad de segundo orden del colágeno en fibras de colágeno obtenidas por fibrogénesis.

1.2 Formación de imágenes en microscopía no lineal

A diferencia de la microscopía óptica convencional, en la cual primero se forma una imagen amplificada del objeto y luego se observa a través de un ocular, o bien, a través de una pantalla, en la microscopía no lineal la imagen se forma utilizando una técnica de barrido láser. Esta diferencia es de suma importancia tenerla en mente y, por tanto, para entrar más en contexto con respecto al diseño de un microscopio no lineal, se incluye a continuación una breve descripción de cómo está constituido un microscopio de barrido láser. Posteriormente, en el capítulo III, se describirá en detalle el esquema utilizado en esta tesis para la construcción de dicho sistema de barrido láser y su uso para generar imágenes de microscopía de transmisión y microscopía no lineal.

El diseño de un microscopio óptico de barrido láser es en general muy simple y está conformado por tres sistemas: *el sistema de iluminación, el sistema de barrido óptico y el sistema de detección*. Para el caso en el que se realiza microscopía por transmisión basta con medir la transmisión de una fuente de luz (colimada y enfocada) mientras ésta, o la muestra, son barridos en sincronía con la detección. Para la detección se utiliza un simple medidor de potencia o un fotodiodo lo suficientemente rápido para detectar los cambios en la intensidad producidos por las diferentes opacidades de la muestra durante el barrido. En contraste, para el caso de microscopía confocal, cuyo principio de formación de imagen también está basado en microscopía de barrido, generalmente se utiliza luz monocromática con longitud de onda corrida hacia el ultravioleta. La gran separación entre los espectros de excitación (del láser) y de emisión (de luz inducida por fluorescencia), permite que estos sean fácilmente aislados utilizando filtros de interferencia y, asimismo, que el segundo sea detectado de manera eficiente con mínimas pérdidas.

En cuanto a la microscopía no lineal, la principal diferencia tecnológicamente hablando con respecto a las dos previamente mencionadas, es el uso de láseres de pulsos ultracortos como fuente de excitación. Es aquí donde radica la complejidad principal de estos sistemas, por un lado el manejo de estas fuentes y, por otro lado, en la óptica necesaria para su implementación. Para entrar en contexto, a continuación se describirá brevemente cada uno de los sistemas que componen un microscopio no lineal de barrido óptico.

El ***sistema de iluminación*** requiere de un láser de pulsos ultra-cortos con un campo eléctrico intenso para una excitación eficiente de la muestra. El rango del ancho temporal de los pulsos es de unidades de pico a centenas de femtosegundos. El láser se enfoca en una región muy pequeña en la muestra concentrando una gran cantidad de energía por unidad de área; logrando intensidades del orden de cientos de TeraWatts/ μm^2 , lo cual da origen a los procesos no lineales. Dado que sólo se ilumina con un haz enfocado, esto es, se tiene una excitación puntual, se necesita un sistema de barrido que permita la

formación de una imagen mediante la colección síncrona con la señal generada en cada uno de estos puntos. El sistema de barrido puede ser de dos tipos: aquel en el que el haz láser se desplace por la muestra (“beam scanning”), o bien, en la que la muestra sea la que se desplace, mientras el haz permanece inmóvil (“stage scanning”) (Wright, et al, 1993). El primer método es el empleado en este trabajo de tesis, y tiene la ventaja de una mayor velocidad de barrido y, por tanto, de una rápida formación de la imagen, además el espécimen no necesita ser movido durante el muestreo por lo que no necesita ser fijado, lo que lo hace especialmente interesante para el estudio de sistemas biológicos dinámicos tales como el monitoreo de células *in vivo*, o bien, del monitoreo de la formación de fibras (Bancelin, et al., 2012)

En el **sistema de barrido óptico** el haz del láser hace un barrido sobre la muestra mediante el uso de dos espejos galvanométricos estratégicamente colocados formando un ángulo de 90 grados entre sí de modo que sus ejes de rotación coinciden con sus propias superficies (Nikon, 2000). Mediante un movimiento de rotación el primer espejo crea la línea horizontal de escaneo a lo largo del eje-x, mientras que el segundo espejo produce la deflexión vertical a lo largo del eje-y. La superficie del espejo en el galvanómetro es una película delgada de plata depositada sobre un sustrato de silicio, cuarzo fundido, o berilio. Entre los requisitos más importantes de los espejos galvanométricos es que son de peso ligero, están contruidos de un material rígido, y disponen de una superficie pulida y planicidad a una fracción de una longitud de onda. Los espejos deben ser igualmente reflectivos sobre un rango de longitudes de onda (aproximadamente de 350 a 1200 nanómetros) y la superficie reflectante debe estar centrada sobre el eje de rotación de la unidad de exploración.

El **sistema de detección** se caracteriza por tener detectores con una gran sensibilidad para detectar las señales diminutas generadas con la microscopía no lineal. Asimismo se utilizan filtros ópticos o monocromadores con el fin de separarla de la luz del láser excitante cuya potencia es varios órdenes de magnitud mayor. Los tubos fotomultiplicadores (PMT, por sus siglas en inglés) son los

dispositivos de uso común para este propósito. Estos dispositivos convierten la energía de la luz incidente en fotoelectrones emitidos al vacío, los cuales son multiplicados en un proceso de emisión secundaria, a través de un arreglo de dinodos sujetos a un alto voltaje. Tienen una alta sensibilidad y bajo ruido y puede ajustarse un valor de ganancia y un valor "offset" para cada detector. El valor de ganancia ajusta la amplificación de la señal eléctrica generada a partir de los fotones emitidos por la muestra. Si la intensidad de luz emitida por la muestra es débil se debe aumentar la ganancia para poder obtener la imagen. Un aumento excesivo de la ganancia se traduce en una pérdida de calidad de la imagen debido al ruido electrónico que se genera. El valor de "offset" permite determinar el valor umbral. Sólo se detectan y muestran en la imagen las señales que están por encima de este valor umbral.

Al ser los tubos fotomultiplicadores detectores muy sensibles, la luz del láser excitante puede saturarlos y dañarlos si no se tienen las debidas precauciones. Un caso que sucede comúnmente es que, la señal del haz excitante (o del medio ambiente) sea detectada sumándose a la señal no lineal, siendo esto causa de una mala interpretación en los resultados. Para evitar esto, generalmente se utilizan filtros interferométricos (pasa banda o dicróicos) cuyas densidades ópticas de rechazo pueden ser de dos a siete ordenes de magnitud.

1.3. Objetivos

Este proyecto tiene como objetivo implementar y utilizar microscopía de GSA para estudiar la no linealidad en fibras de colágeno obtenidas mediante fibrogénesis a partir de solución de colágeno. Por lo tanto, para llevar a cabo este trabajo, se plantearon los siguientes tres objetivos particulares:

- Construir y caracterizar un microscopio no lineal por generación de segundo armónico.
- Preparar muestras de colágeno crecidas *in vitro*.
- Estudiar la no linealidad de segundo orden en muestras de colágeno *in vitro* mediante la toma de imágenes de GSA como función de la intensidad y polarización de la luz excitante.

1.4 Estructura de la tesis

Esta tesis comprende cinco capítulos siendo el capítulo I, donde se presenta una breve y concisa introducción al tema, se ponen en contexto los objetivos del proyecto y se describe la estructura de la tesis.

Los conceptos básicos necesarios para tener un conocimiento general del tema se describen en el capítulo II. Allí se describen brevemente el origen de los procesos no lineales mediante la interacción de las ondas electromagnéticas con medios materiales dando énfasis en la no linealidad de segundo orden, para la generación del segundo armónico. Por otro lado, se describe también la estructura molecular del colágeno y el proceso de autoensamblaje (la fibrogénesis). Se cierra este capítulo presentando la teoría existente de la GSA en fibras de colágeno natural discutiendo los efectos inducidos por birrefringencia, polarización cruzada y diatenuación.

En el capítulo III se describen los distintos materiales y métodos utilizados en los experimentos realizados en este proyecto. El capítulo inicia describiendo las

partes que conforman un microscopio no lineal haciendo énfasis en la caracterización del barrido láser. Posteriormente, se presenta la metodología a seguir para la caracterización del microscopio, la cual comprende: la medición del perfil de intensidad del haz de excitación; la medición del perfil del haz en el plano focal del microscopio; la medición del campo de visión del microscopio y la calibración de los fotomultiplicadores y fuentes de voltaje. Así mismo, se describe la preparación tanto de las muestras de colágeno natural, como de las fibras de colágeno por medio de la fibrogénesis y la caracterización de la señal de segundo armónico en un cristal ferroeléctrico de Niobato de Litio (LiNbO_3). Finalmente, se explica brevemente como se lleva a cabo el procesamiento y análisis de las imágenes de GSA.

En el capítulo IV, se presentan los resultados principales obtenidos en esta tesis, siguiendo el orden de la estructura utilizada en el capítulo III. En particular se discute el análisis experimental realizado para la generación del segundo armónico en fibras de colágeno *in vitro*; donde para determinar cualitativamente el orden de la no linealidad de segundo orden se compara dicha señal con la señal obtenida en un cristal de Niobato de Litio (LiNbO_3) y en un tendón de colágeno natural, cuyos valores ya han sido reportados en la literatura. Finalmente, en el capítulo V se presentan las principales conclusiones de este trabajo y algunas propuestas como trabajos a futuro.

Capítulo 2

Conceptos Básicos

2.1 Óptica lineal y procesos no lineales

Para hablar del origen de la óptica no lineal es importante saber cómo interaccionan las ondas electromagnéticas con la materia. La emisión de radiación en un material se puede explicar desde un punto de vista electromagnético usando el modelo de Lorentz el cual se esquematiza en Figura 1 a). Este modelo compara la interacción de la radiación con la materia con el comportamiento de un oscilador armónico simple. Explica el efecto de los campos electromagnéticos sobre el movimiento de los electrones dentro del material, considerando cada átomo (o molécula) que lo compone como un dipolo oscilante formado por una carga positiva y otra negativa unidas por un resorte. Con este modelo se puede explicar tanto la interacción lineal como la no lineal de la radiación con la materia, descritos a continuación como el régimen lineal y régimen no lineal de la óptica.

2.1.1 Régimen lineal

En el régimen lineal, el desplazamiento de las cargas es proporcional al campo \mathbf{E}_0 que incide localmente en el material ($r \propto \mathbf{E}_0$). Un campo electromagnético incidente oscilando a frecuencias ópticas induce dipolos en el material que oscilan armónicamente a la misma frecuencia ω de la luz incidente. El campo electromagnético emitido por cada uno de los dipolos oscilantes se superpone al campo original modificando su propagación pero no su frecuencia (ver Figura 1 b y c).

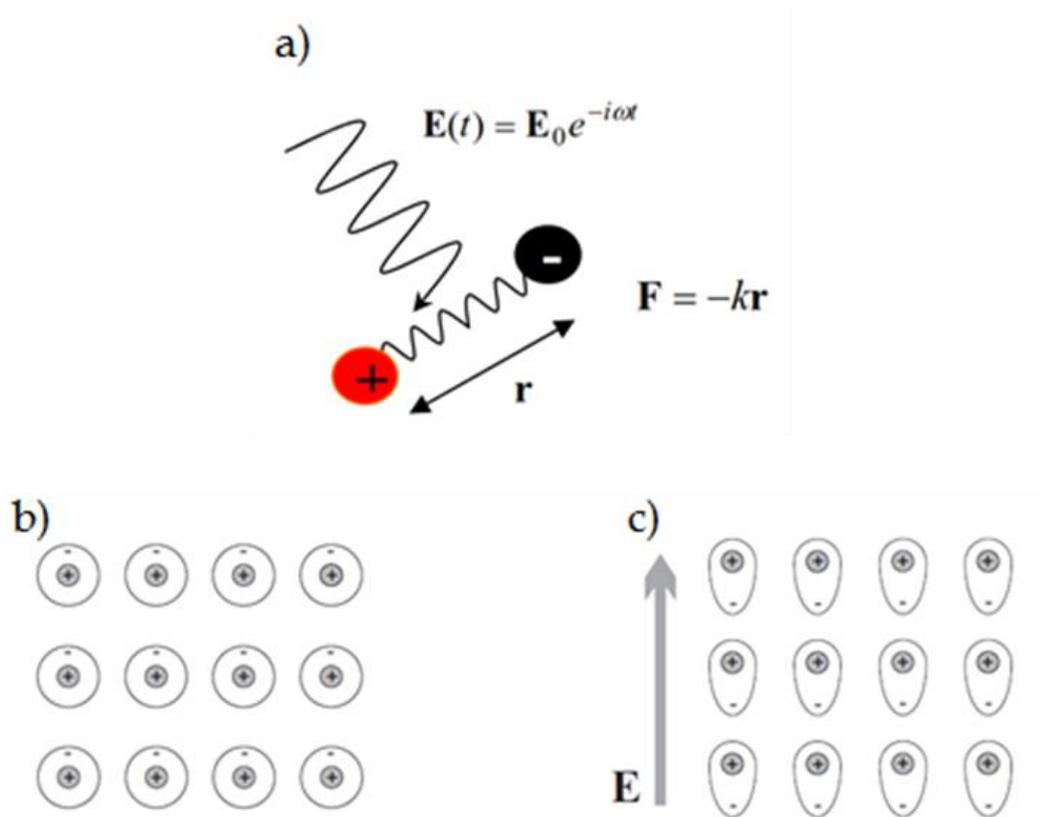


Figura 1. a) Modelo de Lorentz. b) Respuesta dipolar del medio sin campo eléctrico incidente c) bajo la influencia de un campo eléctrico E incidente. Figura adaptada de la tesis de maestría de Robles Agudo “Generación simultánea del segundo y tercer armónicos mediante cuasi-empatamiento de fases, 2005, pp. 26” y de la tesis doctoral de Tamayo Rivera ‘Estudio de la dinámica de la respuesta no lineal en materiales orgánicos y materiales nanoestructurados, 2009, pp.26.’”

Como la respuesta del resorte que une a los átomos está dada por su fuerza de restauración $F = -kr$, donde k es una constante, la ecuación del movimiento del electrón que expresa la segunda ley de Newton se representa por,

$$-kr + m\ddot{r} + eE(t) = m\ddot{r}, \quad (1)$$

donde m es la masa del electrón, r es la variable que indica la distancia entre las cargas, e es la carga del electrón, $E(t)$ es el campo eléctrico de la onda incidente.

El término de $\gamma\dot{r}$ representa la fuerza de amortiguamiento del movimiento del electrón y hace que la amplitud de vibración del dipolo sea siempre finita.

Considerando que el campo eléctrico de la onda monocromática está dado por $\mathbf{E}(t) = \mathbf{E}_0 e^{-i\omega t} + \mathbf{E}_0^* e^{+i\omega t}$, la solución de la ecuación de movimiento del electrón está dada por (Boyd, 2008):

$$r(t) = -e \frac{E_0}{m} \frac{e^{-i\omega t}}{\omega_0^2 - \omega^2 - i\omega\gamma} + c. c., \quad (2)$$

donde ω_0 es la frecuencia natural o de resonancia del resorte dada por $\omega_0^2 = \frac{k}{m}$.

La oscilación de las cargas que ocurre en un material se puede describir por medio de la polarización P que representa la suma de los momentos dipolares atómicos por unidad de volumen, $P = -Ner$, siendo N la densidad de osciladores por unidad de volumen. Por lo tanto

$$P = \frac{Ne^2 E_0}{m} \frac{e^{-i\omega t}}{\omega_0^2 - \omega^2 - i\omega\gamma}. \quad (3)$$

Desde un punto de vista macroscópico la polarización lineal de un medio isotrópico y homogéneo está dada por

$$P(\omega) = \epsilon_0 \chi^{(1)}(\omega) E(\omega), \quad (4)$$

en donde ϵ_0 es la permitividad del vacío y $\chi^{(1)}$ es la susceptibilidad eléctrica de primer orden del medio. La ecuación (4) nos dice que el grado de polarización de un material depende linealmente con el campo eléctrico al cual está sujeto. A mayor susceptibilidad de un material, mayor será su habilidad para polarizarse con el campo eléctrico. De las ecuaciones (3) y (4) se puede obtener que la susceptibilidad de primer orden está dada por

$$\chi^{(1)}(\omega) = \frac{Ne^2}{m\varepsilon_0} \frac{1}{\omega_0^2 - \omega^2 - i\omega\gamma}. \quad (5)$$

2.1.2 Régimen no lineal

Cuando el campo incidente es muy intenso, el desplazamiento de las cargas ya no es proporcional al campo local incidente \mathbf{E}_0 . Un campo electromagnético muy intenso induce dipolos que oscilan anarmónicamente con la frecuencia del campo incidente. El movimiento anarmónico de los dipolos emite radiación electromagnética a nuevas frecuencias, generando así los fenómenos no lineales.

En el modelo de Lorentz, cuando la intensidad del haz incidente es alta, lo suficiente para que el resorte deje de actuar de forma lineal, la fuerza de restitución del resorte está dada por $F = -kr - k_2r^2 - \dots - k_jr^j$ y por tanto la ecuación de movimiento del electrón es

$$-kr + k_2r^2 + \dots + k_jr^j + m\gamma\dot{r} + eE(t) = m\ddot{r}, \quad (6)$$

cuya solución es la combinación lineal

$$r(t) = r_0e^{-i\omega t} + r_1e^{-i2\omega t} + \dots + r_{j-1}e^{-ij\omega t}. \quad (7)$$

En esta solución se observa el comportamiento no lineal del resorte mediante la generación de j -armónicos proporcionales a la frecuencia fundamental ω de la onda incidente. La contribución al desplazamiento del electrón en cada armónico generado está dada por las variables, r_0, r_1 , etc., las cuales están en función de la frecuencia de oscilación ω y de la frecuencia natural ω_0 de los dipolos.

En este caso, la polarización macroscópica se representa mediante una expansión en serie de Taylor de la forma

$$P = \varepsilon_0 \left(\chi^{(1)} \cdot E_0 e^{-i\omega t} + \chi^{(2)} : E_0^{(2)} e^{-i2\omega t} + \dots + \chi^{(j)} E_0^{(j)} e^{-ij\omega t} \right), \quad (8)$$

donde $\chi^{(j)}$ son los tensores de susceptibilidad no lineal de orden j para $j \geq 2$. La polarización total del medio equivale a la suma de la polarización lineal P_l y la polarización no-lineal

$$P = P_l + P_{nl} \quad , \quad (9)$$

donde P_{nl} está compuesta por polarizaciones de distinto orden mayor a uno

$$P_{nl} = P^{(2)} + P^{(3)} + \dots \quad (10)$$

cuyos términos $P^{(2)}$, $P^{(3)}$, etc., están dados por

$$\mathbf{P}^{(j)}(j\omega) = \varepsilon_0 \chi^{(j)} : \mathbf{E}_0^{(j)} e^{-ij\omega t}. \quad (11)$$

Los valores de $\chi^{(j)}$ disminuyen rápidamente conforme aumenta j , por lo que cada armónico decrece rápidamente en intensidad. Esto ocasiona que entre más alto sea el orden de la no linealidad presente, la intensidad de la onda incidente debe ser mayor, dificultando la generación de señales no lineales intensas.

Los procesos ópticos se clasifican de acuerdo al orden de la susceptibilidad eléctrica presente el medio ($\chi^{(1)}, \chi^{(2)}, \chi^{(3)} \dots \chi^{(n)}$). Por ejemplo, una $\chi^{(1)}$ origina fenómenos ópticos de primer orden o lineales, tales como la absorción, la reflexión y la dispersión. Una $\chi^{(2)}$ origina procesos no lineales de segundo orden, tales como el efecto Pockels, la mezcla de tres ondas y la generación del segundo armónico. Mientras que una $\chi^{(3)}$ origina procesos no-lineales de tercer orden, como el efecto Kerr, el efecto Raman, la mezcla de cuatro ondas, la generación del tercer

armónico, el auto enfocamiento y la conjugación de fase.

2.1.3 Generación del segundo armónico

Con la invención del láser en la década de los 60's, se fortaleció la idea de controlar la luz para su aplicación en diversos campos, originando la investigación de métodos más rápidos y eficientes de generación, transmisión, manipulación y detección de luz en diversos intervalos de longitudes de onda. Puesto que el láser es la única fuente capaz de crear luz lo suficientemente intensa para observar fenómenos no lineales, el primer experimento en óptica no lineal fue la generación del segundo armónico realizado en 1961 (Franken et al., 1961), un año después de la invención del láser. El experimento consistió en generar luz del doble de la frecuencia de emisión de un láser de rubí usando un cristal de cuarzo, convirtiendo su longitud de onda de 694 nm a 347 nm. Cabe mencionar que los principales láseres comerciales utilizados para la generación de procesos no-lineales fueron los láseres de diodo que producen radiación continua, los de Nd:YAG con Q-switch capaces de producir pulsos de nanosegundos. Hoy en día los láseres de modos amarrados de Ti:Za son el caballo de batalla para estos fines, los cuales son capaces de producir pulsos ultracortos en el régimen de picosegundos y de femtosegundos, obteniendo intensidades pico de hasta algunos cientos de TW/cm².

El proceso óptico no lineal que nos interesa en esta tesis es la generación del segundo armónico (GSA), que es un proceso no lineal de segundo orden mediante el cual se duplica la frecuencia de una onda monocromática incidente. Sin embargo, es importante considerar que los procesos no lineales de segundo orden son difíciles de obtener debido a la dispersión del índice de refracción, que provoca que las ondas que se generan a lo largo del medio no lineal a una frecuencia diferente de la señal incidente se desfasen entre sí e interfieran destructivamente, haciendo deficiente el proceso de conversión de frecuencias.

La intensidad de la generación del segundo armónico, $I_{2\omega}$, en función de la longitud, L , del medio que lo genera está dada por la siguiente expresión (Robles Agudo, 2005):

$$I_{2\omega}(L) \propto \left[\frac{\omega L \chi_{ef}^{(2)}}{n_{2\omega} c} \right]^2 I_{\omega}^2 \text{sinc}^2 \left(\frac{\Delta k L}{2} \right), \quad (12)$$

donde ω es la frecuencia angular de la onda incidente, $\chi_{ef}^{(2)}$ es la susceptibilidad efectiva de segundo orden del material dependiente del estado de polarización de las ondas involucradas en el proceso, $n_{2\omega}$ es el índice de refracción del medio a la frecuencia 2ω , c es la velocidad de la luz, I_{ω} es la intensidad de la onda incidente. $\Delta k = k_{2\omega} - 2k_{\omega}$, es la magnitud del momento resultante entre la diferencia del vector de onda de la luz incidente, k_{ω} , y el vector de onda de segundo armónico generada, $k_{2\omega}$, cuyas magnitudes están dadas por $k_{\omega} = n_{\omega} \omega / c$ y $k_{2\omega} = n_{2\omega} \omega / c$, respectivamente, con n_{ω} como el índice de refracción a la frecuencia fundamental ω . El término $\text{sinc}^2 \frac{\Delta k L}{2}$ modula la intensidad del segundo armónico resultante del defasamiento $\Delta k L / 2$ adquirido entre las ondas del segundo armónico, generadas a lo largo del medio no lineal de longitud L , y la onda incidente, ambas ondas generalmente se propagan en forma colineal. La máxima conversión del segundo armónico se obtiene cuando, $\Delta k L = 0$ y ocurre cuando los índices de refracción del medio a las frecuencias ω y 2ω son iguales ($n_{\omega} = n_{2\omega}$). A esta condición se le conoce como emparejamiento de fases entre las ondas.

Es imposible que se cumpla la condición para el emparejamiento de fases en medios isotrópicos ya que el índice de refracción depende de la longitud de onda (dispersión). Sin embargo, esta condición sí se puede cumplir en medios anisótropos como los cristales uniaxiales (Ducuing et al., 1963). Estos cristales se caracterizan por tener dos índices de refracción, el extraordinario, n_e , y el ordinario n_o , y por consiguiente una birrefringencia $\Delta n = n_e - n_o$. Ambos índices, además de depender de la frecuencia, dependen de la dirección de propagación y del

estado de polarización de las ondas. Por lo tanto, es posible encontrar condiciones bajo las cuales el índice ordinario (o extraordinario) a la frecuencia fundamental sea igual al índice extraordinario (u ordinario) del segundo armónico, utilizando métodos de sintonización con los que se varía uno o los dos índices de refracción, por ejemplo mediante cambios en la temperatura del medio o variando el ángulo de incidencia de la luz. Con empatamiento de fases, el intervalo de longitudes de onda que se genera en un material depende de la birrefringencia del material que por lo general no es muy grande, como consecuencia este intervalo es limitado (Armstrong et al., 1962).

2.1.3.1 Generación del segundo armónico desde el punto de vista cuántico

Desde el punto de vista de la mecánica cuántica, un medio que responde no linealmente aniquila y crea fotones. Para el caso específico de la generación del segundo armónico, la aniquilación de dos fotones que tienen una misma energía $\hbar\omega$ donde $\hbar = h/2\pi$ y h es la constante de Planck, provoca la creación de un fotón que tiene el doble de energía, como se muestra en la Figura 2. Esta transformación cumple en todo momento las siguientes leyes de conservación de la energía y del momento:

$$\hbar\omega + \hbar\omega = \hbar 2\omega, \quad (13)$$

y

$$\hbar\mathbf{k}_\omega + \hbar\mathbf{k}_\omega = \hbar\mathbf{k}_{2\omega}, \quad (14)$$

donde $\mathbf{k}_\omega = \hat{s}n_\omega \omega/c$ es el vector de onda del haz incidente y \hat{s} es el vector unitario que indica la propagación del fotón. En un caso colineal, la conservación del momento implica que $\hbar\frac{\omega}{c}n_\omega + \hbar\frac{\omega}{c}n_\omega = \hbar\frac{2\omega}{c}n_{2\omega}$ y por tanto que $n_\omega = n_{2\omega}$. En otras palabras que exista al condición perfecta de empatamiento de fases.

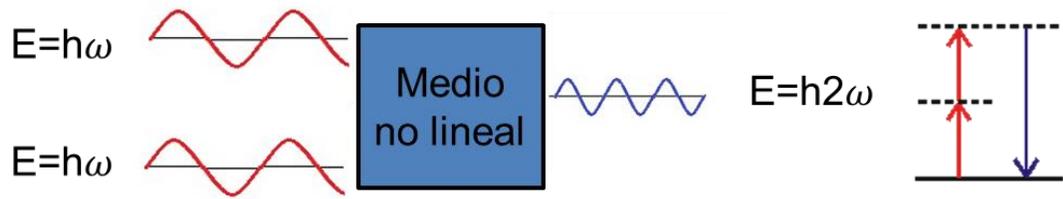


Figura 2. Generación del segundo armónico GSA desde el punto de vista cuántico.

2.1.3.2 Generación de segundo armónico en microscopía no lineal

La microscopía de segundo armónico en materiales biológicos ocurre por lo general sin que se cumpla la condición perfecta para el empatamiento de fases, $\Delta k = 0$. No obstante, como ya se mencionó en el capítulo de introducción, para realizar microscopía no lineal se utilizan haces de pulsos ultra cortos fuertemente enfocados en el material. Dicho enfocamiento concentra la interacción entre los haces excitante y de segundo armónico en una región lineal del orden de la longitud de la onda de excitación $L_f \rightarrow \lambda$ (en este caso dada por la resolución axial). Esta región mínima de interacción, garantiza que los efectos de modulación por desfaseamiento sean minimizados $\Delta k L_{foco} \rightarrow \Delta n \approx 10^{-3}$.

Considerando lo anterior y agregando el carácter pulsado del haz, la ecuación (12) puede expresarse como (Campagnola, et al., 2002):

$$I_{2\omega} \propto \left[\frac{\rho}{a\tau} \right]^2 \tau (\chi^{(2)})^2 a, \quad (15)$$

donde, ρ es la energía del pulso de luz láser, a es el área de enfoque y τ es el ancho del pulso. Las componentes tensoriales de la susceptibilidad no lineal de segundo orden, $\chi^{(2)}$, depende de la estructura cristalina (o molecular) del medio y

de la polarización de la luz.

De la ecuación (15) se pueden deducir dos características importantes, la primera es la dependencia cuadrática con la intensidad de la radiación incidente, $\frac{\rho}{a\tau} \left[\frac{\text{energía}}{\text{área} \times \text{tiempo}} \right]$, donde se puede apreciar que a menor área de enfoque (y/o ancho del pulso) mayor la intensidad incidente y por ende mayor intensidad de segundo armónico. La segunda característica es que el segundo armónico es inversamente proporcional al ancho del pulso, esto es a menor tiempo de duración de un pulso, mayor la señal de segundo armónico.

2.2 El Colágeno

En los organismos multicelulares, muchos de los elementos estructurales más importantes están en la matriz extracelular. El componente proteico más abundante de esta matriz es el colágeno. El colágeno es el elemento estructural fibroso mayoritario en los mamíferos, estando presente en cartílago, tendón, piel, hueso, pulmón, vasos sanguíneos, etc., y sirve para mantener unidas a las células en los distintos tejidos. La familia del colágeno engloba a una serie de proteínas con unas características comunes. Por un lado, presentan dominios o regiones de triple hélice, combinadas de diferentes maneras con regiones globulares amplias o con regiones no helicoidales.

Las moléculas de colágeno fibroso presentan una síntesis intracelular compleja siendo secretadas posteriormente a la matriz extracelular. Ya en el espacio extracelular, se modifican, se agregan las moléculas y se forma una estructura especializada. Dicha estructura especializada hace que el colágeno fibroso sea un material altamente ordenado disponiéndose una forma estrictamente paralela. El ejemplo más típico de este ordenamiento se puede apreciar en tendones, conformado por fibrillas de colágeno alineadas paralelamente con el eje longitudinal al eje del tendón. En otros tejidos como la dermis, el colágeno forma fibras que se entrelazan sin mucha cohesión y se

extienden en todas direcciones, permitiendo la oposición a las tracciones ejercidas desde múltiples direcciones. En la córnea, las fibras de colágeno se organizan en mayas formando capas de fibras perfectamente paralelas que es son casi cristalinas y, por tanto, transparente. El conocimiento de la biosíntesis, la estructura molecular y el proceso de auto-ensamble del colágeno resulta de gran importancia para lograr entender procesos patológicos ligados con enfermedades humanas.

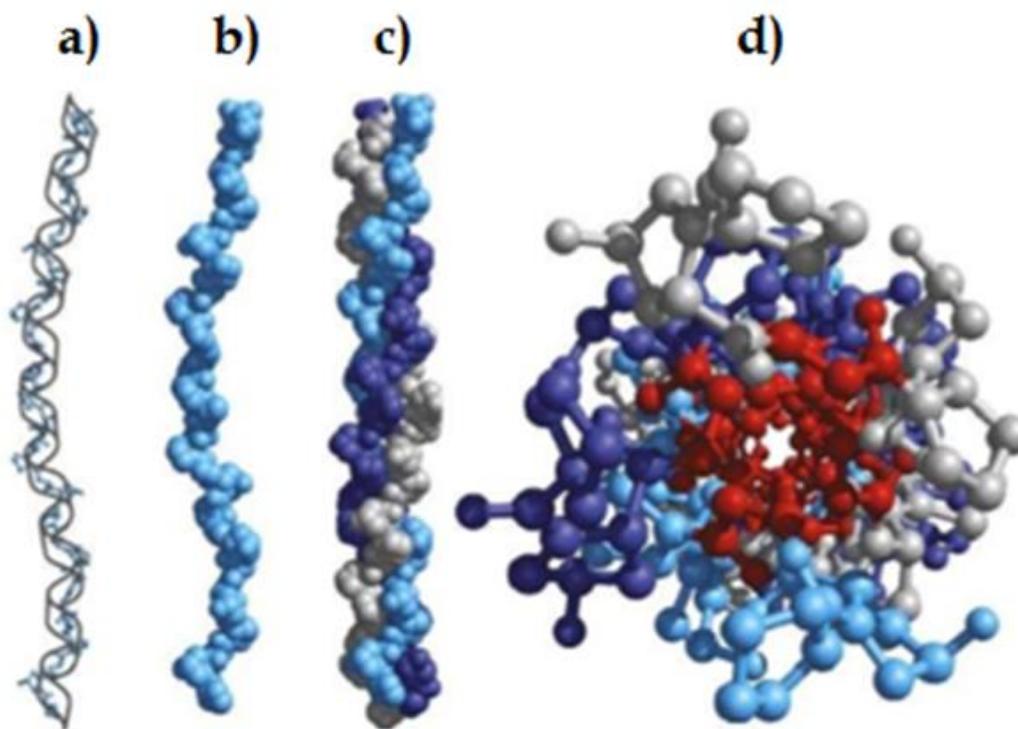


Figura 3. Estructura del colágeno. (a) La secuencia repetitiva del tripeptido Gly-X-Y adopta una estructura helicoidal levógira (cadena- α) con tres residuos por vuelta. (b) Modelo de esferas de la hélice de colágeno mostrada en (a). (c) Tres de estas cadenas- α se enrollan entre ellas de forma dextrógira. La molécula con estructura cuaternaria de tres cadenas resultante se conoce como tropocolágeno. (d) super-hélice de tres cadenas del colágeno vista desde un extremo en una representación de esferas y varillas. Imagen obtenida de “Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares, De Paz Lugo, P. 2006, pp. 27”

2.2.1 Estructura del colágeno

Las fibras de colágeno están constituidas por tres cadenas polipeptídicas, conocidas como cadenas- α , dispuestas en paralelo y enrolladas entre sí helicoidalmente (ver Figura 3 a-c). La molécula de colágeno posee una composición de aminoácidos característica e inusual, pues una tercera parte de sus aminoácidos son residuos de glicina y una cuarta parte, prolina. Además, muchos residuos de prolina y de lisina están modificados covalentemente, dando lugar a 4-hidroxiprolina (Hyp), 3-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina (Hyl). Hay que resaltar que en el código genético no aparecen acomodadas ni la hidroxiprolina ni la hidroxilisina, estos aminoácidos se incorporan en las cadenas polipeptídicas como prolina y lisina y son hidroxilados² después de haber sido sintetizado el colágeno. En realidad, los polipéptidos del colágeno están formados por una secuencia que se repite de forma regular e ininterrumpida (ver Figura 3 a), en la que aparece un residuo de glicina cada tercer aminoácido. Esta secuencia se puede escribir como $(Gly - X - Y)_n$, donde X es con frecuencia prolina, Y es con frecuencia 4-hidroxiprolina y $n \sim 340$.

Como las cadenas de tropocolágeno forman hélices con tres residuos por vuelta, cada tercer residuo de una de las hélices se sitúa muy cerca de las otras dos cadenas. Estos contactos tan próximos, que se dan a lo largo del eje central de la triple hélice, dejan un espacio tan pequeño que solamente puede adaptarse allí el átomo de hidrógeno que constituye la cadena lateral de la glicina; cualquier otra cadena lateral más voluminosa separaría las tres hebras de la molécula de tropocolágeno. Este cruzamiento inter-catenario explica la necesidad absoluta de que en cada tercera posición de una cadena polipeptídica de colágeno se halle un resto de glicina. También precisa que las tres cadenas peptídicas se hallen alternadas de modo que los restos Gly , X e Y , de las tres cadenas, se encuentren

² **Hidroxilación:** Reacción química en la que se introduce un grupo hidroxilo (OH) en un compuesto reemplazando un átomo de hidrógeno, oxidando al compuesto.

a niveles semejantes, de manera que los enlaces de hidrógeno intercatenarios se establecen entre los hidrógenos amídicos de los residuos de glicina de una cadena y el oxígeno carbonílico de un residuo, normalmente la prolina, en la posición X del triplete $(Gly - X - Y)_n$ de una cadena adyacente. El pequeño tamaño de la glicina otorga a este residuo un papel esencial no sólo en el colágeno, sino también en otras muchas proteínas.

Los residuos de prolina son también vitales para la estructura del tropocolágeno. Los anillos de pirrolidina de los residuos de prolina se repelen entre sí por impedimentos estéricos³, situándose en la superficie de la molécula (ver Figura 4) y forzando a la cadena polipeptídica a formar una hélice levógira muy estirada y delgada.

³ **Impedimento estérico:** Efecto producido cuando el volumen ocupado por parte de una molécula impide que otra parte de la misma reaccione químicamente.

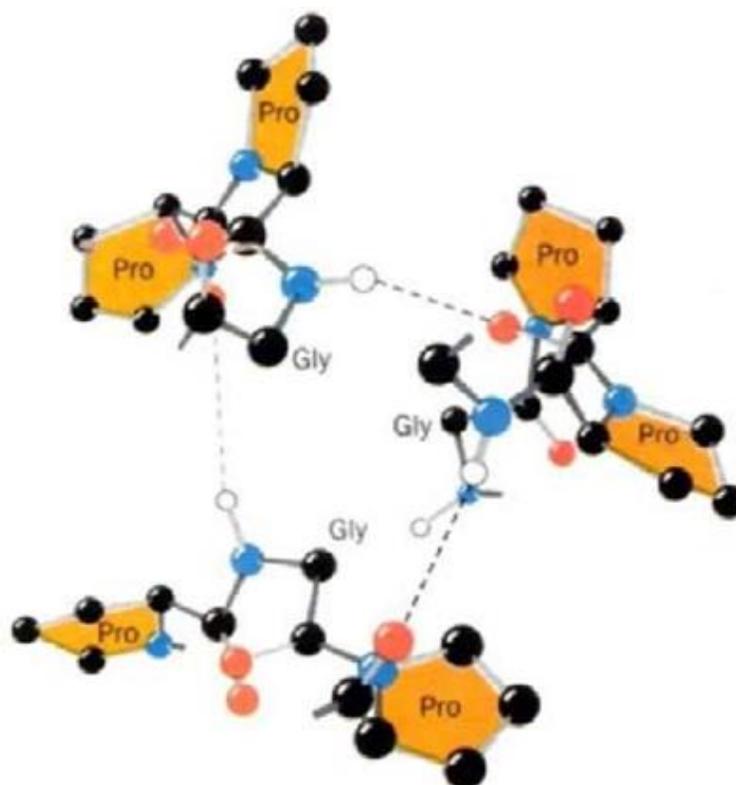


Figura 4. Esquema que representa una proyección descendente del eje de la triple hélice del polímero (Gly—Pro—Pro), análogo al colágeno, contemplada desde su extremo carboxilo. Los restos de cada cadena Gly—X—Y se hallan alternados verticalmente de modo tal que un resto Gly, un X y un Y de cadenas diferentes se hallan al mismo nivel a lo largo del eje de la hélice. Las líneas discontinuas representan enlaces de hidrógeno entre cada grupo NH de glicina y el oxígeno del resto X siguiente situado en una cadena vecina. Cada tercer residuo de cada cadena debe ser glicina ya que no hay espacio cerca del eje de la hélice para la cadena lateral de cualquier otro residuo. Gracias al pequeño tamaño de su cadena lateral, un residuo de glicina puede adoptar muchas conformaciones que estarían estéricamente prohibidas para otros aminoácidos. Las cadenas laterales voluminosas de los restos de prolina están situadas sobre la periferia de la triple hélice en donde no se hallan obstaculizadas espacialmente. Imagen obtenida de “Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares, De Paz Lugo, P. 2006, pp. 30”

2.2.2 Fibrogénesis: Proceso de autoensamble del colágeno

La biosíntesis de las cadenas- α del tropocolágeno y su ensamblaje para generar fibras de colágeno transcurre en una secuencia de etapas bien ordenadas que ilustran a la perfección el proceso de maduración de una proteína a través de la modificación química. Se trata de un complejo proceso que requiere de al menos ocho enzimas específicas y otras más enzimas inespecíficas. La mayor parte de la información acerca de la biosíntesis y el ensamblaje del colágeno proviene de estudios sobre la biosíntesis del colágeno tipo I, el cual es el tipo de colágeno que se utiliza en nuestros experimentos y que probablemente sirve como paradigma para el resto de los tipos de colágeno, dado que de los hasta ahora veintiocho tipos de colágeno existentes, es el único que forma fibrillas de un espesor de alrededor de 100nm y cuya función principal es proporcionar rigidez en el tejido.

El proceso de autoensamble del colágeno inicia luego de que el pro-colágeno (percursor de los monómeros de colágeno) es sintetizado intracelularmente y secretado a la matriz extracelular (Kadler, 1996) como se muestra en la Figura 5. Ya en la matriz extracelular, las moléculas triple-helicoides de pro-colágeno sufren un cribado enzimático en sus partes no helicoidales favoreciendo la generación de enlaces intermoleculares covalentes transversales (*Cross-Linking*, en inglés). Mediante este proceso las moléculas (monómeros) de colágeno se empaquetan en forma escalonada y periódica formando estructuras sub-micrométricas llamadas fibrillas, mismas que siguen ensamblándose hasta formar parte del tejido conectivo, tendones, ligamentos, huesos, córnea, etc. Dichos enlaces covalentes son originados endógenamente (en forma natural en el cuerpo) mediante una oxidación enzimática que ocurre en los residuos de lisina localizados específicamente en las extremidades no helicoidales de la molécula del colágeno. Cuando estos procesos enzimáticos no están presentes el proceso de auto-ensamble es afectado y, consecuentemente, ocurren ciertas enfermedades en el tejido humano, tales como el queratocono en la córnea (Wachler, 2005) por mencionar un ejemplo.

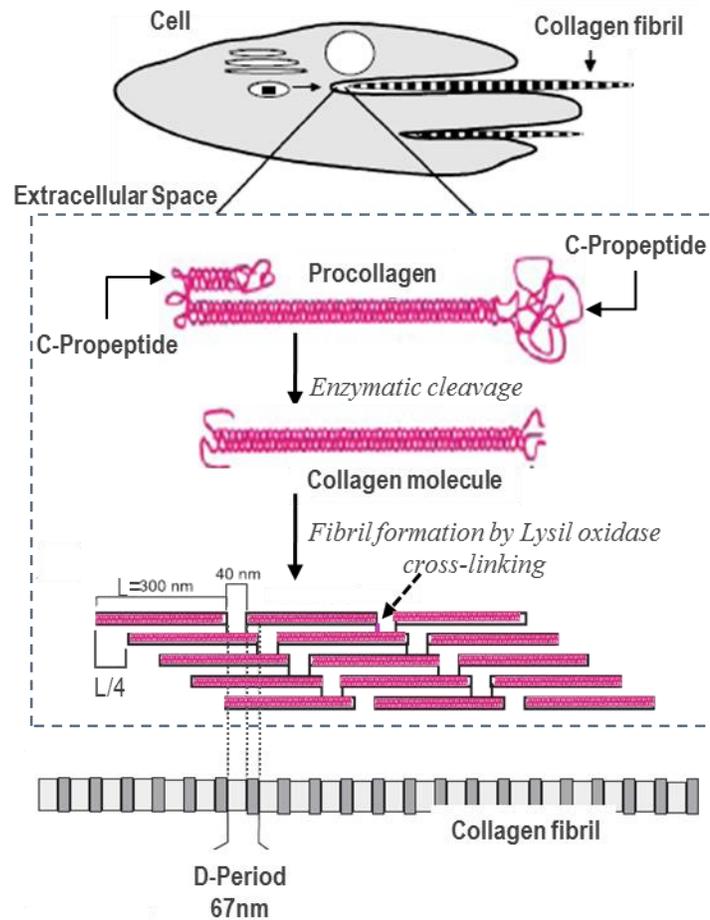


Figura 5. Proceso de auto-ensamble del colágeno. Figura adaptada de Kadler, et. al (Kadler, 1996) and Gelse et. al (Gelse, 2003).

2.3 Generación de segundo armónico del colágeno

La microscopía de segundo armónico permite visualizar de manera eficiente la distribución tridimensional (3D) del colágeno fibroso en los tejidos biológicos (Campagnola, et al., 2002) (Zipfel, et al., 2003). Generalmente se utiliza una polarización circular incidente ya que permite obtener imágenes de las fibrillas independientemente de su orientación en el plano focal. Sin embargo, el colágeno

fibroso exhibe, en su estructura, una anisotropía que es necesario tomar en cuenta y/o caracterizar. Para este propósito, la polarización del GSA proporciona información complementaria sobre la dirección molecular dentro del volumen focal. Esta relación depende de la orientación de las triples hélices de colágeno y de la orientación de los dipolos no lineales que lo componen (a lo largo de los enlaces peptídicos) dentro de la triple hélice. Por lo tanto, proporciona información sobre el ordenamiento de las moléculas de colágeno dentro del volumen focal.

Considerando la interacción óptica no lineal de un haz láser incidente con fibras de colágeno tipo I, la polarización inducida en el medio por el campo eléctrico \mathbf{E} está dada por (Freund & Deutsch., 1986), (Gusachenko, et al., 2010):

$$P_I = \chi_{IJ}^{(1)} E_J + \chi_{IJK}^{(2)} E_J E_K, \quad (16)$$

donde se consideran sólo los tensores de primer y segundo orden de susceptibilidad eléctrica. Se asume comúnmente que las fibras de colágeno tipo I, presentes en tendones, tiene una simetría cilíndrica (simetría c_{6v} o $c_{\infty mm}$) en la dirección de las fibras, mismo que coinciden con el eje principal de las moléculas de colágeno (Erikson, et al., 2007), (Rocha Medoza, et al., 2007). Esta simetría reduce el número de coeficientes no lineales $\chi_{IJK}^{(2)}$, diferentes de cero a sólo cuatro $\chi_{xxx}^{(2)}, \chi_{xyy}^{(2)} = \chi_{xzz}^{(2)}, \chi_{yyx}^{(2)} = \chi_{zzz}^{(2)} = \chi_{yxx}^{(2)} = \chi_{zzx}^{(2)}$ y $\chi_{yzx}^{(2)} = -\chi_{zyx}^{(2)} = -\chi_{zxy}^{(2)} = \chi_{zyz}^{(2)}$. Sin embargo, en experimentos de segundo armónico, sobre todo en microscopía no lineal, se considera que el vector del campo eléctrico incidente sólo yace en un plano dentro del sistema coordenado (x, y, z) , esto excluye los coeficientes $\chi_{yzx}^{(2)} = -\chi_{zyx}^{(2)} = -\chi_{zxy}^{(2)} = \chi_{zyz}^{(2)}$. De igual forma, ya que usualmente la frecuencia de la luz excitante no tiene resonancias electrónicas en el medio, se asume que la simetría Kleiman es válida en cuyo caso $\chi_{xxy}^{(2)} = \chi_{xyx}^{(2)}$. Con las aproximaciones anteriores, las componentes no lineales distintas a cero del tensor de susceptibilidad $\chi_{IJK}^{(2)}$ en la

ecuación (16) se reducen a sólo dos: $\chi_{xxx}^{(2)}$ y $\chi_{xyy}^{(2)} = \chi_{xzz}^{(2)} = \chi_{yyx}^{(2)} = \chi_{zzx}^{(2)}$, donde x representa el eje principal (a lo largo) del tendón.

Si se considera un haz de luz láser propagándose en la dirección z , perpendicular al eje de las fibras (eje x) con una polarización lineal a un ángulo α del tendón sobre el plano xy , el campo eléctrico se expresa como: $E_x^\omega = E_0 \cos \alpha$ y $E_y^\omega = E_0 \sin \alpha$ cerca del foco e induce una polarización de GSA (Gusachenko, et al., 2010):

$$P_{2\omega,x} \propto (\chi_{xxx}^{(2)} \cos^2 \alpha + \chi_{xyy}^{(2)} \sin^2 \alpha) E_0^2, \quad (17)$$

$$P_{2\omega,y} \propto (\chi_{xyy}^{(2)} \sin 2\alpha) E_0^2. \quad (18)$$

La no linealidad de segundo orden en colágeno se estima mediante la razón entre las dos componentes tensoriales de segundo orden como, $\rho = \chi_{xxx}^{(2)} / \chi_{xyy}^{(2)}$; esta razón se utiliza para estimar el grado de ordenamiento entre las moléculas de colágeno dentro del volumen focal (Williams, et al., 2005), asimismo mide la razón entre la señal de GSA a lo largo de la fibra y perpendicular a ésta. Experimentalmente el valor de ρ ha sido estimado en un rango de 1.2 a 2.6 (Roth & Freund, 1979) (Williams, et al., 2005) (Rocha Medoza, et al., 2007). Asimismo, (Erikson, et al., 2007) obtiene un valor de $\rho = 1.87$ y mediante cálculos numéricos encuentra valores de $d_{333} = \frac{\chi_{xxx}^{(2)}}{2} \approx 0.15 \text{ pm/V}$ y $d_{122} = \frac{\chi_{xyy}^{(2)}}{2} \approx 0.08 \text{ pm/V}$, respectivamente. No obstante, dado que los valores de ρ reportados son muy amplios, no existe todavía un consenso de los valores de d_{333} y d_{122} .

Entonces, definiendo el parámetro K , el cual es un valor constante que incorpora varios parámetros tales como la forma geométrica de las moléculas y el cuadrado de la intensidad excitante (ver ecuación (15)). Se tiene que la intensidad de GSA detectada para cada polarización será:

$$I_x^{2\omega} = K |\rho \cos^2 \alpha + \sin^2 \alpha|^2, \quad (19)$$

$$I_y^{2\omega} = K|2\sin \alpha \cos \alpha|^2. \quad (20)$$

Los diagramas polares resultantes de las ecuaciones (19) y (20) se muestran en la Figuras 6 a) y b), respectivamente, donde el ángulo polar es el ángulo de la dirección de la polarización α y se considera un valor de $\rho=1.4$ (Bancelin, et al., 2012). La Figura 6 c) muestra la dependencia polar típica de la generación de segundo armónico de una fibra de colágeno, la cual es la suma de las intensidades $I_x^{2\omega} + I_y^{2\omega}$. En efecto, en la realización de microscopía de segundo armónico en colágeno, comúnmente no se utiliza un polarizador para separar las señales $I_x^{2\omega}$ y $I_y^{2\omega}$. Cabe mencionar que un método común para determinar ρ experimentalmente es ajustar $I_x^{2\omega}$ usando la ecuación (19). Sin embargo esta aproximación no es exacta ya que entran en juego efectos de birrefringencia, polarización y absorción los cuales cambian la forma de las gráficas polares.

2.3.1 Efectos de birrefringencia, polarización cruzada y diatenuación⁴

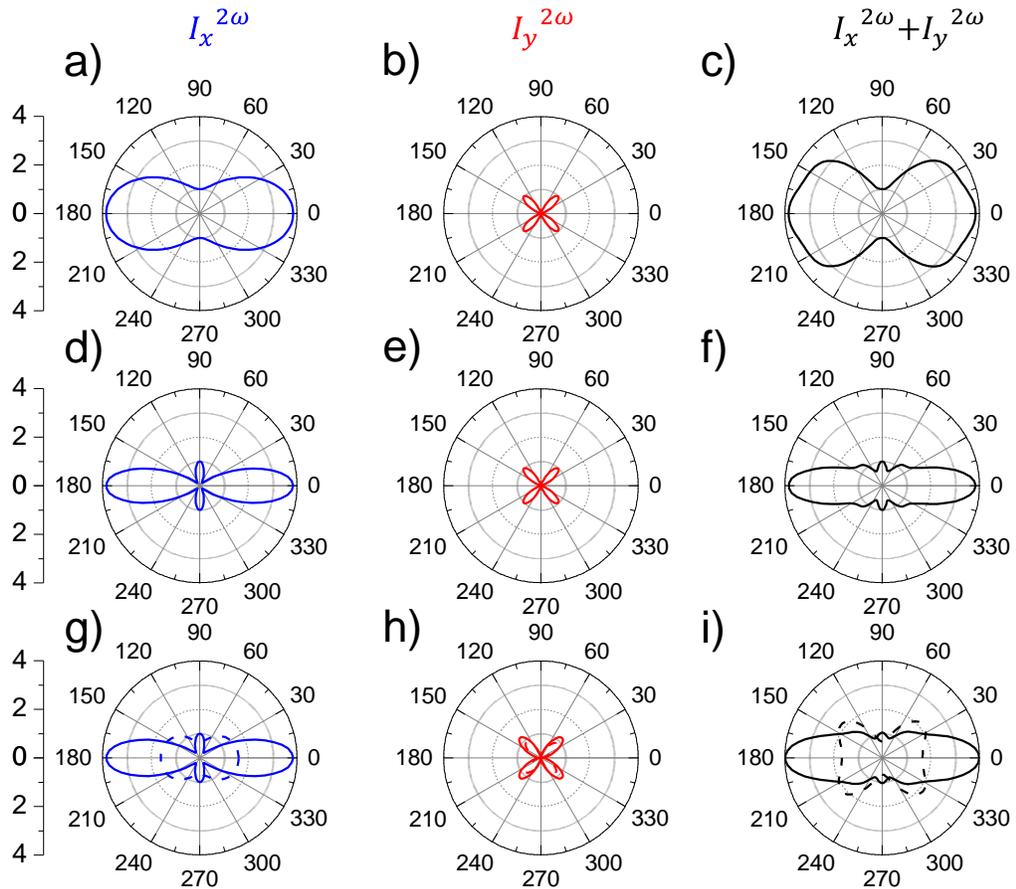


Figura 6. (a)-(c) Dependencia polar de la intensidad del GSA en colágeno. Intensidades en la dirección x (línea azul), la dirección y (línea roja) y total (línea negra), simuladas a una profundidad de $z = 0.05\mu m$, sin birrefringencia; (d)-(f) con profundidad de $z = 0.05\mu m$ y birrefringencia $\Delta n = 6.6 \times 10^{-3}$; (g-i) con birrefringencia $\Delta n = 6.6 \times 10^{-3}$, polarización cruzada $\eta_{xy} = 0.13$ y $\eta_{yx} = 0.2$, constantes de diatenuación $l_a^o = 190\mu m$ y $l_a^e = 91\mu m$ a una profundidad de $z = 0.05\mu m$ (líneas continuas) y $z = 20\mu m$ (líneas segmentadas).

En la sección anterior se asumió a la fibra de colágeno como un medio óptico perfecto por lo que la generación de segundo armónico simulada en la Figura a-c corresponde a un medio ideal, homogéneo, no birrefringente, no dispersivo y sin absorción. Sin embargo, como en la mayoría de las proteínas

⁴ Traducción en inglés de “diattenuation”, la cual es la propiedad de un material cuya transmitancia depende de la polarización de la luz.

fibrosas, las fibras de colágeno son medios, birrefringentes y dispersivos, por lo tanto, la propagación de la señal no lineal generada puede ser afectada al viajar a través del tejido cambiando su estado de polarización y la afectar la magnitud de su intensidad por efectos de esparcimiento, atenuación y de interferencia destructiva.

Efectos de birrefringencia: Las fibras de colágeno natural exhiben una simetría c_{6v} , por lo tanto el tensor de permitividad $\epsilon_0(1 + \chi_{ij}^{(1)})$ tiene dos componentes diferentes y por consiguiente un tendón natural es análogo a un cristal uniaxial birrefringente. Se conoce que la birrefringencia $\Delta n = n_e - n_o$ alcanza en el tendón un valor de $5 - 7 \times 10^{-3}$. Como consecuencia, las componentes del campo x (onda extraordinaria) y del campo y (onda ordinaria) sufren un retardo relativo de fase cuando se propagan sobre el tendón y causa un cambio en el estado de polarización tanto de la onda incidente como de la de segundo armónico.

Efectos de polarización cruzada: los mismos efectos de birrefringencia tiene otros efectos secundarios, cuando una onda con una polarización bien definida se propaga en un medio anisotrópico, la dirección de polarización es rotada ligeramente y, como consecuencia, una pequeña cantidad de luz de GSA que inicialmente se origina lo largo del eje- x , luego de sufrir una rotación interfiere con luz GSA originada a lo largo del eje- y (y viceversa). Este efecto se conoce como efecto de polarización cruzada (o acoplamiento de modos cruzados).

Efectos de polarización de diatenuación: la microscopia de GSA utiliza una excitación en el infrarrojo cercano la cual minimiza la absorción y la dispersión en tejidos biológicos. Sin embargo, el esparcimiento de la luz y la aberración esférica causan decaimiento de la señal de propagación en el foco, lo que da lugar a una excitación de intensidad menor y una señal de GSA débil. Por simplicidad, se asume que la intensidad de excitación se atenúa de forma exponencial con la profundidad. Dada la anisotropía del tendón, la atenuación de $I_x^{2\omega}$ y $I_y^{2\omega}$ son diferentes y la luz de excitación experimenta diatenuación. La diatenuación se

denota con los coeficientes de diatenuación, l_a^e y l_a^o para considerar la simetría uniaxial del tendón. Se asume que la diatenuación de la señal de la GSA es despreciable porque la señal de detección no es muy sensible al esparcimiento de la luz y a aberraciones, además las longitudes de propagación, z (típicamente el grosor de las fibras), suelen ser mucho menor al valor de los coeficientes de diatenuación. Bajo estas condiciones, $z \ll l_a^e, l_a^o$, note que entre más grande sea el coeficiente menos atenuación sufre el haz.

Los efectos combinados de birrefringencia, polarización cruzada y diatenuación en la generación de segundo armónico en fibras de colágeno han sido estudiados recientemente por Ivan Gusachenko (Gusachenko, et al., 2010), utilizando las expresiones:

$$I_x^{2\omega}(z) = K e^{-\frac{2z}{l_a^o}} \left(\left| \rho e^{-\frac{z}{\Delta l_a}} \cos^2 \alpha e^{i\Delta\phi} + \sin^2 \alpha \right|^2 + \eta_{XY} e^{-\frac{z}{\Delta l_a}} |\sin 2\alpha|^2 \right), \quad (21)$$

$$I_y^{2\omega}(z) = K e^{-\frac{2z}{l_a^o}} \left(e^{-\frac{z}{\Delta l_a}} |\sin 2\alpha|^2 + \eta_{YX} \left| \rho e^{-\frac{z}{\Delta l_a}} \cos^2 \alpha e^{i\Delta\phi} + \sin^2 \alpha \right|^2 \right), \quad (22)$$

donde la constante K incorpora varios parámetros de la intensidad incidente (ver ecuación 15) y α es el ángulo de la dirección de la polarización. El desfaseamiento $\Delta\phi = \frac{4\pi(n_e - n_o)z}{\lambda}$ es debido a la birrefringencia en la propagación de la excitación. Los términos de acoplamiento de modos cruzados están dados por η_{XY} y η_{YX} .

Por lo general los efectos de polarización cruzada se consideran también mínimos dado a la distancia de interacción pequeña de las ondas incidentes y de segundo armónico generada. Bajo estas circunstancias la componente de intensidad de GSA no es afectada por la birrefringencia en la propagación armónica $I_y^{2\omega}(z)$. Finalmente, el argumento que aparece en el término de atenuación $e^{-\frac{z}{\Delta l_a}}$ es inversamente proporcional a la diferencia de diatenuación Δl la cual está dada por $\frac{1}{\Delta l_a} = \frac{1}{l_a^e} - \frac{1}{l_a^o}$, donde l_a^e y l_a^o son los coeficientes de diatenuación en el eje extraordinario y ordinario, respectivamente.

La influencia de la birrefringencia sobre la señal de segundo armónico para el caso de una distancia de propagación pequeña, $z = 0.05 \mu m$, y sin considerar efectos de diatenuación, ni de acoplamiento de modos cruzados, se puede observar en las Figura 6 d-f, donde se considera el valor de birrefringencia $\Delta n = 6.6 \times 10^{-3}$ y valor de $\rho=1.4$. Es posible apreciar cambios considerables en la gráfica polar de la intensidad $I_x^{2\omega}$. En cambio, prácticamente no existe influencia en la componente $I_y^{2\omega}$, tal y como se discutió anteriormente. En consecuencia la gráfica de intensidad total adquiere cuatro lóbulos, dos lóbulos pronunciados a lo largo del eje principal x y dos lóbulos de menor magnitud a lo largo del eje y . Nótese que en comparación con la Figura 6c, la Figura 6 f sufre una disminución de la intensidad para ángulos polares fuera de los ejes x e y . Este comportamiento complejo es característica para efectos de birrefringencia en muestras delgadas.

Finalmente, las Figura 6 f-i, muestran la simulación tomando en consideración los efectos de la birrefringencia, diatenuación y acoplamiento de modos cruzados sobre la señal de segundo armónico. Los valores utilizados se muestran al pie de la Figura 6. Claramente se puede apreciar que los efectos de acoplamiento de modos cruzados y diatenuación son mínimos para el caso de una longitud de propagación pequeña, $z = 0.05 \mu m$. En contraste para propagaciones mayores, por ejemplo $z = 20 \mu m$, los efectos de la birrefringencia se expresan a través del acoplamiento entrecruzado. Según simulaciones mostradas en (Gusachenko, et al., 2010) para profundidades $z = 200 \mu m$, se observa cómo las componentes x e y del haz incidente acumulan una diferencia de fase y experimentan diferentes índices ópticos cuando se propagan dentro del tendón. Así entonces, los componentes tensoriales de la respuesta no lineal interfieren de forma constructiva o destructiva dependiendo de la distancia de propagación dentro del tendón, dando como resultado franjas de interferencia en el perfil de profundidad de la señal de GSA en función de las polarizaciones x e y (simulaciones no mostradas en esta tesis).

Capítulo 3

Materiales y Métodos Experimentales

3.1 Arreglo experimental

El diseño de un microscopio de barrido láser se muestra en la Figura 7. Nótese que para la construcción de este microscopio todos los elementos usados son alineados sobre el eje óptico del sistema. Este microscopio es construido en el CICESE (microscopio no comercial) donde tanto el barrido como la resolución son característicos para cada microscopio, el cual depende del tamaño del haz de acuerdo a la óptica utilizada. Por tal motivo es necesario hacer una calibración cuyo resultado es único.

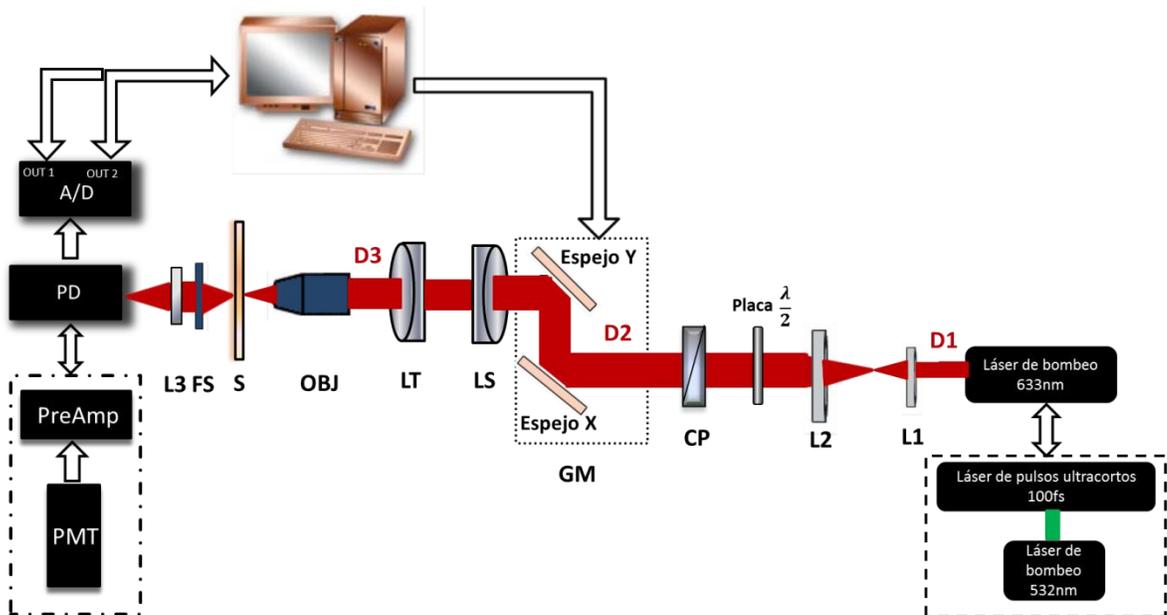


Figura 7. Esquema del arreglo experimental para la implementación de microscopía lineal y no lineal. L1, L2, CP: Cubo Polarizador, GM: Espejos galvanométricos. LS: Lente de barrido, LT: Lente de tubo, OBJ: 40X, S: Muestra, FS: Filtro de interferencia, L3: lente acromática. PD: Fotodiodo (PDA 10CS), Pre-Amp: Preamplificador, PMT: Fotomultiplicador, A/D: Tarjeta Analógica Digital.

3.1.1 Sistema de iluminación

El desarrollo de esta tesis se inicia con la construcción y caracterización de un microscopio de barrido láser por transmisión. En este caso, como fuente de luz coherente, se utiliza un láser de He-Ne de emisión continua, CW, (Melles Griot, 05-LHP-991630nm) de sólo 3 mW de potencia y longitud de onda de 632 nm. Asimismo utiliza un arreglo telescópico para amplificar el tamaño de la sección transversal del haz. El arreglo telescópico está compuesto por dos lentes plano convexas L1 y L2 con distancias focales $f_1=25.4\text{mm}$ y $f_2=125\text{mm}$, respectivamente.

Para la versión no lineal del microscopio se utiliza un oscilador láser de modos amarrados (mode-locking) de Titanio-Zafiro (Ti:Za) (CLARK-MXR, Inc., NJA-4) bombeado por un láser de estado sólido de onda continua (CW, del inglés Continuous Wave) (Spectra-Physics, Millennia Vs). Estos láseres están representados en el recuadro de líneas segmentadas de la Figura 7 (ver figura). El oscilador láser emite pulsos ultracortos con una duración de aproximadamente 100fs y una frecuencia de repetición de 100 MHz. Los pulsos emitidos tienen una longitud de onda centrada en el infrarrojo cercano con valor de 826 nm y un ancho espectral de 15nm, aproximadamente. La potencia máxima promedio a la salida del láser es de 300 mW y la potencia detrás del objetivo de microscopio fue de hasta 100 mW. El láser de bombeo emite en forma continua a una longitud de onda de 532 nm y una potencia de 5 W. Para el primer sistema telescópico de esta versión del microscopio se utilizaron dos lentes plano convexas con distancias focales $f_1=25.4\text{mm}$ y $f_2=60\text{mm}$, respectivamente. Esto debido a que en este caso el diámetro del perfil del haz fue mayor en comparación con el haz del láser de He-Ne. Con estos valores de las distancias focales la amplificación, f_2/ f_1 , es tal que se cubre el área de los espejos galvanométricos.

3.1.2 Sistema óptico de barrido

El primer arreglo telescópico es seguido por dos espejos galvanométricos (Cambridge Technology, 6210H) los cuales son controlados por una fuente regulada de voltaje (Cambridge Technology, MicroMax 67321H). Tanto el espejo **X** (primer espejo) como el espejo **Y** (segundo espejo) son conectados a los puertos de salida (out1 y out 2) de la tarjeta analógica-digital (National Instruments, BNC-2110), a través de los cuales se mandan las señales analógicas que realizan el movimiento de dichos espejos para realizar el barrido. Después de los espejos galvanométricos se coloca un segundo sistema telescópico compuesto por dos lentes acromáticas (dobletes⁵) de 50mm de diámetro, con distancias focales $f_{SL}=150$ mm y $f_{TL}=250$ mm, respectivamente (Edmund Optics, FL, VIS-NIR, Inked -- NT49-393-INK), separadas una distancia de 400mm. A la primera lente se le conoce como la lente barredora (o “de escaneo”) y a la segunda como lente del tubo (denotadas como SL y TL, en la Figura 7).

El segundo sistema telescópico realiza dos funciones importantes en el arreglo experimental: en primer lugar, forma una “imagen” del perfil del haz localizado entre los dos espejos galvanométricos justo en la parte trasera (entrada) del objetivo de microscopio. Esto garantiza pivotar el haz en esta posición manteniéndolo inamovible durante el barrido del haz y conservando así la intensidad que entra al objetivo. En segundo lugar, amplificar el tamaño del haz entrante, esto para obtener una mejor resolución. Por supuesto, el objetivo de microscopio a utilizar puede variar según la resolución óptica deseada. Para la caracterización de la resolución del microscopio de barrido por transmisión se utiliza un objetivo con magnificación de 40×, 0.5 mm de distancia de trabajo y abertura numérica de 0.65.

⁵ Combinación de dos lentes cementadas, una biconvexa (distancia focal positiva) y una bicóncava (distancia focal negativa), de diferente índice de refracción. Diseñados para cancelar la aberración de esfericidad cromática entre dos longitudes de onda separadas.

3.1.3 Sistema de detección

Como se mencionó en la introducción, la imagen se obtiene tras el barrido del haz sobre la muestra, mientras que la luz transmitida o bien generada y transmitida (para el caso de la versión no lineal del microscopio) es detectada. Para la caracterización inicial del sistema se detectó sólo la transmisión de la luz del láser de He-Ne utilizando un fotodiodo amplificador (Thorlabs PDA10CS-EC - InGaAs 17 MHz BW, 0.79 mm², 230 VAC), el cual puede detectar luz en el rango de 600 a 1800 nm. Para coleccionar luz se utiliza una lente acromática (Thorlabs LA1608- B-N-BK7), denotada como L3 en la Figura 7.

Para la versión no lineal del microscopio, dado que las señales generadas de segundo armónico (y en general de cualquier proceso no lineal) en muestras biológicas suelen ser de muy baja intensidad, se utilizan tubos fotomultiplicadores para su detección. En nuestro caso particular, la señal de GSA de las fibras de colágeno no es más que la suma coherente de la señal GSA excitada en las microfibrillas contenidas en la función de punto extendido (el foco) del haz, misma que es amplificada por interferencia constructiva en la dirección de la luz excitante. Por tanto, para lograr una mayor eficiencia en la colección, las señales no lineales son detectadas en transmisión.

Se utilizó un tubo fotomultiplicador Hamamatsu (modelo R3557) cuya ganancia es variada utilizando una fuente de alto voltaje en el rango de 500 a 1100 V. La señal de corriente multiplicada por el PMT fue convertida a una señal de voltaje utilizando un preamplificador de corriente a voltaje (Newport Instruments, 70710) denotado como PreAmp en la Figura 7. Para la detección de la señal no lineal de segundo armónico se utilizaron filtros pasabanda BG-19 y un filtro de interferencia (SEMROCK, FF01-435-25) con banda de transmisión centrada en 435 nm y un ancho espectral de 40 nm. Este filtro tiene una densidad óptica de 7 (OD 7), lo que implica que tiene una densidad óptica de siete órdenes de magnitud en la región espectral del oscilador láser utilizado para la excitación.

3.1.4 Sincronización entre el barrido y la detección

La sincronización del barrido láser y la detección fueron realizadas mediante un paquete computacional desarrollado en la Universidad de Cardiff, Reino Unido. Este programa originalmente llamado MultiCars 2 fue escrito en ambiente LabWindows CVI, un paquete computacional de National Instruments que utiliza código en lenguaje C. El mismo paquete computacional fue reprogramado para ser utilizado con las tarjetas analógicas existentes en el Laboratorio de Pulsos Ultracortos del CICESE. En breve, el programa genera dos funciones de voltaje en forma de ondas periódicas cuasi senoidales, en las cuales se toman en cuenta las velocidades máximas de barrido; según la función de transferencia de los espejos galvanométricos previamente medida (o en su caso definida). La primera onda es de mayor frecuencia que la segunda, para mover respectivamente los espejos X y Y (o viceversa), de manera que realizan un barrido de área cuadrada en el plano focal. El barrido se traduce en un mapeo digital definido por el número de píxeles tomados en cada línea (barrida con el eje rápido) y el número total de líneas (barridas con el eje lento). El paquete computacional despliega una imagen en unidades de píxeles la cual puede ser grabada como una matriz de datos para ser procesada posteriormente.

El programa puede controlar el tiempo de vuelo por píxel, en el cual se promedian las lecturas tomadas según el reloj de muestreo que soporte la tarjeta analógica (en este caso puede ser de 100 kHz o 1MHz). Por ejemplo, si se elige un tiempo de vuelo de 0.1ms y una frecuencia de muestreo de 100kHz, cada píxel tiene el promedio de 10 lecturas (o cuentas). La tarjeta analógica puede recibir rangos de voltaje de ± 10 V los cuales son convertidos a números enteros de 16 dígitos (del tipo *short int* en lenguaje C), variando de -32,768 a 32,768 en ese rango de voltaje. En esta tesis, en la mayoría de las imágenes adquiridas se utilizó un tiempo de píxel de 0.1ms. El paquete computacional tiene un área de barrido máximo definido por los límites de velocidad, según la función de transferencia de

los galvanómetros, por lo que el tamaño de la matriz depende del área de barrido y tiempo de vuelo, definidos por el usuario.

3.2 Caracterización del microscopio

Una vez construido el microscopio de barrido láser se caracteriza su resolución en el régimen lineal y su profundidad de campo (o campo de visión). Para esto se realizan las siguientes mediciones experimentales:

- 1) Medición del perfil de intensidad del haz excitante en la parte trasera del objetivo de microscopio. Esta medición tiene como objeto verificar que el tamaño del haz detrás del objetivo sea el máximo posible de manera que cubra la mayor parte de la pupila de entrada del objetivo. Como se mostrará más adelante, este tamaño está limitado ultimadamente por la amplificación del segundo sistema telescópico de la Figura 7 y el tamaño de los espejos galvanométricos.
- 2) Medición del perfil del haz y caracterización del barrido en el plano focal del microscopio. Esto con el fin de estimar la resolución espacial y caracterizar el área de barrido del microscopio. La resolución espacial está limitada por difracción según las características del objetivo de microscopio mientras el barrido está limitado de alguna manera por el paquete computacional de sincronización de barrido y detección.
- 3) Medición del campo de visión del microscopio cuyo límite puede ser definido por el ángulo máximo de deflexión de los galvanómetros, o bien, por la pupila de entrada del sistema.
- 4) Caracterización del sistema de detección compuesto por los fotomultiplicadores, la fuente de alto voltaje que regula su ganancia y el preamplificador de voltaje utilizado para convertir la señal diminuta de corriente generada por el fotomultiplicador, del orden de pico amperes ($10^{-12}A$), a señales de voltaje medibles para la tarjeta analógica digital.

- 5) Se caracterizó la señal de segundo armónico en una muestra con no linealidad óptica de segundo orden conocida. Esto con el fin de estimar el orden de la no linealidad de segundo orden en las fibras de colágeno crecidas *in vitro*.

3.2.1 Medición del perfil de intensidad del haz de excitación

Para la medición del perfil de intensidad del haz láser atrás del objetivo de microscopio se utiliza la técnica de la navaja para la cual se utiliza un medidor de potencia (Newport, 2832-C), y un microposicionador con graduación mínima de 10 micrómetros por línea. Esta técnica consiste en tomar mediciones de la potencia del haz mientras que se traslada la navaja paso a paso en dirección transversal del haz, con la ayuda del microposicionador, hasta que el haz sea completamente obturado (o viceversa). Como se mostrará en la sección de resultados, se midió el perfil del haz en distintas posiciones del arreglo experimental mostrados con las letras D1, D2 y D3, en la Figura 7. Esto es antes del primer sistema de lentes (D1), antes de los espejos galvanométricos (D2) y antes del objetivo de microscopio (D3). Siendo la última medición la de mayor interés puesto que se espera obtener el perfil máximo limitado por los espejos galvanométricos con la mayor intensidad posible.

Para calcular el perfil del haz primero se grafica la potencia del haz medida como función del desplazamiento del micrómetro. Del trazo obtenido se obtiene su primera derivada y se calcula numéricamente el ancho del haz a la mitad de su máximo, FWHM (Full Width Half Maximum en inglés). Tal y como se muestra más adelante en la Figura 12. La gráfica y su derivada son realizadas utilizando OriginPro V8R0 (OriginLab Corporation), un paquete computacional especialmente diseñado para ingenieros y científicos y especializado para el análisis profesional de datos y la generación de gráficos técnicos.

3.2.1.1 Resolución lateral

Según Helmchen, F. y Winfried, D. (Helmchen & Winfried, 2005) cuando se toma en cuenta el diámetro de abertura del objetivo de microscopio, D_{BA} , y el diámetro del perfil del haz, D_{BEAM} , la resolución lateral⁶ de un sistema de microscopio está dado por

$$\delta_L \approx \frac{\lambda}{2NA} \times F \left(\frac{D_{BEAM}}{D_{BA}} \right), \quad (23)$$

donde NA es la abertura numérica del objetivo de microscopio, λ es la longitud de onda del láser y F es factor de amplificación del tamaño del punto extendido, cuyo valor depende de la razón entre el tamaño del perfil del haz y el tamaño de la abertura del objetivo de microscopio (Helmchen & Winfried, 2005). El tamaño de la abertura del objetivo de microscopio está dado por

$$D_{BA} = 2NA \frac{f_{TL}}{M}, \quad (24)$$

donde f_{TL} es la distancia focal de la lente de tubo, y M es la magnificación del objetivo microscopio. La tercera columna de la Tabla 1 muestra los valores del factor F para las razones $\frac{D_{BEAM}}{D_{BA}}$ obtenidos en esta tesis. Los valores de los diámetros se muestran en el capítulo IV.

3.2.1.2 Resolución lateral en microscopía no lineal

De acuerdo a Cox y Sheppard (Guy & Colin, 2004) la resolución lateral de un microscopio no lineal está determinada por el enfoque del haz excitante. En un

⁶ Otros autores definen la resolución lateral como $\delta x = \frac{0.6\lambda}{\sqrt{2NA}}$, y la axial como $\delta z = \frac{2n\lambda}{NA^2}$

proceso de segundo orden al tamaño de la función de punto extendido del haz en el foco disminuye por un factor de $\sqrt{2}$ (Gauderon, et al., 1988) En general, de acuerdo a Squier and Muller (Squier & Müller, 2001) el tamaño del punto extendido disminuye por un factor de \sqrt{n} , con n como el orden de la no linealidad. Entonces, la resolución axial de un microscopio de segundo armónico se puede estimar utilizando la expresión:

$$\delta_{NL} = \frac{\delta_L}{\sqrt{2}} = \frac{\sqrt{2}\lambda}{4NA} \times F \left(\frac{D_{BEAM}}{D_{BA}} \right) \quad (25)$$

En nuestro caso $D_{BEAM} = D3 = 4.55\text{mm}$ (ver sección de resultados) y la distancia focal de la lente de tubo es $f_{TL}=250\text{ mm}$, los cuales son valores constantes. Mientras que los parámetros del objetivo pueden variar. En la Tabla 1 se muestran las resoluciones laterales estimadas para el caso lineal y no lineal, utilizando las ecuaciones (23) y (25), respectivamente.

Tabla 1 Objetivos de microscopio utilizados en esta tesis y su resolución lateral (lineal y no lineal) estimada.

Amplificación	N.A	F(D _{BEAM} /D _{BA})	Resolución lineal (μm)	Resolución no lineal (μm)
40x	0.65	1.38	0.88 ^(*) / 0.67 ^(**)	0.62 ^(*)
20x	0.45	1.53	1.41 ^(*) / 1.07 ^(**)	0.99 ^(*)
10x	0.30	1.68	2.32 ^(*) / 1.76 ^(**)	1.64 ^(*)

^(*) $\lambda=830\text{ nm}$,

^(**) $\lambda=630\text{ nm}$

3.2.2 Caracterización del barrido y resolución del microscopio

Para caracterizar el barrido y medir el perfil del haz en el plano focal del microscopio, se obtiene una imagen de transmisión barriendo el haz láser sobre una regla de precisión Ronchi (Edmund Scientific, 40 l/mm), mostrada en la Figura 8 a), cuyo un periodo de modulación entre franjas opacas y transparentes es de $\Lambda=25$ micrómetros. Las franjas opacas corresponden a las franjas en las que existe un depósito de plata, mientras las franjas blancas representan la franjas transparentes (ver Figura 8-b).

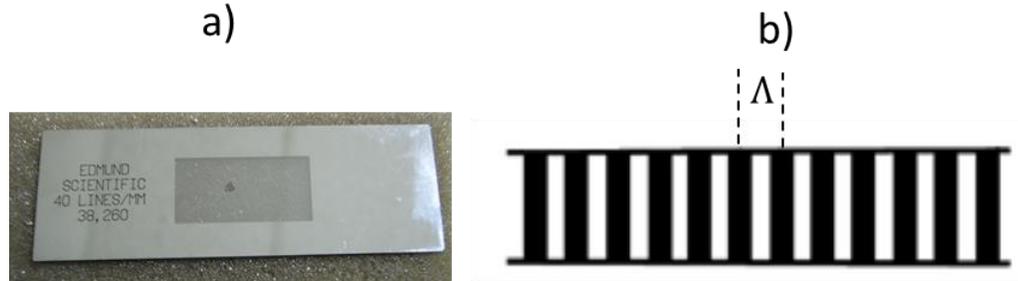


Figura 8. a) Rejilla de transmisión de periodo de modulación de 25 micras b) Modulación del índice.

Como ya se mencionó, en el programa computacional utilizado para la sincronización del barrido y la detección se elige un área arbitraria de barrido dando como resultado una imagen con área en unidades de pixeles también arbitrario. Por tanto, es necesario conocer el factor de conversión del número de micras barrido por pixel, FC . Para obtener este valor, en una primera aproximación, se realiza el máximo barrido posible (limitado de alguna manera por el paquete computacional) sobre la regla de precisión.

Con la imagen obtenida se estima el número total de periodos, N_{Λ} , barridos en la imagen y se multiplica por el periodo de la regla; es decir 25 micras. Dado

que se conoce el número de píxeles de la imagen, N_{pixel} , el factor de conversión es de:

$$FC = \frac{N_{\Lambda} \times \Lambda}{N_{pixel}} \left[\frac{\mu m}{pixel} \right]. \quad (26)$$

3.2.3 Medición del campo de visión del microscopio

El campo de visión del microscopio está limitado por el ángulo máximo de deflexión de los galvanómetros, o bien, por la pupila de entrada del sistema. Siendo este último el caso en el microscopio aquí construido como se mostrará en la sección de resultados. Si bien el paquete computacional limita el área máxima de barrido, el centro de cada imagen puede ser redefinido. Por lo tanto, para medir el campo de visión del microscopio construido, se realizó un mosaico de imágenes equidistantes. Para cada imagen del mosaico se utiliza el área máxima de barrido el cual da como resultado una matriz de 835x835 píxeles². Generalmente, los parámetros de entrada del programa utilizados fueron de un ancho de 50 unidades en cada eje, X y Y, 5 puntos/resolución, y un tiempo de vuelo de 0.1 ms/pixel. En este caso se utiliza una muestra de fibras de colágeno natural.

3.2.4 Calibración de los fotomultiplicadores y fuentes de voltaje

Uno de los propósitos particulares de esta tesis es determinar la eficiencia de GSA de las fibras de colágeno, para ello es necesario caracterizar el sistema de detección. Cabe mencionar que para el desarrollo de esta tesis se contaba con dos fotomultiplicadores (Hamamatsu, R3557) y dos fuentes de alto voltaje para ajustar su ganancia. Dado que este equipo estuvo en desuso por aproximadamente una década, sin documentación de su uso o funcionamiento, hubo la necesidad de caracterizarlos previamente. En este experimento denotamos a los fotomultiplicadores y fuentes de alto voltaje como PMT1, PMT2 y HV1, HV2, respectivamente.

La Figura 9 muestra el arreglo experimental utilizado para la calibración de los fotomultiplicadores. Se utiliza un láser continuo de Nd:YAG de CW (Quantum Laser, Excel-2) con longitud de onda de 532 nm y con una potencia variable de 10mW a 2W. En este experimento se utilizó un rango de 100 - 700 mW. La salida del haz es atenuado con un filtro de interferencia, F (Semrock, FF01-435-25), centrado en 435 nm con un ancho espectral de 40 nm. El filtro tiene una densidad óptica de 7 a 532 nm, por lo que el rango de potencia disminuye de 10 a 70 nW. Este haz atenuado incide de manera perpendicular sobre el área del fotomultiplicador, PMT, en turno. Este último se conecta a una fuente de alto voltaje, HV, para regular su ganancia y la señal de salida se conecta a un preamplificador de corriente a voltaje, PreAmp. Nótese que el sistema compuesto por, F, PMT, HV y P, es exactamente el mismo sistema de detección utilizado para el microscopio no lineal de barrido de la Figura 7. La ganancia del preamplificador es de 10^4 V/A cuyo voltaje es medido por un multímetro digital (M).

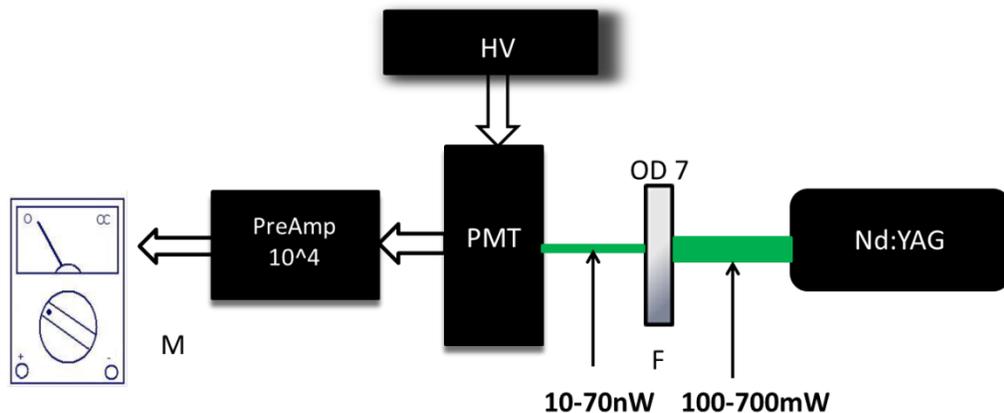


Figura 9. Arreglo experimental para la calibración de los tubos fotomultiplicadores. F: Filtro de interferencia; PMT: Tubo Fotomultiplicador (PMT1 y PMT2); M: Multímetro; HV: Fuente de alto voltaje (HV1 y HV2); PreAmp: Preamplificador.

Con el fin de probar el funcionamiento de los fotomultiplicadores y fuentes de alto voltaje, y así elegir el mejor par PMT-HV a utilizar en el microscopio no lineal, se realizan los siguientes experimentos:

- Se midió el voltaje en la salida del preamplificador, V_{out} , como función de la potencia del láser en el rango de 10-70nW, manteniendo el alto voltaje (ganancia del fotomultiplicador) constante. Los pasos de potencia fueron de 10nW. Esta medición se realizó para diferentes valores de ganancia del PMT aplicando valores de voltaje a 0V, 500V, 625V, 750V, 825V, 1,000V y 1,250 V. Estas mediciones se realizaron con ambas fuentes de voltaje. La ganancia del preamplificador se mantiene de 10^4 V/A.
- Se midió el voltaje en la salida del preamplificador, V_{out} , como función del alto voltaje el rango de 500-1,250V, manteniendo la potencia del láser constante. Los pasos del alto voltaje fueron de 125V. Esta medición se realizó para diferentes valores de potencia, los cuales fueron 0nW, 10nW y 40nW. Estas mediciones se realizaron con ambos fotomultiplicadores. La ganancia del preamplificador se mantiene de 10^4 V/A. Los datos obtenidos se grafican en escala lineal y logarítmica utilizando OriginPro V8R0 (OriginLab Corporation). El gráfico en escala logarítmica se utiliza para realizar un ajuste lineal en los datos de voltaje vs potencia de entrada, con el fin de obtener una ecuación característica de conversión lineal $V_{out} = mP + b$. De esta manera las lecturas de voltaje pueden ser convertidas a los valores de potencia.

3.2.5 Caracterización de la señal de segundo armónico

Para cuantificar la señal de segundo armónico obtenida en fibras de colágeno, primero es necesario caracterizar la señal de segundo armónico (obtenida con el microscopio aquí construido) en un material con no linealidad óptica conocida. Para esta caracterización se utiliza una oblea de Niobato de Litio (LiNbO_3). Este material, además de ser ferro-eléctrico y tener propiedades fotorrefractivas, presenta una alta no linealidad óptica de segundo orden. Los coeficientes no lineales efectivos distintos a cero son: $d_{222} = \frac{\chi_{yyy}^{(2)}}{2} = 2.1 \text{ pm/V}$, $d_{311} = \frac{\chi_{zxx}^{(2)}}{2} = -4.35 \text{ pm/V}$ y $d_{333} = \frac{\chi_{zzz}^{(2)}}{2} = -27.2 \text{ pm/V}$, siendo este último uno de los valores de susceptibilidad efectiva de segundo orden más grandes que existen. Asimismo el LiNbO_3 es altamente transparente para radiación entre 400nm y 5,000nm, lo cual lo hace ideal para detectar GSA en transmisión.

La muestra utilizada aquí corresponde a una de las obleas de dominios invertidos creadas en CICESE por el grupo del Dr. Roger Cudey (Cudney, et al., 2002). La oblea tiene aproximadamente 500 μm de espesor con dominios invertidos con periodicidad de alrededor de 30 μm . Cabe resaltar que las propiedades físicas del cristal, y por tanto sus coeficientes no lineales, están referidas a un sistema coordinado (x, y, z) , donde el eje z coincide con la dirección del eje extraordinario (eje "c") del cristal, el eje x coincide con uno de los ejes cristalinos (con celda unitaria hexagonal). En estas obleas, la dirección del eje z es perpendicular al plano de sus caras (normal a la superficie) y la dirección de los dominios son invertidos en la dirección del eje "c" donde se excita el coeficiente d_{333} .

Mediante una comparación entre la señal de GSA obtenida en muestras de LiNbO_3 y las respectivas señales obtenidas en fibras de colágeno natural y fibras de colágeno crecidas *in vitro*, se estimarán los valores de la susceptibilidad de segundo orden del colágeno.

3.3 Preparación de muestras con fibras de colágeno tipo I

3.3.1 Muestras de fibras de colágeno natural

En esta tesis se utilizan fibras de colágeno natural y fibras de colágeno obtenidas por fibrogénesis. Las primeras se obtienen mediante la extracción de fascículos⁷ directamente de un tendón de cola de rata; el procedimiento se esquematiza en la Figura 10. Las colas de rata pueden ser obtenidas en tiendas de venta de animales, por ejemplo en Petco (en San Diego, CA.); son comunes como alimento de reptiles exóticos que típicamente muestran en exposición. Para la extracción de fascículos es necesario realizar una pequeña disección en la cola de rata y con la ayuda tanto de unas pinzas de punta y pinzas de corte, se extraen los fascículos del tendón, que se conforman por un alto contenido de fibras de colágeno tipo I (ver Figura 10 b). La longitud de los fascículos son de alrededor de 2 cm de largo para un fácil manejo en los pasos subsecuentes. Posteriormente, el fascículo se “deshebra” con el fin de exponer mejor las fibras de colágeno. Las fibras extraídas son inmersas en un recipiente con agua purificada y enjuagadas (varias veces), hasta quitar lo mejor posible el contenido de células adiposas y sanguíneas.

Ya lavadas las fibras se seleccionan fascículos de aproximadamente 500µm de espesor y se “pegan”, con la ayuda de una navaja (ver Figura 10 c) sobre un porta objetos de microscopio distribuyendo las fibras uniformemente. Para fijar el fascículo se deposita previamente en el porta objetos una pequeña porción de gel de agar preparado al 1 %. El agar no presenta propiedades ópticas no lineales de segundo orden.

⁷ Conjunto de fibras musculares.

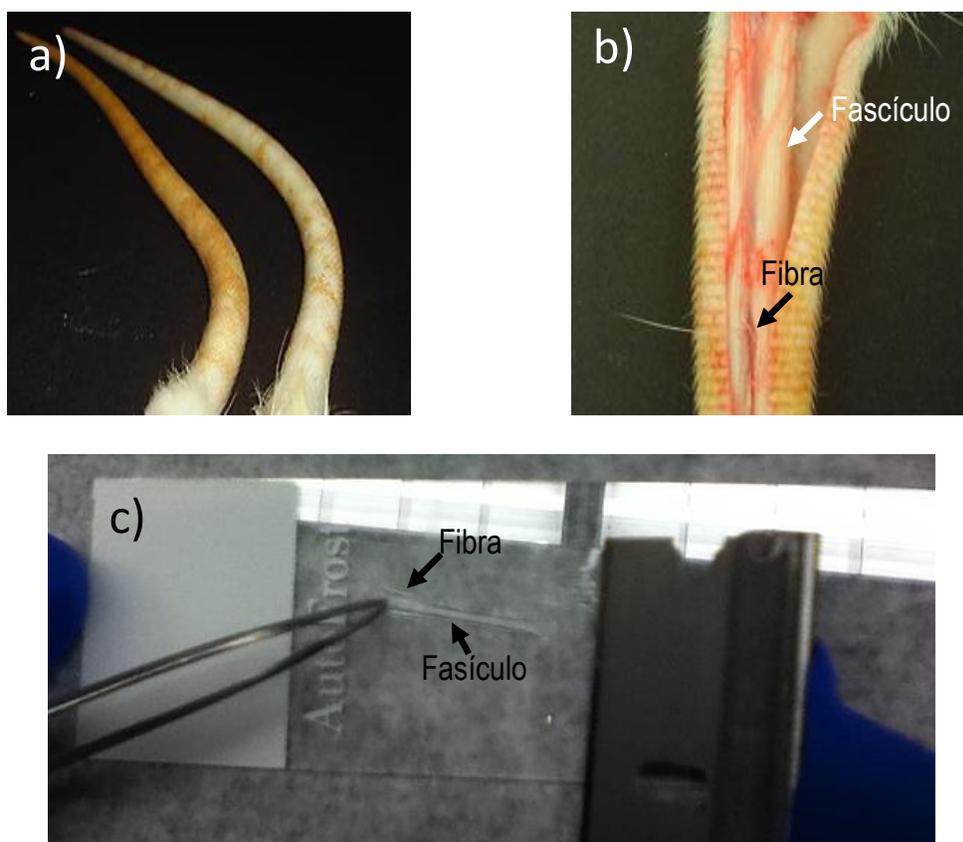


Figura 10. Extracción de fibras de colágeno natural. a) Colas de rata. b) Tendón de cola de rata expuesto mostrando uno de fascículos del tendón (flecha blanca) y una fibra (flecha negra). c) Depósito de fibras en un portaobjetos de microscopio mostrando uno de fascículos del tendón (flecha blanca) y una fibra (flecha negra).

3.3.1 Muestras de fibras de colágeno crecidas *in vitro*

En contraste a la preparación de muestras con fibras de colágeno natural, la preparación de las muestras de colágeno *in vitro* se lleva a cabo siguiendo el protocolo incluido en la solución de colágeno (SIGMA C3867) para inducir la formación de fibras. Los pasos descritos en el protocolo (SIGMA C3867), al igual que el material y el equipo empleado para la preparación de las muestras de fibras de colágeno crecidas *in vitro* se describen a continuación.

Material:

- Solución de colágeno tipo I (SIGMA C3867)
- Solución de NaOH con una concentración de 0.1M
- Solución buffer de fosfato PBS 10X
- Incubadora (Heraeus Instruments, Tipo B 5060 EK/CO2)
- Medidor de pH digital (OAKTON,EUTECH INSTRUMENTS)
- Caja de cubreobjetos rectangulares (VWR, Tipo 48393-252, 24x60mm)
- 2 Micro pipetas de volumen variable (VWR, 10-100ul y 100-1000ul)
- Tubos Eppendorf
- Microscopio óptico invertido (Nikon, Eclipse TE2000-U).

Procedimiento:

Para el crecimiento de las fibras de colágeno *in vitro*, se utiliza una micro pipeta de 20 μ L y se diluyen ocho partes de la solución de colágeno por una de solución buffer PBS 10x, colocándola posteriormente en un tubo centrifugador. Después se ajusta el pH utilizando la solución de Hidróxido de sodio esterilizado (NaOH). Se prepararon tres soluciones de colágeno a diferentes niveles de pH, siendo estas de 7, 7.3, y 7.5. Estos valores de pH caen en el rango necesario para inducir el proceso de auto-ensamblaje entre las moléculas de colágeno. Este proceso se lleva a cabo en un ambiente en refrigeración por lo que, una vez preparadas, las soluciones se deben mantener en refrigeración para evitar la generación de fibras. El propósito de preparar al menos tres distintas soluciones es para tener margen de error para poder monitorear la fibrogénesis en tiempo real. Cabe mencionar que inicialmente se mantuvo una temperatura constante de 37°C en la muestra durante el crecimiento de fibras. Posteriormente, el crecimiento de fibras se llevó a temperatura ambiente.

3.3.2 Monitoreo de la fibrogénesis de colágeno

La birrefringencia de las fibras de colágeno resulta de la alineación preferente cuasi cristalina de sus moléculas a lo largo de la fibra. Cuando las estructuras birrefringentes son iluminadas con luz polarizada en esta dirección, las fibras brillarán intensamente si se coloca un segundo polarizador (analizador) también a lo largo de la fibra; en cambio su respuesta a la iluminación será muy débil o nula cuando el analizador esté en una dirección diferente. Por lo tanto, para monitorear el proceso de generación de fibras se utilizó microscopía de birrefringencia, la cual utiliza un par de polarizadores cruzados, uno después de la fuente de luz y otro antes del detector, para atenuar la intensidad de la luz. Al tener una muestra con zonas birrefringentes entre la fuente y el detector, la luz cambiará su estado de polarización en dichas zonas pudiendo así pasar una fracción de luz a través del segundo polarizador y de esta manera identificar las zonas de birrefringencia.

El monitoreo de la generación de fibras se lleva a cabo depositando una por una las soluciones de colágeno previamente preparadas sobre un cubreobjetos de microscopio. Para esto se utiliza una micro pipeta de volumen variable de 10-100 μ L para depositar porciones de aproximadamente 15 μ L. Inmediatamente después, se comienza a monitorear la muestra bajo un microscopio óptico invertido comercial (Nikon, Eclipse TE2000-U) utilizando un objetivo de 10x de magnificación, y una abertura numérica de (N.A=0.3). Cabe mencionar que en la preparación de las muestras de la sección anterior se había utilizado una incubadora para mantener una temperatura constante en la muestra durante el crecimiento de fibras. No obstante en esta ocasión el crecimiento de fibras se lleva a una temperatura ambiente (30°C aprox.). Durante el proceso de fibrogénesis se tomaron imágenes cada 10 min, durante 8 horas.

El microscopio utilizado cuenta con un par de filtros (o prismas) polarizadores: el primero de ellos (filtro polarizador) localizado justo después de la fuente de iluminación, antes de la muestra, este es el filtro encargado de polarizar

la luz; el otro se localiza posterior a la muestra (filtro analizador) (Véase Figura 11). Con estos polarizadores se llevó a cabo la microscopía de birrefringencia utilizando polarizadores cruzados. Para la toma de las imágenes se emplea una cámara CCD (Pixelink, PL-B776U) de alta resolución conectada uno de los puertos de salida del microscopio. Esta cámara dispone de una salida de video que permite ver y capturar las imágenes utilizando un programa de adquisición de imágenes desarrollado en Matlab.

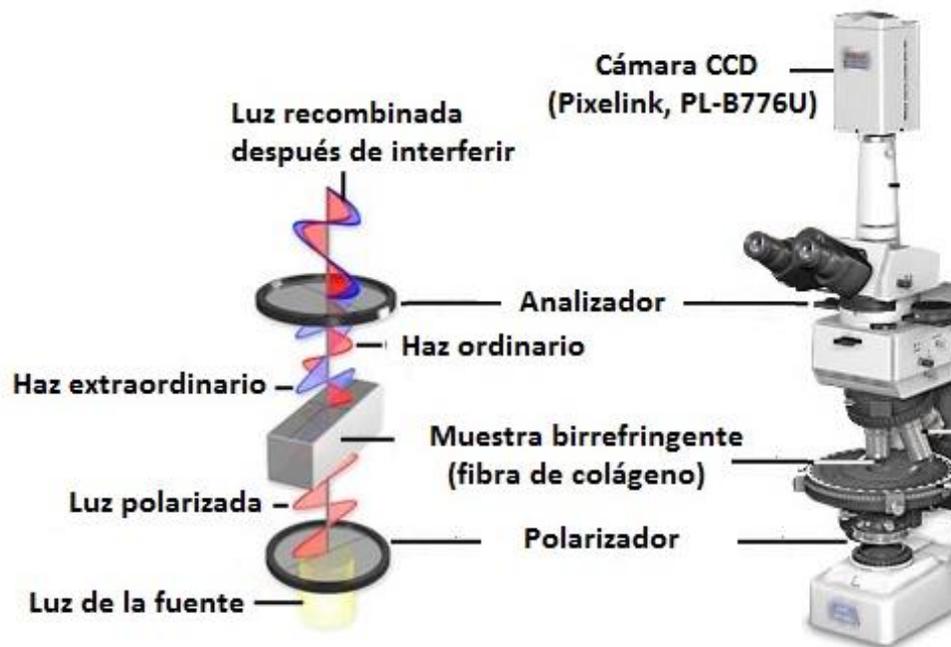


Figura 11. Configuración para el monitoreo de la fibrogénesis de colágeno.

3.4 Microscopía de segundo armónico

La toma de imágenes de segundo armónico es realizada bajo las mismas condiciones para todas las mediciones aquí presentadas. Cada imagen tiene un área de barrido de aproximadamente $250 \times 250 \mu\text{m}^2$, con tamaño de 850×850 pixeles, tiempo de vuelo de 0.1 ms/pixel . El tiempo de toma por imagen fue de 72 segundos. Las imágenes obtenidas son grabadas como archivo de datos (".dat") y procesadas posteriormente para su análisis. El procesamiento y análisis de las

imágenes se realiza utilizando el programa computacional *ImageJ-1.46r* (National Institute of Health), el cual es un programa para procesamiento de imágenes digitales de dominio público programado en Java 1.6.0(32-bit). Con este paquete computacional se pueden desarrollar “plugins” de escaneo personalizado para el análisis y procesamiento de imágenes tomadas estáticamente, en movimiento vivo y en tres dimensiones.

Las mediciones realizadas con las imágenes de todas las muestras fueron básicamente de dos tipos: la toma de *imágenes de GSA como función de la polarización del láser* y la toma de *imágenes de GSA como función de la intensidad*. Para el primer caso se varió el ángulo de polarización del láser utilizando una placa retardadora de media onda (ThorLabs). Como bien se sabe, cuando un haz con estado de polarización lineal incide sobre una placa retardadora de media onda, su dirección de polarización es rotada a una razón del doble del ángulo formado entre uno de los ejes (lento o rápido) de la placa retardadora y la dirección inicial del campo eléctrico de la luz. Para el segundo caso, una vez rotada la polarización de la luz, ésta incide sobre un polarizador (LM1-R, Newport). Como resultado, la intensidad de la luz que se transmite por el polarizador se modula siguiendo la ley de Malus (Hetch & Zajac, 2000) preservando el estado de polarización lineal, el cual está en dirección al eje del polarizador. El eje del polarizador se alinea a uno de los ejes del laboratorio, X o Y.

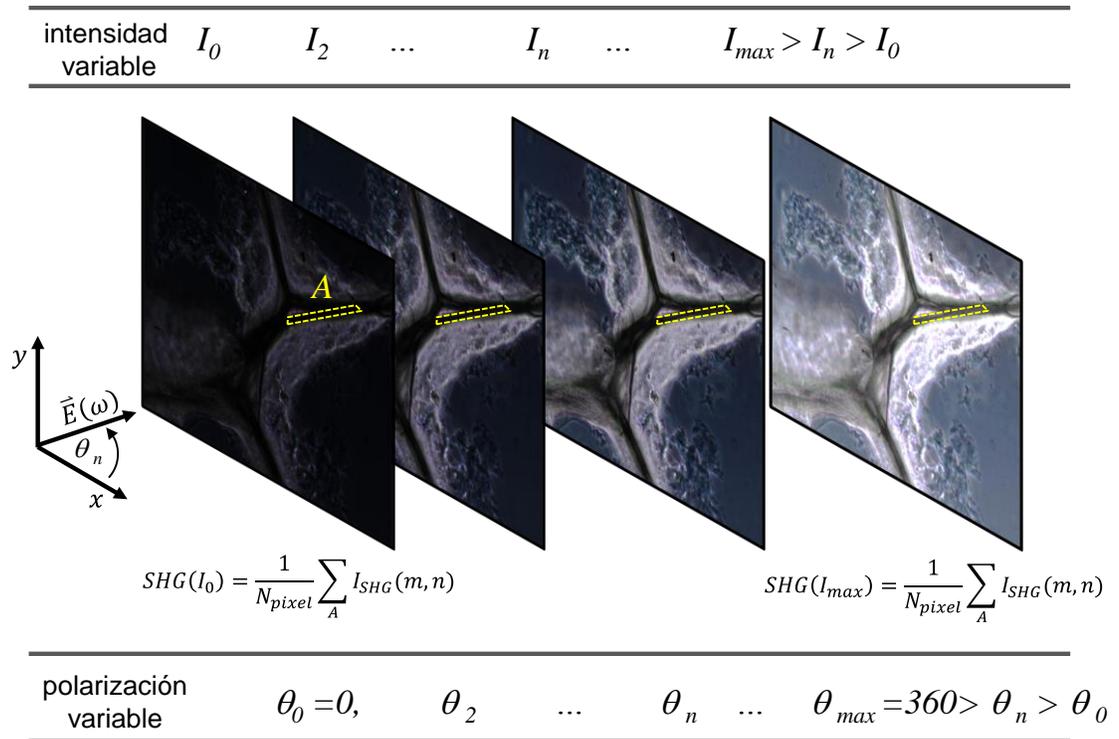


Figura 12. Esquema para la tabulación de datos del GSA en regiones específicas de una imagen de barrido.

La Figura 12 esquematiza el procedimiento para obtener los valores del GSA en las imágenes adquiridas de intensidad y la polarización, respectivamente, la cual se lleva a cabo utilizando las herramientas del paquete computacional *Image J*. Primero se apilan todas las imágenes de intensidad de menor a mayor intensidad de excitación (parte superior de la Figura), o bien de menor a mayor ángulo de polarización (parte inferior de la Figura). En cualquier caso, se define un área, A , deseada y se obtiene el promedio de todos los valores, $I_{GSA}(m,n)$, allí contenidos, donde m,n , corresponde a la posición de cada pixel. Nótese que área seleccionada puede ser arbitraria y se pueden seleccionar cuantas regiones sean necesarias. Los valores obtenidos en cada imagen se tabulan respecto a la intensidad (o polarización) y se grafican en Origin.

Capítulo 4

Resultados y Discusiones

4.1 Caracterización del microscopio

4.1.1 Medición del perfil de intensidad del haz de excitación

Con el fin de verificar la amplificación de los sistemas telescópicos del arreglo experimental, compuestos por las lentes f_1 , f_2 y f_{SL} , f_{TL} , respectivamente, se tomaron tres mediciones del perfil del haz en las posiciones D1, D2 y D3, mostrados en el arreglo experimental del capítulo anterior (ver Figura 7). La Figura 13 muestra las mediciones del desplazamiento del micrómetro vs la potencia del haz utilizando la técnica de la navaja. Los datos obtenidos se grafican en unidades de mili-Watts vs milímetros. Asimismo, las Figuras 13 b), d) y f) muestran la primera derivada de las Figuras 13 a), c) y e), respectivamente. Con ellas se ajusta numéricamente una curva gaussiana y se calcula el ancho del perfil del haz a la mitad de su altura, FWHM (Full Width Half Maximum); estimando así el diámetro del perfil del haz para cada caso.

Tabla 2. Valores teóricos y experimentales del perfil del haz en D1, D2 y D3.

	A₁ f_2/f_1	A₂ f_{TL}/f_{SL}	D₁	D₂	D₃
			(FWHM en mm)		
Cálculo	4.92	1.66	0.50	2.50	4.2
Experimento	5.00	1.65	0.52	2.67	4.77

Las amplificaciones de cada sistema telescópico, así como de los tamaños del perfil del haz, se resumen en la Tabla 2. Se puede observar una buena correlación entre el valor calculado y el valor medido tanto de la amplificación como del perfil del haz. Para el cálculo de la amplificación simplemente se define como

la razón de la distancia focal de la segunda lente con respecto a la distancia focal de la primera lente $A = \frac{f_2}{f_1}$, similarmente para el caso del diámetro se calcula con la

expresión $D = A \frac{f_2}{f_1}$.

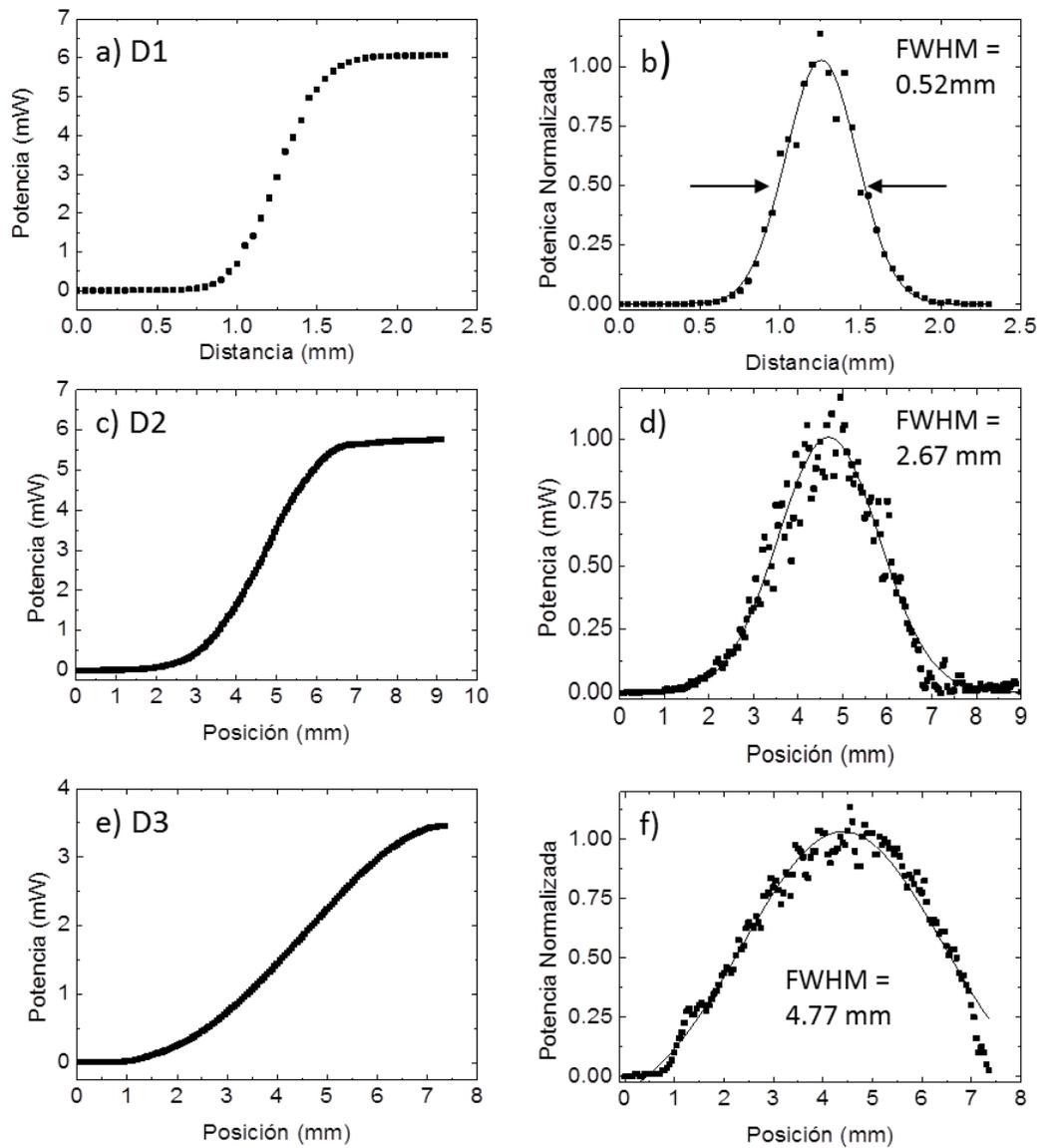


Figura 13. Gráficas de intensidad obtenidas con la prueba de la navaja en las posiciones D1 (a), D2 (c) y D3 (d), de la Figura 7. (b), (d) y (f) muestran el perfil de intensidad obtenido en D1, D2, y D3, respectivamente.

Nótese cómo en los datos experimentales de la Figura f) se observa un perfil truncado en su parte derecha. Esto se debe a que los espejos galvanométricos limitan el tamaño del haz. El ajuste gaussiano en este caso tiene un nivel constante negativo ($y=-cte.$) y no muestra el decaimiento suave a cero por los límites seleccionados en el eje 'y' de la figura. Los espejos tienen un área de $3 \times 3 \text{ mm}^2$ y al estar a 45° el área iluminada disminuye por un factor de $\sqrt{2}$ por cada lado debido a la proyección del perfil del haz. Esto es, siendo el lado de 3 mm entonces su proyección será $3/\sqrt{2} \text{ mm} = 2.12 \text{ mm}$. Por lo tanto, al ser 2.67 mm el ancho del haz incidente en el primer espejo galvanométrico (ver Figura d), el perfil del haz mostrado en Figura f), una vez amplificado por el segundo sistema telescópico, aparece ligeramente truncado. Nótese que este tamaño es el máximo que se puede obtener en este sistema de microscopio, por lo que se concluye que la resolución de nuestro sistema está limitada por el tamaño del haz atrás del objetivo de microscopio; esto es, D3.

Tomando en consideración tanto los valores de la abertura numérica y la magnificación del objetivo de microscopio de 40x, así como la distancia focal de la lente de tubo, e insertándolos en la ecuación (24), el tamaño de la abertura numérica está dada por $D_{BA} \approx 8.12 \text{ mm}$. Mientras que la razón $\frac{D_{BEAM}}{D_{BA}} = \frac{D_{BEAM}}{D_3} = 0.56$, en cuyo caso, según (Helmchen & Winfried, 2005) y la Tabla 2. $F\left(\frac{D_{BEAM}}{D_{BA}}\right) \approx 1.4$,. Por lo tanto, la resolución del sistema de barrido por transmisión es $\delta_L \approx 0.7 \mu\text{m}$, para el caso de un láser de HeNe ($\lambda = 630 \text{ nm}$), y de $\delta_L \approx 2.32 \mu\text{m}$, para el caso de un láser de Ti:Za en modo CW ($\lambda = 830 \text{ nm}$; ver Tabla 1).

4.1.2 Caracterización del barrido y resolución del microscopio

La Figura muestra la medición de la resolución del microscopio de barrido aquí construido utilizando dos tipos de fuente láser y dos objetivos de magnificación 40x y 10x, respectivamente. Las imágenes insertadas en las Figuras 14 a) y c) muestran la respectiva transmitancia de la regla de precisión Ronchi cuyo periodo de modulación es de 40 lp/mm (ver Figura 14). Nótese que las imágenes escaneadas son de 835x835 pixeles pero aquí se reduce el tamaño vertical sólo con fines ilustrativos. La imagen en la Figura a) fue tomada utilizando el láser de HeNe ($\lambda = 630$ nm), mientras que la de la Figura c) corresponde al láser de Ti:Za en modo CW ($\lambda = 830$ nm).

Sabiendo la distancia entre franjas negras y blancas ($25 \mu\text{m}$), es posible entonces obtener el factor de conversión FC (dado en micras/pixel) multiplicando $25 \mu\text{m}$ por el número de periodos, N_{lp} , observados en la imagen, dividido entre el número de pixeles de la imagen N_{pixel} , esto es:

$$FC = \frac{N_{lp} \times \Lambda}{N_{pixel}} \quad (27)$$

En la imagen de la Figura a) se observa un valor de $N_{lp} \approx 9.5$ por lo que el factor de conversión es de $FC = 0.284 \mu\text{m}/\text{pixel}$, mientras que en la imagen de la Figura c) el número de periodos es $N_{lp} \approx 35$ aproximadamente por lo que el factor de conversión es $FC = 1.047 \mu\text{m}/\text{pixel}$.

Ya conocido el factor de conversión, se elige un renglón de la imagen de barrido (ver líneas segmentadas color blanco) y con ayuda de Matlab se grafica el perfil de intensidad a lo largo de ese renglón, dando como resultado las gráficas (en trazos azules) mostradas en las Figuras 14 a) y c). Donde se muestra la escala en pixeles en las escalas horizontales superiores y en micras en las escalas horizontales inferiores. La escala vertical corresponde a la intensidad transmitida en unidades arbitrarias.

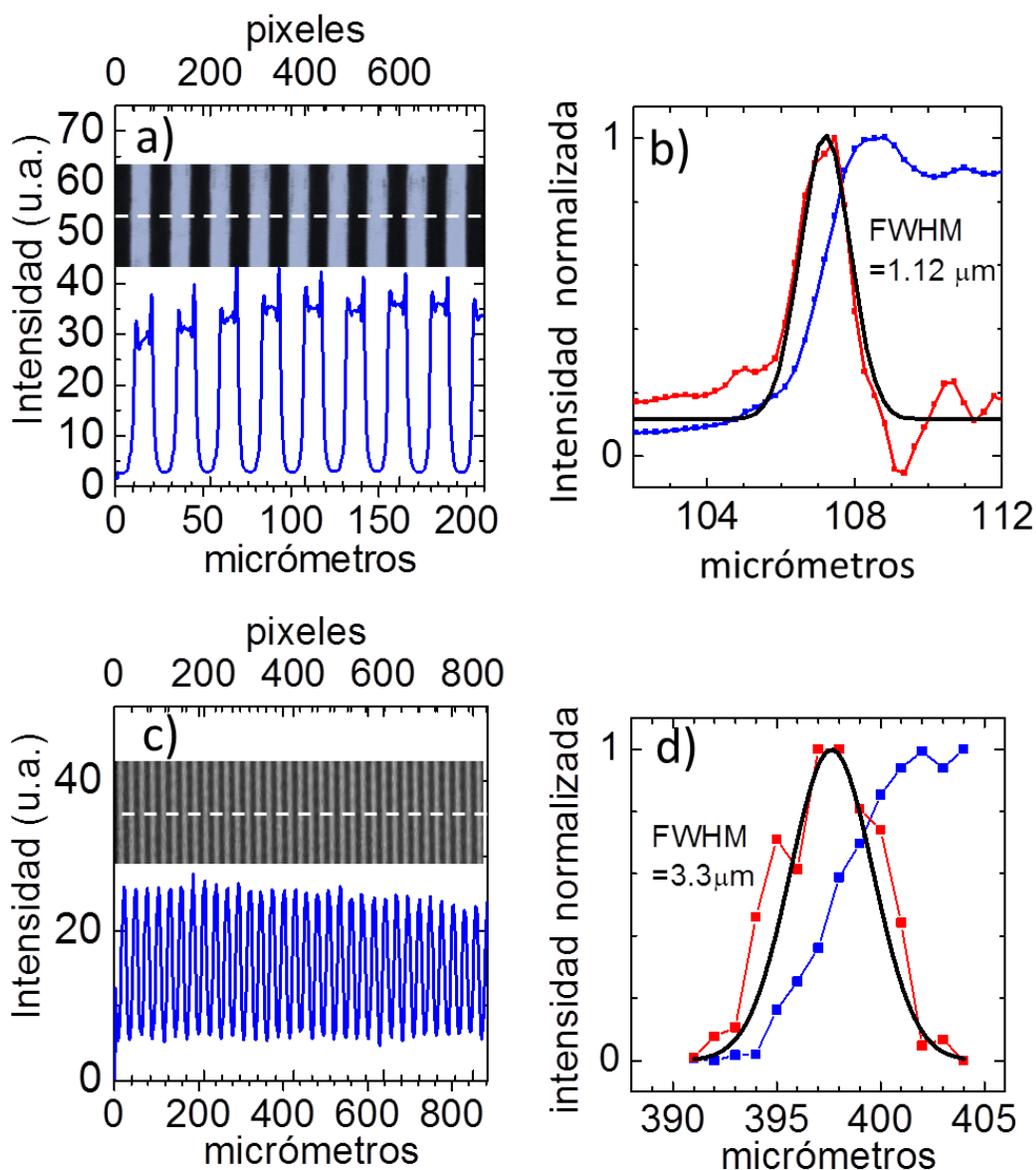


Figura 14. Caracterización del barrido con objetivos de magnificación 40x y 10x. a) Imagen de transmisión y gráfica de intensidad (en azul) tomada con un objetivo 40x y una fuente láser CW con $\lambda=630\text{nm}$. b) Derivada (en rojo) y respectivo ajuste gaussiano (negro) en la frontera entre una franja opaca y transparente de (a). c) Imagen de transmisión y gráfica de intensidad (en azul) tomada con un objetivo 10x y una fuente láser CW con $\lambda=830\text{nm}$. d) Derivada (en rojo) y respectivo ajuste gaussiano (negro) en la frontera entre una franja opaca y transparente de (c).

Las Figuras 14 b) y d) muestran la traza de intensidad en la frontera entre una franja oscura y una brillante, ésto con el fin de estimar el ancho del haz en el

plano focal y con ello la resolución del dispositivo. Las derivadas se muestran en líneas rojas, mientras que los respectivos ajustes Gaussianos se muestran en líneas negras. Se obtiene un ancho del haz de $FWHM \approx 1\mu m$ con el objetivo de magnificación 40x (y fuente de $\lambda = 630$ nm), mientras que para el objetivo de 10x (y fuente de $\lambda = 830$ nm) un ancho del haz de $FWHM \approx 3\mu m$. Estas mediciones no están tan lejos de las respectivas resoluciones estimadas según la Tabla 1, cuyos valores son $\delta_L \approx 0.7\mu m$ y de $\delta_L \approx 2.32\mu m$, respectivamente. Ésta discrepancia se puede deber a un error sistemático de la medición, como por ejemplo, que la regla de precisión no sea barrida exactamente en el plano focal del haz. Lo anterior se debe a que el paso mínimo del micrómetro utilizado es de 20 micrómetros mientras que la resolución axial se estima de alrededor de 30 micrómetros.

4.1.3 Medición del campo de visión del microscopio

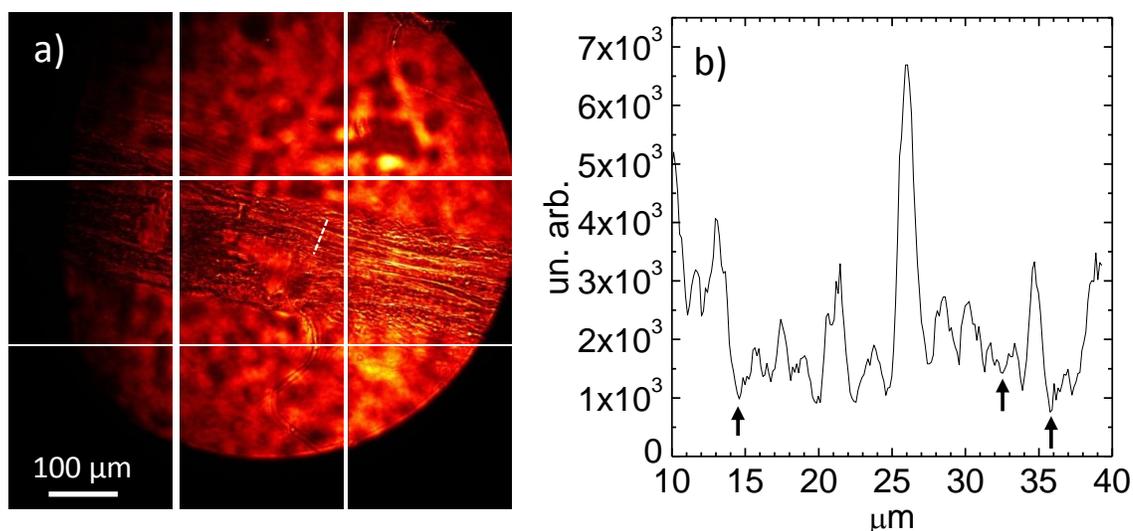


Figura 15. a) Campo de visión del microscopio. b) Gráfica del perfil de intensidad en una fibra de colágeno natural.

Para medir el campo de visión del microscopio de barrido láser se realiza un barrido sobre un fragmento de un tendón, extraído de una cola de rata, el cual está compuesto por fibras de colágeno natural. En la Figura a) se muestra la imagen del tendón misma que se compone de un mosaico de nueve imágenes tomadas con una área de $237 \times 237 \mu\text{m}^2$ (835×835 pixeles²), tomadas con una velocidad de muestreo de 0.1 ms por pixel; esto es, cada imagen toma alrededor de 68 segundos. Cabe mencionar aquí que, si bien las imágenes toman alrededor de 68 segundos, también es posible obtener imágenes en sólo 9 segundos simplemente disminuyendo el tamaño del área a escanear y/o la velocidad de muestreo. Nótese que el campo de visión comprende un diámetro de alrededor de 0.6 mm, cubriendo un área aproximadamente $3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ (0.3 mm^2). Físicamente, el barrido está limitado por la lente de escaneo, LS, de la Figura 7.

El gráfico de la Figura b) corresponde al perfil de intensidad (transmisión) del segmento trazado con la línea segmentada de color blanco en la Figura a). Este

perfil de intensidad confirma que la resolución del sistema está por debajo de 1 micrómetro, lo cual está en correspondencia tanto con la estimación realizada (ver Tabla 1) y como con la medición de la sección anterior. Esto se puede apreciar en las fibras denotadas por las flechas negras en la Figura b), donde se eligen fibras que claramente son menores a un micrómetro según la escala horizontal del mismo gráfico.

4.1.4 Calibración de los fotomultiplicadores y fuentes de voltaje

En la Figura 16 se muestra la calibración de los dos fotomultiplicadores y las dos fuentes de voltaje existentes en el laboratorio. En la Figura a) se grafica la corriente en oscuro para las cuatro configuraciones posibles: PMT1 con fuente de alto voltaje HV1; PMT1 con fuente de alto voltaje HV2; PMT2 con fuente de alto voltaje HV1 y PMT2 con fuente de alto voltaje HV2. La corriente en oscuro se mide aumentando el alto voltaje con el fotomultiplicador completamente cubierto, de allí su nombre. Las curvas trazadas en rojo muestran cómo la segunda fuente de alto voltaje, HV2, genera más ruido en oscuro para ambos fotomultiplicadores. A su vez, de las curvas negras, las cuales fueron obtenidas con la fuente HV1, se puede notar que existe un mayor ruido en oscuro en el segundo fotomultiplicador, PMT2 (curva con los círculos abiertos). Por lo tanto, la mejor configuración es la del primer fotomultiplicador con la primera fuente de alto voltaje; esto es: PMT1 y HV1. Esta configuración es la utilizada para el microscopio de GSA, puesto que permite amplificar intensidades de GSA con menor ruido producido por la corriente en oscuro.

La Figura b) muestra las curvas en escala logarítmica del voltaje de salida del preamplificador, V , en función de la potencia del láser, P . El rango de potencias es de 10 a 70nW, manteniendo la ganancia del preamplificador a 10^4 V/A. Se aplicaron valores de voltaje 0.5 kV, 0.625 kV, 0.75 kV, 0.825 kV, 1 kV y 1.25 kV, respectivamente. Se puede apreciar prácticamente la misma tendencia de incremento para voltajes entre 0.5 y 0.825 kV, sin embargo, el fotomultiplicador inicia a saturarse a partir de 1.0 kV (ver curvas rosa y gris respectivamente). Nótese que la señal en obscuro está por debajo de la señal medida hasta 2 órdenes de magnitud, como se puede apreciar en las curvas horizontales segmentadas, mismas que indican el nivel de corriente en obscuro para 0.5 kV (línea negra) y 0.825 kV (línea azul), respectivamente.

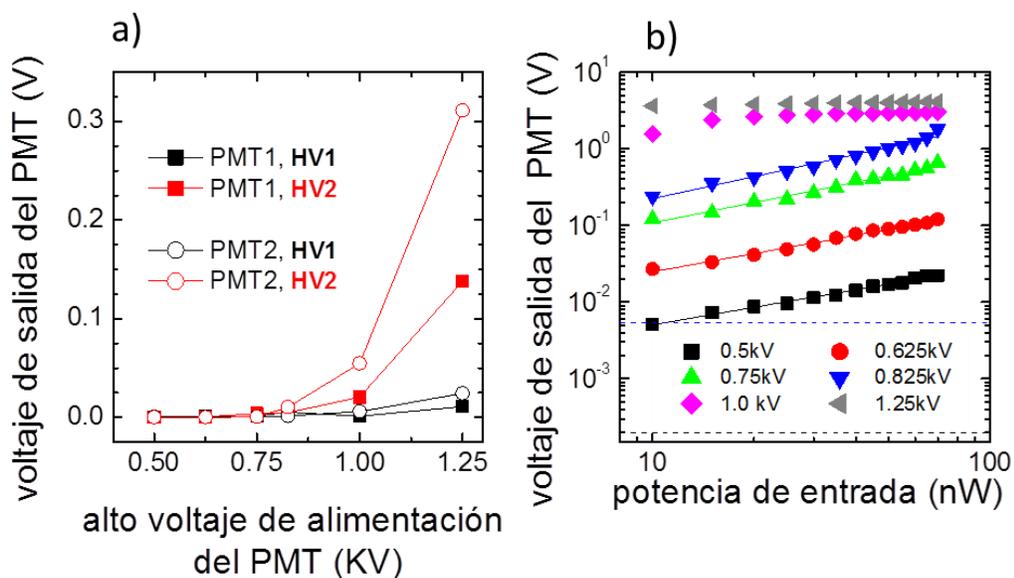


Figura 16. Calibración de los fotomultiplicadores y fuentes de voltaje. a) Corriente en oscuro de dos fotomultiplicadores (PMT1 Y PMT2) como función del alto voltaje. Se utilizan dos fuentes de alto voltaje (HV1 Y HV2). b) Señal del fotomultiplicador, PMT1, con respecto a la potencia de entrada del láser a diferentes valores de alto voltaje. En ambos casos a) y b) se mide la corriente de los tubos fotomultiplicadores a través del voltaje obtenido con un circuito preamplificador de corriente a voltaje.

Una vez obtenidas estas curvas de la Figura b), se hace un ajuste numérico en cada una de ellas para obtener su ecuación característica de calibración. Todas las curvas tienen una dependencia de la forma $V_{out} = bP^m$, donde V_{out} es el voltaje de salida del preamplificador y P es la potencia del láser. Para calcular los parámetros constantes b y m , se utilizan las propiedades de los logaritmos para obtener:

$$\log V_{out} = \log b + m \log P. \quad (28)$$

Definiendo $y = \log V_{out}$, $B = \log b$ y $x = \log P$, se obtiene una ecuación lineal de la forma $y = mx + B$. El respectivo ajuste lineal en todas las curvas de la Figura b) se realiza utilizando el paquete computacional *OriginPro V8R0*, obteniendo los valores de las constantes, m y B , mostrados en la Tabla 3. Estos parámetros permiten conocer la potencia de entrada, convirtiendo las lecturas de voltaje a valores de potencia.

En los experimentos de segundo armónico se tiene exactamente el mismo sistema de medición utilizado en esta calibración. Por lo que la señal generada en el microscopio no lineal se mide primeramente en forma de voltaje (a través del fotomultiplicador y el preamplificador) y, posteriormente, se estima su valor en unidades de potencia utilizando los valores de la Tabla 3. Para esto es necesario utilizar la expresión inversa de la ecuación (28), la cual tiene la forma:

$$P = 10^{\frac{\left(\log \left(V_{out} \times \frac{10^4}{10^G} \right) - B\right)}{m}}. \quad (29)$$

Esta ecuación toma en consideración que la calibración fue realizada con una ganancia del preamplificador de 10^4 V/A, por lo que en las mediciones subsecuentes debe tomarse en cuenta el valor actual de dicha ganancia. El término $\frac{10^4}{10^G}$ (que multiplica al voltaje de salida, V_{out}) toma esto en consideración,

siendo G el valor utilizado en el preamplificador durante los experimentos de segundo armónico.

Tabla 3. Constantes de calibración del PMT a diferentes voltajes de ganancia.

HV [kV]	0.5	0.625	0.75	0.85
m[Volts/nW]	0.757	0.791	0.874	0.958
B [Volts]	-0.053	0.606	1.162	1.391

4.1.5 Caracterización de la señal de segundo armónico

La Figura muestra la caracterización de la señal de segundo armónico utilizando una oblea de LiNbO_3 . Las imágenes mostradas tienen un tamaño de 835×835 píxeles y fueron obtenidas con un objetivo de microscopio de $10\times$ de magnificación teniendo una razón de $1.036 \mu\text{m}/\text{pixel}$. Para tomar las imágenes se utilizó una ganancia del preamplificador es de 10^4 ($G = 4$) mientras que el voltaje aplicado al PMT es 0.625 kV . Por tanto, para convertir los valores medidos en mili volts a nW, se utiliza la ecuación (29) con los parámetros de la tercer columna de la Tabla 3.

La imagen de transmisión obtenida barriendo el haz sobre la oblea se muestra en la Figura a). Para tomar esta imagen se utiliza muy baja potencia de láser de Ti:Za en emisión continua (sin pulsar) y se remueve el filtro interferométrico, FS, de la Figura 7. Como es de esperarse, en esta imagen no se aprecian los dominios ferroeléctricos, ya la inversión produce principalmente cambios de fase en la oblea. Los pequeños cambios del índice de refracción producido en las fronteras de los dominios, debido al movimiento de cargas durante la inversión, son prácticamente transparentes. En contraste, en la imagen de GSA, mostrada en la Figura b), se observan claramente franjas oscuras en dirección de alrededor de 120° sobre la horizontal. Estas franjas son resultado de la interferencia destructiva de las señales de GSA que se originan en cada frontera de los dominios, los cuales son invertidos con un desfase de 180° en la dirección del eje z .

La gráfica de magnitud del GSA vs potencia de excitación se muestra en la Figura c). Nótese el comportamiento prácticamente cuadrático característico en materiales no lineales de segundo orden; esto se comprueba al obtener una pendiente de 1.96 (trazo continuo) después de realizar el ajuste lineal en escala logarítmica. Por otro lado, el carácter anisotrópico también característico en la señal del GSA se muestra en la gráfica polar de la Figura d). El ángulo corresponde al ángulo de polarización del haz de excitación, el cual es un ángulo azimutal que yace en el plano xy de la muestra. La señal GSA muestra máximos

aproximadamente en 130° y 300° , respectivamente, y mínimos en 15° y 195° , respectivamente, pero sin llegar a ser cero.

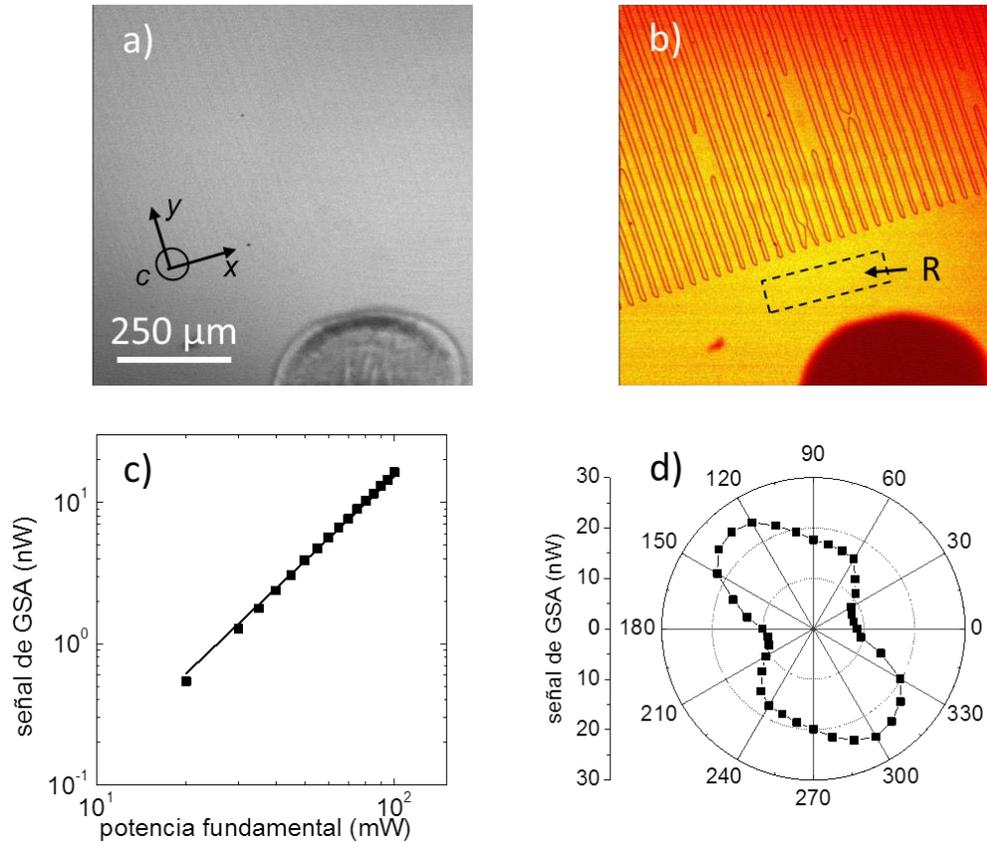


Figura 17. Caracterización de la señal de segundo armónico. Las imágenes de trasmisión (a) y de imagen de GSA (b) corresponden a una oblea de LiNbO₃ de aproximadamente 500μm de espesor con dominios invertidos. Dependencia promedio del GSA con respecto a la potencia (c) y a la polarización (d), obtenidas en la región R en la imagen (b). Las imágenes en son de 835×835 pixeles obtenidas con un objetivo de microscopio de 10× de magnificación teniendo una razón de 1.047 μm/pixel. El sistema coordenado ilustrado en (a) corresponde a la dirección cristalográfica del LiNbO₃, siendo “c” la dirección del eje principal paralelo al eje z.

Siendo la dirección del coeficiente no lineal efectivo, d_{333} , perpendicular al plano de las imágenes, la polarización del haz de excitación no es la óptima para generar segundo armónico. El valor máximo del GSA en la Figura d) corresponde por lo tanto a la excitación de la componente de susceptibilidad d_{222} . Sin embargo

no se descarta una contribución combinada de las componentes, d_{222} y d_{333} , sobre todo cuando se utilizan objetivos de microscopio con gran abertura numérica mismos que generan componentes del vector de campo en la dirección z debido al alto poder de enfoque. Es de esperarse pues que este efecto disminuya utilizando objetivos de microscopio de baja abertura numérica. De aquí que las imágenes de la Figura sean tomadas con un objetivo de baja amplificación. Con ello se busca que el vector del campo eléctrico del haz incidente no tenga componentes vectoriales en la dirección z teniendo contribuciones principalmente del coeficiente d_{222} cuando la dirección de polarización sea a lo largo del eje cristalográfico y (ver la Figura a).

4.2 Preparación de muestras de colágeno

4.2.1 Fibras de colágeno crecidas *in vitro*

Las imágenes de la Figura revelan la morfología que adquieren dos fibras de colágeno crecidas *in vitro*. Estas imágenes corresponden a fibras de diferentes muestras y se localizan (en algún lugar dentro ellas) en un área de alrededor de 1 cm²; área en donde previamente fue vertida solución de colágeno preparada con un nivel de pH=7. Las Figuras 18 a) y b) fueron tomadas con un microscopio de contraste de fase con el cual, para explicarlo en términos sencillos, las variaciones de índice de refracción de un espécimen transparente se hacen visibles. En las imágenes se pueden ver zonas donde ocurre la fibrogénesis, dichas zonas son identificadas por las ramificaciones oscuras en ambas imágenes. Asimismo se puede vislumbrar zonas blancas de diferente relieve en las cuales no existen estructuras fibrosas. La escala indicada con la línea horizontal en todas las imágenes es de 50 μm, dando una idea de las dimensiones de las fibras. Por ejemplo, la fibra de Figura a) tiene dimensiones aproximadamente de 26 μm de ancho y 500 μm de largo.

Para comprobar que las ramificaciones existentes en las Figuras 18 a-b) correspondan en efecto a fibras de colágeno, se tomaron imágenes en ambas muestras (bajo el mismo microscopio) utilizando dos polarizadores cruzados colocados antes y después de las muestras. Esto sabiendo de antemano que las fibras de colágeno son birrefringentes y, por tanto, la luz que incida linealmente polarizada sufrirá un ligero cambio en su polarización permitiendo el paso de la luz a través del segundo polarizador. Las imágenes obtenidas con polarizadores cruzados se muestran en las Figuras 18 c-d). Claramente se aprecia que en las zonas ramificadas la luz pasa a través del analizador, mientras que en las zonas con relieves blancos, donde también existe colágeno, la luz no lo atraviesa. Sin embargo, nótese también que la luz no atraviesa incluso todas las zonas ramificadas lo cual indica que la fibrogénesis no se lleva a cabo en forma

homogénea. Esto se comprueba más adelante con las imágenes generación de segundo armónico.

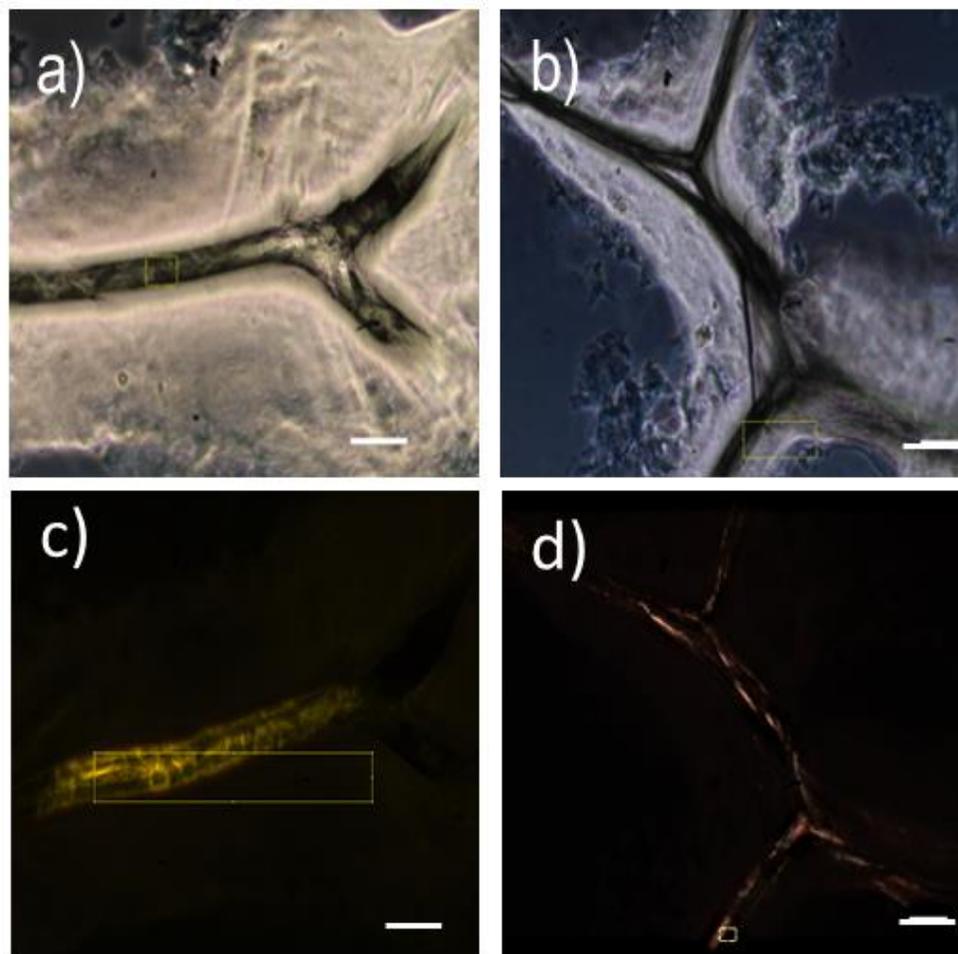


Figura 18. Fibras de colágeno crecidas *in vitro*. a) y b) Imágenes de contraste de fase. c) y d) Imágenes de birrefringencia tomadas con dos polarizadores cruzados. Para la toma de estas imágenes se utiliza un microscopio comercial con objetivo de 40x. La barra mostrada es de 50 μ m.

4.2.2 Monitoreo de la fibrogénesis de colágeno

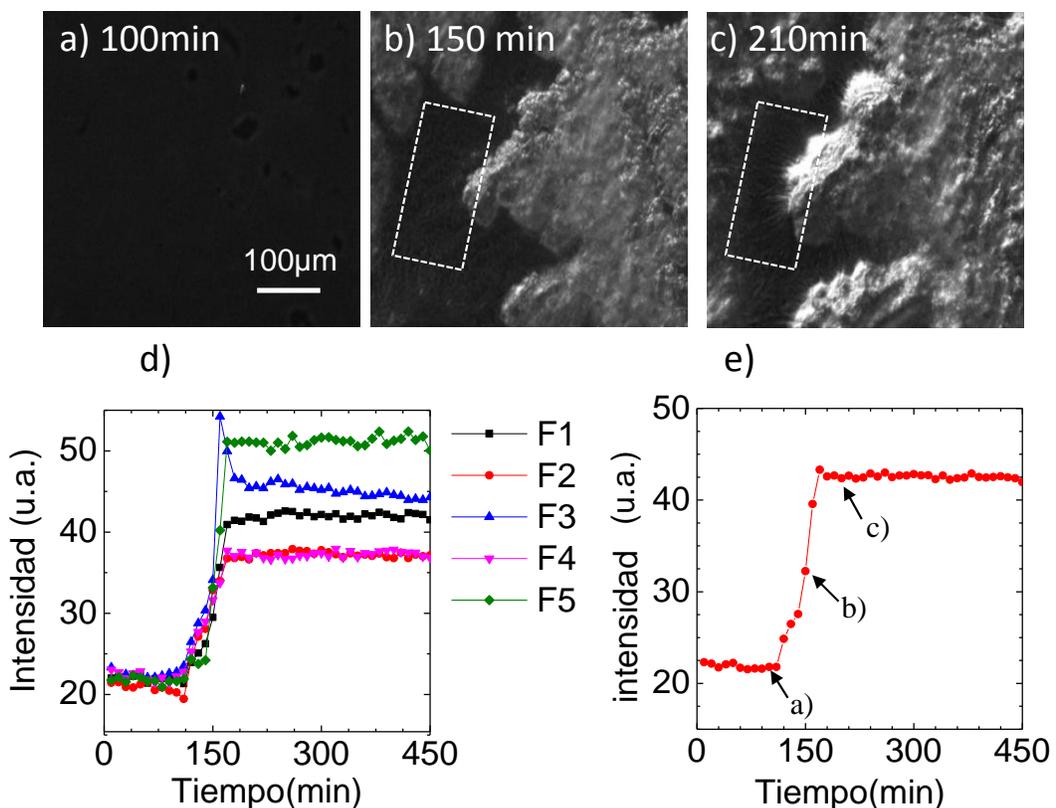


Figura 19. Monitoreo de la fibrogénesis del colágeno en una muestra preparada con pH de 7.5. Imágenes de birrefringencia (tomadas con polarizadores cruzados) antes (a), durante (b) y al final (c) de la fibrogénesis. d) Evolución de la intensidad transmitida en cinco fibras diferentes. e) Evolución promedio de d). Las imágenes (a-c) son imágenes de 2048x1536 píxeles tomadas con un objetivo de 10x en un microscopio invertido comercial con polarizadores cruzados antes y después de la muestra.

Durante la preparación de las muestras, independientemente del cuidado que se tenga para ello, siempre existe la posibilidad de que éstas sean contaminadas con estructuras microscópicas que se desprenden de los distintos utensilios de preparación y/o materiales de limpieza. Ejemplos típicos son la contaminación con polvo y, en particular, con fibras de celulosa desprendidas del papel para “cuarto limpio”, con el cual se limpian los utensilios. Al igual que el colágeno, la celulosa es

birrefringente y presenta propiedades no lineales de segundo orden (Zimmerly, et al., 2010). Para estar completamente seguros que las fibras observadas en la Figura de la sección anterior son efectivamente fibras de colágeno, y no de celulosa, se monitoreó el proceso de la fibrogenésis del colágeno *in vitro* utilizando microscopía de birrefringencia.

La Figura muestra el proceso de la formación de fibras de una solución de colágeno preparada con un nivel de pH de 7.5. En la Figura a) se puede observar que después de cien minutos de verter la solución de colágeno no existe todavía generación de fibras. Cincuenta minutos después se toma la imagen de la Figura b), donde se aprecia la formación de dos estructuras no homogéneas, como dos islas con relieves de gris claro a blanco brillante; entre más brillante más luz pasa por el segundo polarizador. En el cuadro (trazado con líneas segmentadas) de esta Figura b) se puede apreciar el inicio de la formación de diminutas fibras que salen de las fronteras de la isla central; esto es se ven fibras entre las regiones oscuras y claras. Posteriormente, al transcurrir tres horas ya no se aprecia más generación de islas ni fibras, pero sí existe un aumento en la intensidad de luz que pasa por las fibras (ver Figura c).

La evolución de la formación de las fibras se grafica en la Figura d). Aquí se traza la intensidad transmitida a través del segundo polarizador como función del tiempo. Esto se realiza en cinco diferentes fibras tomadas al azar (indicadas por F1-F5). El periodo entre la toma de imágenes es de 10 minutos. Se puede apreciar en todos los trazos una saturación en la intensidad en aproximadamente 170 minutos, lo cual nos indica que el proceso de auto-ensamble del colágeno ha terminado. Esto se ve más claro en la Figura e) donde se toma el promedio de los trazos de la Figura d), aquí se puede apreciar el crecimiento en la intensidad transmitida el cual inicia en 110 minutos y termina en 170; es decir, el tiempo que tarda en auto-ensamblarse el colágeno ocurre en un tiempo de aproximadamente una hora. En un estudio reciente sobre el monitoreo de la fibrogenésis se concluye que el tiempo de la formación de fibras depende del nivel de pH utilizado (Bancelin, et al., 2012). Cuando se tienen niveles por debajo del nivel neutro, esto es $\text{pH} = 7$,

se aumentan las repulsiones electrostáticas entre las moléculas (triple hélices) de colágeno. Según Bancelin, et al., los tiempos de formación pueden aumentarse de 50 minutos hasta 400 minutos disminuyendo el nivel de pH de 7.5 a 6.5. Nótese, por lo tanto, que el tiempo de formación de fibras obtenido en la Figura d) está en buen acuerdo con la literatura.

Otro efecto que puede esperarse al aumentar las repulsiones electrostáticas de las moléculas de colágeno disminuyendo el pH, es “controlar” la conglomeración de fibras. Esto se comprueba en la Figura la cual muestra la formación de fibras de una solución de colágeno preparada con un nivel de pH de 7.3. Aquí, al igual que en la Figura se muestran imágenes de birrefringencia tomadas antes (Figura a), durante (Figura b) y al final (Figura c) de la fibrogénesis. Claramente se puede apreciar menor conglomeración de colágeno en forma de islas y un aumento en estructuras en forma de fibras.

Sin embargo, contrario a lo expuesto dos párrafos atrás, el tiempo de formación de fibras en este caso disminuye considerablemente aun siendo menor el nivel de pH. Esto se puede apreciar en las gráficas de la evolución de la intensidad transmitida en cinco fibras diferentes (Figura d) y su respectiva gráfica promedio (Figura e), donde la formación inicia aproximadamente a los 33 minutos y termina a los 45 minutos; esto es, la fibrogénesis toma un tiempo de sólo 12 minutos. Un factor físico importante que no se tuvo en consideración durante estos experimentos, el cual puede ser una posible razón a esta contradicción, es el control de la temperatura. El crecimiento de las fibras de la Figura 19 y la Figura 20 se llevó a cabo en un ambiente de temperatura no controlado.

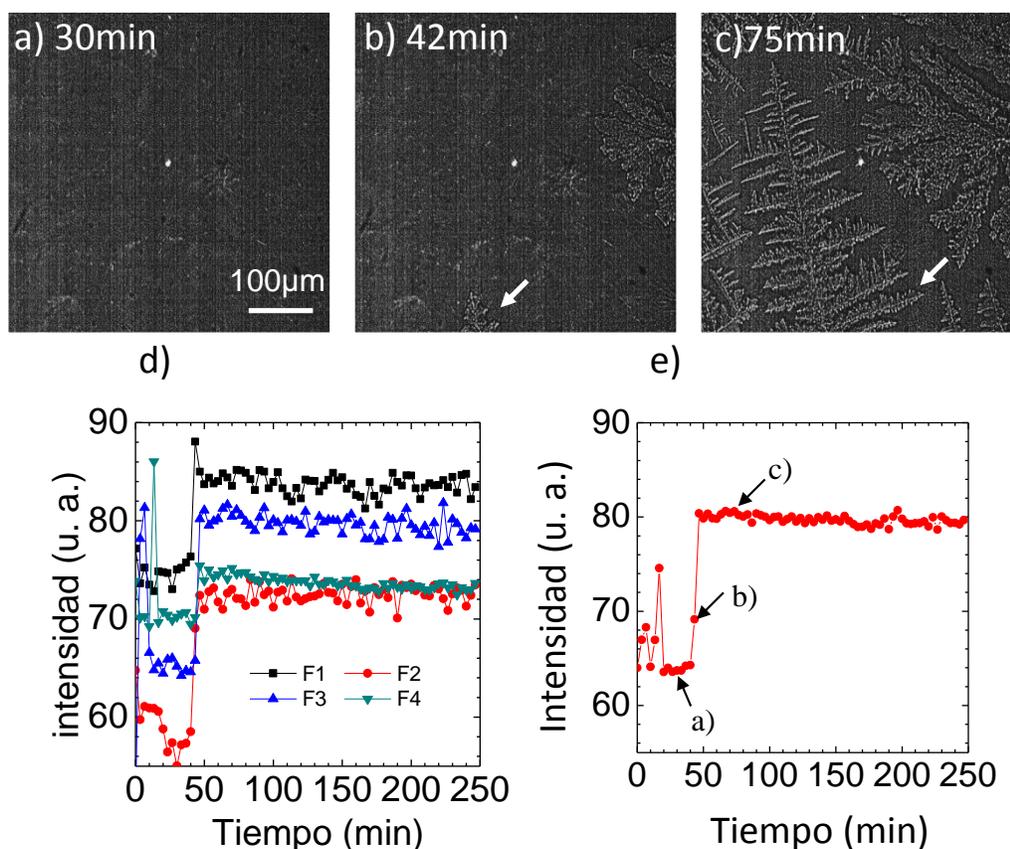


Figura 20. Monitoreo de la fibrogénesis del colágeno en una muestra preparada con pH de 7.3. Imágenes de birrefringencia (tomadas con polarizadores cruzados) antes (a), durante (b) y al final (c) de la fibrogénesis. d) Evolución de la intensidad transmitida en cinco fibras diferentes. e) Evolución promedio de d). Las imágenes (a-c) son imágenes de 2048x1536 píxeles tomadas con un objetivo de 10x en un microscopio invertido comercial con polarizadores cruzados antes y después de la muestra.

En experimentos de formación de microestructuras poliméricas (tipo fibras), a partir de hidrogeles de colágeno, se ha demostrado que la temperatura toma un rol muy importante existiendo cambios considerables en el diámetro de las “fibras” (Raub, et al., 2007). Raub reporta que, manteniendo un nivel de pH =7.4 y aumentando la temperatura en un rango de 20 a 34 °C, el diámetro de las “fibras” de colágeno decrece de 200 a 20 nm; lo cual hace una razón de cambio en el diámetro de las fibras de -13 nm/°C. Asimismo demuestra que el aumento en la temperatura tiene como consecuencia la disminución en el tiempo de formación de

fibras. Por ejemplo, para rangos de temperaturas de 24 a 37 °C, los tiempos de “polimerización” disminuyen de 45 a 20 minutos, respectivamente. Mientras que para rangos de 14 a 24°C, los tiempos varían de 300 a 45 minutos, respectivamente. Esto es, el tiempo de generación de fibras en este rango puede disminuir hasta - 25 min/°C. Estos rangos de temperaturas son rangos típicos en un laboratorio de Ensenada.

Para finalizar esta sección, cabe mencionar que el monitoreo de la fibrogénesis puede hacerse directamente con microscopía de segundo armónico, tal y como lo realizó recientemente Bancelin (Bancelin, et al., 2012). En nuestro caso, sin embargo, experimentos de esta naturaleza no pueden ser realizados por tener un arreglo de microscopio en configuración horizontal. Esto inevitablemente produce que sustancias líquidas o viscosas, tal y como lo es la solución del colágeno, se precipiten o resbalen.

4.3 Microscopía de segundo armónico en fibras de colágeno

Tal y como se menciona en la introducción de esta tesis, desde hace ya más de tres décadas se sabe que las fibras de colágeno presenta propiedades no lineales de segundo orden (Roth & Freund, 1979). Sin embargo, el origen y cuantificación de dicha no linealidad sigue siendo motivo de estudio. Asimismo se menciona que existe escasa literatura (prácticamente nula) en la cual se utilicen la microscopía de GSA para el estudio de la fibrogénesis del colágeno, siendo el trabajo reciente del grupo de M.-C. Schanne-Klein (Bancelin, et al., 2012), a decir por ellos mismos, los primeros en realizar dichos estudio. Sin embargo, en este trabajo los autores no estiman el valor de la susceptibilidad de segundo orden en las fibras de colágeno recién generadas. Aquí se pretende realizar esta cuantificación realizando un procedimiento similar al utilizado por Arne Erikson (Erikson, et al., 2007), en donde estiman el valor de los coeficientes de la susceptibilidad efectiva en fibras de colágeno natural mediante una comparación directa con el respectivo valor de los coeficientes efectivos de la susceptibilidad de un cristal de LiNbO₃.

4.3.1 GSA en fibras de colágeno natural

La Figura 11 ilustra los resultados típicos de GSA obtenidos en fibras de colágeno natural. Específicamente se muestra un extracto de un tendón de cola de rata el cual está conformado por fibras de colágeno tipo I. El tendón se “pega” y se distribuye uniformemente sobre un porta objetos de microscopio al cual se le deposita previamente una pequeña porción de gel de agar al 1 %. El agar no presenta propiedades ópticas no lineales de segundo orden. En la Figura 11 a) se muestra la imagen en transmisión mientras que en la Figura 11 b) se muestra la imagen de intensidad del GSA. Las imágenes son de 835x835 pixeles y fueron obtenidas con un objetivo de microscopio de 10x de magnificación teniendo una razón de 1.036 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. La dependencia del GSA con respecto a la potencia de entrada del haz fundamental y el ángulo de la polarización del haz excitante se muestran en las Figuras 21 c) y d), respectivamente. Para la toma de imágenes de segundo armónico, en esta ocasión se utiliza una ganancia del preamplificador de 10^5 ($G = 5$) y se aplica un voltaje al PMT de 0.625 kV. Los valores medidos en mili volts se convierten a unidades de nW utilizando la ecuación (29) con los parámetros de la tercera columna de la Tabla 3.

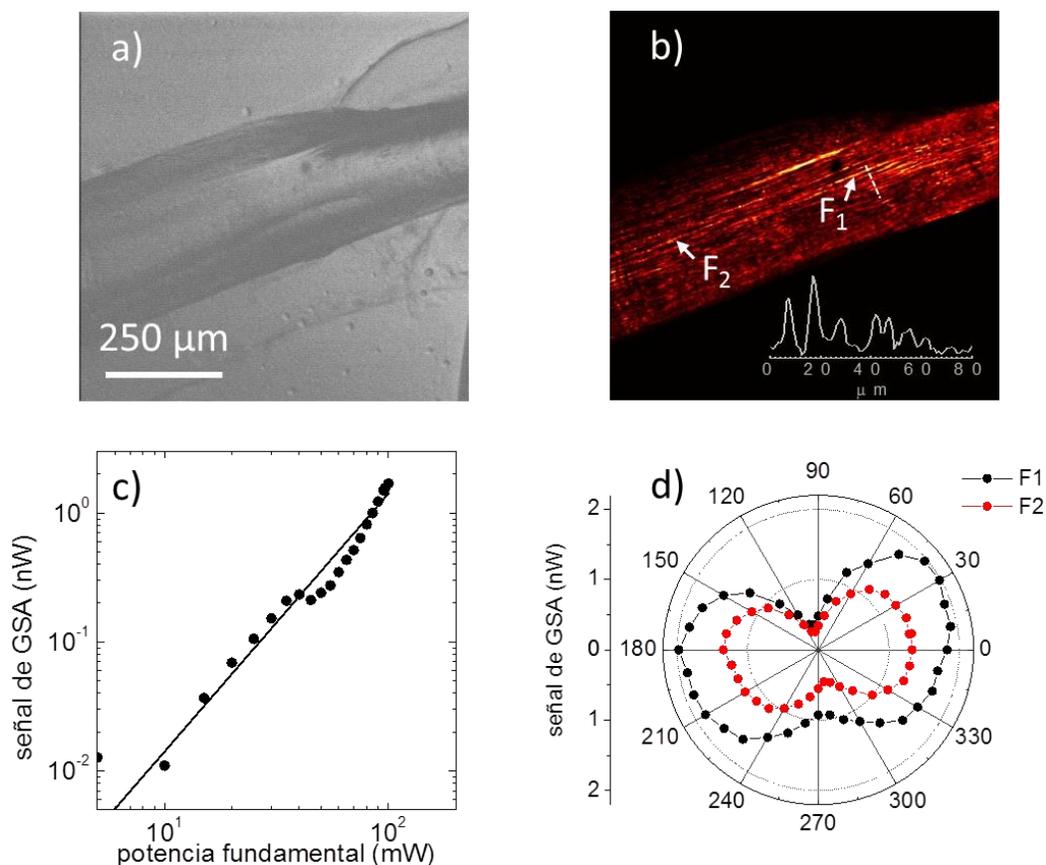


Figura 11. Dependencia de la señal de segundo armónico en función de la polarización y la potencia de la luz excitante, en una muestra con fibras de colágeno natural. Imagen de transmisión (a) e imagen de GSA (b) en el máximo de intensidad de la fibra F1. En (b) F1 y F2 indican dos fibras diferentes. La línea segmentada en b) muestra el trazo de intensidad donde se aprecian estructuras de 2μm, aproximadamente.

En la imagen de transmisión, las estructuras oscuras representan zonas donde existen fibras mientras que el agar, de consistencia semi-transparente, corresponde a la estructura clara (ver Figura 11 a). Nótese que debido el espesor de la fibra ($\sim 500\mu m$) las fibras no son claramente vistas debido a que todas estas “se proyectan en la imagen” en forma de sombra. En contraste en la imagen de GSA sí se observa claramente las fibras de colágeno. Esto debido a la propiedad de selectividad axial (en dirección de z) de la microscopía no lineal debido que los procesos ocurren principalmente en el foco. Asimismo, en la gráfica mostrada dentro de la Figura 11 b) se pueden observar fibras de alrededor de 2-4 μm. Esto

está en común acuerdo con la resolución medida en la Figura 14 d, donde se encontró una resolución lateral de $\delta_L \approx 3.3 \mu m$, la cual según la ecuación (25) de la sección III.2.1.2 (*Resolución lateral en microscopía no lineal*) se obtiene una resolución lateral $\delta_{NL} \approx 2.3 \mu m$, misma que está ligeramente por encima de la estimada en la Tabla 1, cuyo valor es de $\delta_{NL} \approx 1.64 \mu m$.

Por otro lado, la Figura 11 c) muestra la tendencia cuadrática típica de un proceso no lineal de segundo orden. La medición corresponde a la intensidad de la fibra marcada con F1, donde ocurre mayor intensidad. Los datos experimentales se muestran con círculos oscuros mientras la línea representa el caso ideal con pendiente de $m=2$. Nótese que existe una fibra aparentemente más brillante por encima de la seleccionada, no obstante en realidad es una fibra con un ancho aproximadamente del doble de F1. Por otro lado, los datos presentan una ligera caída en potencia debido seguramente a una caída en la potencia del láser de excitación. Esto es posible ya que antes de tomar los datos se calibra la potencia de excitación utilizando una placa retardadora y un polarizador tal y como se describe en la sección III.4 (*Microscopía de segundo armónico*). Durante la toma de datos simplemente se varía la placa retardadora y se toma la imagen, mientras que los valores asignados a la potencia se toman la previa calibración.

En la gráfica de la Figura 11 d) se muestra la dependencia de la señal GSA en fibras colágeno con respecto a la polarización del haz fundamental. Sólo para fines ilustrativos, se escogen dos fibras de la imagen de la Figura 11 b) denotadas por F1 y F2, respectivamente. Las gráficas demuestran el carácter anisotrópico de la señal de GSA en fibras de colágeno. Nótese que el máximo de la señal de GSA tiende a estar en la dirección del eje mayor de las fibras y se extiende en un “abanico” de $\pm 45^\circ$ en sobre el eje principal de las fibras. Este carácter típico en forma de “cascara de cacahuate” se puede apreciar mejor en la gráfica polar de la fibra F2, mismo que está en común acuerdo con la simulación mostrada en el Capítulo I, en particular en la simulación de fibras gruesas (ver línea segmentada de la Figura 6 i). De esta misma figura, se puede estimar el valor del ρ obteniendo la razón $I_{SHG}(15^\circ)/I_{SHG}(105^\circ)$, es decir la razón entre los valores del GSA con

polarización de excitación largo del eje mayor y el eje menor de la fibra el cual está dado por $\rho^2 = (\chi_{xxx}/\chi_{xyy})^2 \propto I_{SHG,x}/I_{SHG,y}$ (ver en la sección II.3 en el Capítulo III). Los valores de este parámetro son $\rho_{F1} = 1.85$ y $\rho_{F2} = 1.72$ para las fibras F1 y F2, respectivamente, los cuales están en acuerdo con el valor encontrado por (Bancelin, et al., 2012) cuyo valor es de 1.8.

4.3.2 Segundo armónico en fibras de colágeno crecidas *in vitro*

En la Figura se muestran los resultados del GSA tomados en una muestra con fibras de colágeno crecidas *in vitro*. La muestra fue preparada con un nivel de pH igual a 7. De igual forma que en la Figura 17 y la Figura 21 (resultados con NbLiO₃ y fibras de colágeno natural, respectivamente), las imágenes en la Figura 22 a) y b) corresponden a imágenes de transmisión y de segundo armónico, respectivamente, con tamaños de 835×835 pixeles, obtenidas con un objetivo de microscopio de 10x de magnificación. La dependencia del GSA con respecto a la potencia y el ángulo de la polarización del haz excitante se muestran en las Figuras 22 c) y d), respectivamente. Las imágenes de GSA presentan baja intensidad, por lo que es necesario utilizar una ganancia del preamplificador es de 10^7 ($G = 7$) y aplicar un voltaje al PMT de 0.85 kV. Al igual que en los casos anteriores, los valores medidos en mili volts se convierten a unidades de nW utilizando la ecuación (29), pero en esta ocasión con los parámetros de la quinta columna de la Tabla 3.

En la periferia de la imagen de transmisión se aprecian cuatro islotes con estructuras oscuras (ver Figura a). Dichas zonas oscuras son regiones en donde hubo generación de fibras, mientras que las zonas más claras y homogéneas corresponden a zonas de colágeno donde no hubo fibrogénesis. Para el análisis de la señal de GSA de la Figura b), se elige la isla de la parte superior derecha, misma que se extiende verticalmente de la parte central superior a la parte central derecha de la imagen, con dimensiones de aproximadamente, 200 μm de largo y

50 μm de ancho. Las tres zonas de colágeno denotadas por F1, F2 y R3, e indicadas con las flechas blancas en dicha isla, corresponden a dos fibras y una zona sin fibras, respectivamente.

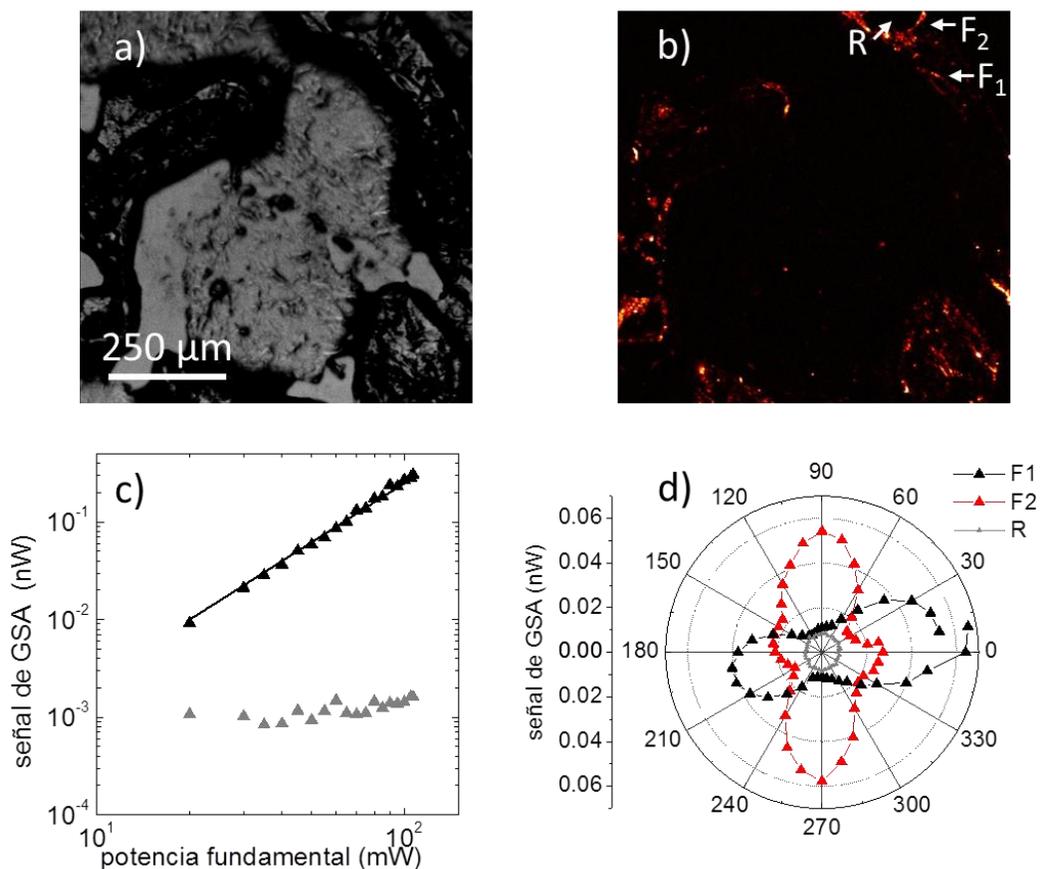


Figura 22. Dependencia de la señal de segundo armónico en una muestra con fibras de colágeno crecidas *in vitro* con $\text{pH} = 7$. Imagen de trasmisión (a) e imagen de GSA (b) en el máximo de intensidad de la fibra F2. F1 y F2 indican dos fibras diferentes, mientras que R indica una región de colágeno no fibrosa. La dependencia del GSA con respecto a la potencia y la polarización se muestran en (c) y (d), respectivamente. Las imágenes (a) y (b) son de 835×835 píxeles y fueron obtenidas con un objetivo de microscopio de $10 \times$ de magnificación teniendo una razón de $1.036 \mu\text{m}/\text{pixel}$.

En la Figura c) se demuestra el comportamiento cuadrático de la señal de GSA obtenida en la fibra F1. El ajuste lineal en escala logarítmica lo confirma cuya pendiente es de 1.98. La misma dependencia, más o menos de igual magnitud, se

obtiene en la fibra F2 (no mostrado en la figura), mientras que en la zona sin fibras (R) presenta un valor constante del GSA diferente de cero. Nótese que este valor constante muestra una clara anisotropía en la señal de GSA obtenidas en las dos fibras F1 y F2, siendo estas prácticamente ortogonales; donde existen máximos absolutos en 15° y 195° para la primera y 90° y 270° , respectivamente. En contraste la zona R presenta una tendencia completamente isotrópica. De esta misma figura se obtienen valores de $\rho_{F1} = 2.24$ y $\rho_{F2} = 1.52$ para las fibras F1 y F2, respectivamente, lo cual indica mayor grado de ordenamiento en las moléculas de colágeno que componen la fibra F1. De acuerdo a, Rebecca Williams *et. al.*, (Williams, et al., 2005) valores mayores de ρ pueden ser encontrados entre más homogénea sea la distribución y ordenamiento de las fibras; para localizar zonas con fibras más uniformes los autores utilizan un objetivo de microscopio de inmersión de aceite y mayor abertura numérica (40x, N.A. 1.4) encontrando valores $\rho = 2.6$.

Nótese también que los trazos polares obtenidos en la Figura d), son muy similares a los trazos simulados en la Figura 6 f del Capítulo I, en particular en la simulación de fibras delgadas. Lo anterior indica que las fibras generadas son de menor tamaño a las fibras de colágeno natural; es decir, son menores de $2 \mu\text{m}$ (ver gráfica en la Figura 21 b). Esto explica por qué no se aprecien estructuras fibrosas de la Figura 22 b), hay que recordar que el objetivo de microscopio utilizado no es capaz de resolverlas. No obstante hay que enfatizar que el uso de este objetivo fue por dos razones: por un lado disminuir posibles contribuciones de las componentes del tensor no lineal efectivo fuera del plano xy de la muestra de LiNbO_3 (ver Figura 17) y, por otro lado, disminuir el esparcimiento de la señal de GSA producido por la rugosidad de las muestras de colágeno crecidas *in vitro*, mismo que afecta directamente su detección.

Con base a los resultados de la Figura los cuales muestran dependencias cuadrática y anisotrópicas de la señal del GSA, típicas en materiales con no linealidad de segundo orden, aunado con la diferente dirección de crecimiento de las fibras F1 y F2, no existe duda de la generación de fibras en nuestras muestras.

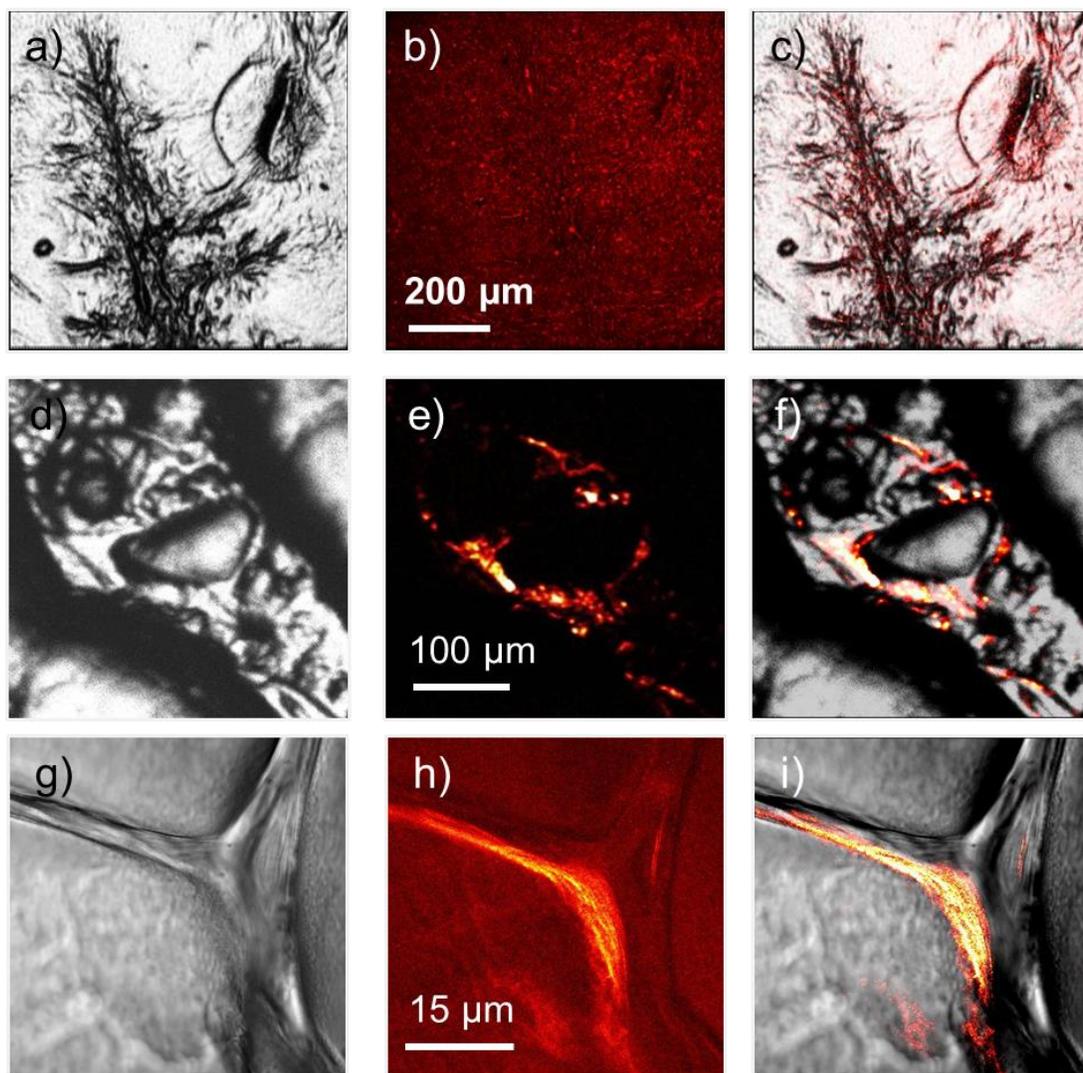


Figura 23. Imágenes de fibras de colágeno crecidas *in vitro* con pH 7.3 (a), pH 7 (d) y pH 7 (g), respectivamente. (a, d, g) imágenes de trasmisión;(b, e, h) imágenes de GSA;(c, f, i) traslape de las imágenes de trasmisión y GSA (a, b), (d, e) y (g, h), respectivamente. (a, d) son tomadas utilizando un objetivo de 10X. (g) Es tomada utilizando un objetivo de 40X.

La Figura muestra otros ejemplos de la GSA obtenida en tres diferentes muestras de colágeno crecidas *in vitro*. En la primera columna (ver Figura a, d, g) se muestran las imágenes de transmisión; la segunda columna (Figura b, e, h)

muestra las imágenes de GSA mientras que en la tercera columna (Figura c, f, i) se encuentran superpuestas tanto la imagen en transmisión como la imagen de GSA. Las muestras de las Figura a y d) fueron preparadas con un nivel de pH igual 7.3 y 7.0, respectivamente, y ambas fueron tomadas con el objetivo de 10x. Nótese que la Figura a) corresponde al GSA de la muestra monitoreada en la Figura 20 mientras que la Figura 23 d) corresponde a la amplificación de la zona analizada en la Figura 22.

Para comparar el microscopio no lineal aquí construido, en la imagen de la Figura g) se muestra una imagen tomada con el sistema no lineal de la Universidad de Irvine en California (UCI), el cual está construido sobre un sistema comercial, mismo que utiliza un objetivo de magnificación de 40x para la excitación y un condensador para la colección del GSA. Se puede apreciar una mejor resolución debido al objetivo de mayor NA, no obstante la señal de GSA, al igual que en las imágenes obtenidas en nuestro microscopio, no es muy intensa ni se encuentra en todas las estructuras aparentemente fibrosas. Como ya se mencionó, el utilizar un objetivo de 40x en nuestro sistema resultó en un problema técnico en la detección debido al esparcimiento de luz GSA, disminuyendo considerablemente la señal colectada por el PMT. Se espera que tales problemas técnicos sean corregidos una vez que se implemente la microscopía no lineal en un sistema comercial.

Finalmente, la Figura 24 compara las respectivas señales de segundo armónico obtenidas en el cristal de LiNbO_3 (cuadros negros), en la fibra de colágeno natural (círculos rojos), y en dos fibras de colágeno crecidas *in vitro* de pH = 7 (triángulos azules) y de pH = 7.5 (triángulos abiertos en color azul). Los primeros tres trazos (de arriba a abajo) corresponden a los gráficos de la Figura 17 d), la Figura 21 d) y la Figura 22 d), respectivamente. Obsérvese que la magnitud de la señal del GSA en fibras crecidas *in vitro*, no presenta fuerte dependencia con respecto al pH utilizado.

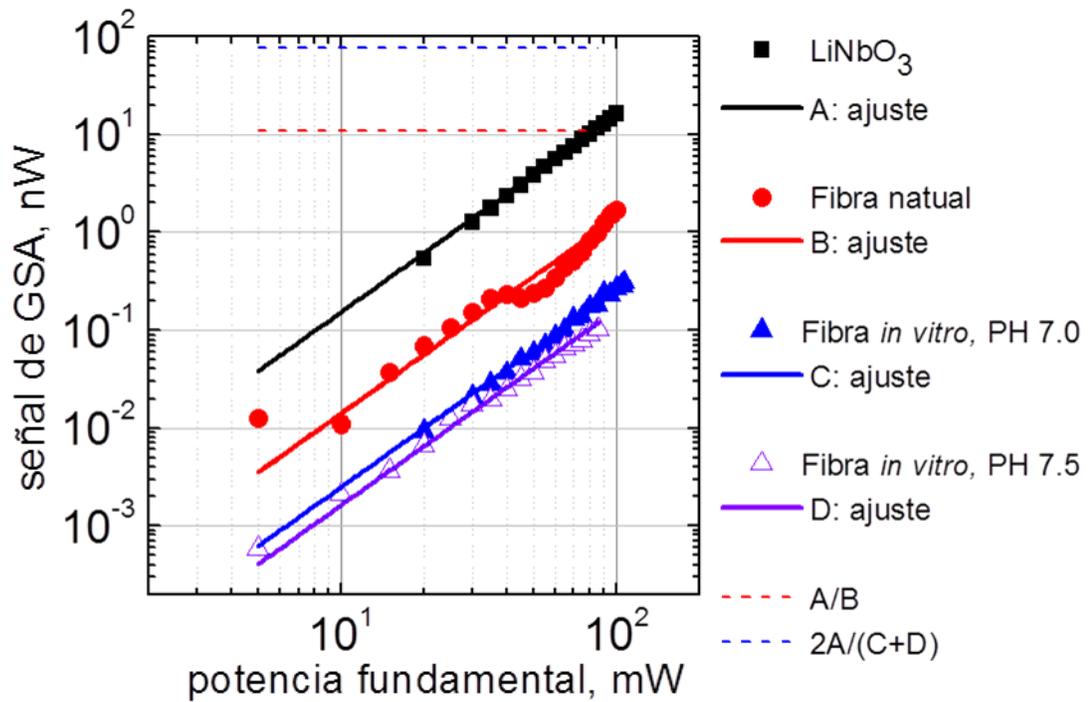


Figura 24. Cuantificación de la no linealidad de segundo orden en fibras de colágeno crecidas *in vitro* (leer texto).

Asimismo, se puede apreciar que la señal de GSA en fibras de colágeno natural es un orden de magnitud menor que en LiNbO_3 . Esto se puede ver con el trazo horizontal (líneas rojas segmentadas) con un valor de 10^1 , aproximadamente. Este trazo se obtiene de la razón entre la curva ajuste la señal de GSA en LiNbO_3 vs el correspondiente ajuste en fibras de colágeno (razón A/B en la Figura). En contraste, la señal de GSA en fibras de colágeno crecidas *in vitro* vs señal de GSA en LiNbO_3 es dos órdenes de magnitud menor, como se observa en el trazo horizontal con valor de 10^2 , aproximadamente (líneas segmentadas en azul), el cual se obtiene de la razón entre la curva ajuste del GSA en LiNbO_3 entre el promedio de los respectivos ajustes lineales en fibras de colágeno crecidas *in vitro* (razón $2A/(C+D)$ en la Figura).

Capítulo 5

Conclusiones

En este trabajo de tesis se presenta el desarrollo de un trabajo experimental en el área de la Biofotónica, en el cual se implementa la microscopía no lineal por medio de la generación de segundo armónico y se utiliza para estudiar la no linealidad óptica de segundo orden en fibras de colágeno generadas *in vitro*. Las conclusiones de esta tesis se pueden dividir de acuerdo los tres principales objetivos de la misma.

5.1 Respecto a la construcción y caracterización del microscopio

- Se toman imágenes de 835×835 píxeles², con una velocidad de muestreo de 0.1 ms por pixel. Se tienen un factor de conversión de $FC = 1.047 \mu\text{m}/\text{pixel}$, cuando se utiliza un objetivo de microscopio de 10x, y un factor de conversión es $FC = 0.284 \mu\text{m}/\text{pixel}$, con un objetivo de 40x. Esto es se toman imágenes que abarcan áreas de $874 \times 874 \mu\text{m}^2$ con el objetivo de 10x y de $237 \times 237 \mu\text{m}^2$ con el objetivo de 40x en alrededor de 68 segundos.
- Se mide un campo de visión que comprende un diámetro de alrededor de 0.6 mm, cubriendo un área aproximadamente $3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ (0.3 mm^2). Este campo de visión está limitado por el diámetro de la lente de escaneo.
- Se caracteriza el sistema de detección compuesto por un fotomultiplicador, cuya ganancia se regula con alto voltaje, y un preamplificador de corriente a voltaje. Se calculan los factores de conversión, dependientes del alto voltaje aplicado, para convertir las señales de voltaje a unidades de potencia.

- La resolución del sistema de barrido está limitada por la amplificación del sistema telescópico formado por la lente de escaneo y la lente del tubo. Mismo que limita el diámetro del haz que entra al objetivo de microscopio.

Resolución del sistema lineal

- Los cálculos de la resolución para microscopía de transmisión utilizando un láser de HeNe ($\lambda = 630$ nm) son de $\delta_L \approx 0.67\mu m$, $1.07\mu m$ y $1.76\mu m$, para objetivos de microscopio de 40x, 20x y 10x, respectivamente. En contraste para un láser de Ti:Za en modo CW ($\lambda = 830$ nm), se calculan valores de $\delta_L \approx 0.88\mu m$, $1.41\mu m$ y $2.32\mu m$, respectivamente.
- La medición experimental de la resolución utilizando un regla de precisión Ronchi en el plano focal, es de $\delta_L \approx 1\mu m$, con el objetivo de magnificación 40x y fuente de $\lambda = 630$ nm, y de $\delta_L \approx 3\mu m$ para el objetivo de 10x y fuente de $\lambda = 830$ nm.
- En las imágenes de fibras de colágeno natural, utilizando un objetivo de 40x y una fuente de $\lambda = 630$ nm, es posible resolver estructuras fibrosas por debajo de 1 micrómetro.

Resolución del sistema no lineal

- Los cálculos de la resolución para microscopía no lineal de segundo orden, el cual utiliza el láser de Ti:Za en modo pulsado, son de $\delta_{NL} \approx 0.62\mu m$, $0.99\mu m$ y $1.64\mu m$, para objetivos de microscopio de 40x, 20x y 10x, respectivamente.
- Las imágenes de GSA en fibras de colágeno natural, con el objetivo de magnificación 10x, se logra resolver estructuras fibrosas por debajo de 2 micrómetros.

5.2 Respecto a la preparación de muestras de fibras de colágeno crecidas *in vitro*

- Utilizando microscopía de birrefringencia se monitoreó el proceso de la fibrogénesis de colágeno en muestras crecidas *in vitro*. Comprobando con esto la generación de estructuras fibrosas en nuestras muestras.
- Se analizó la influencia de los parámetros de pH y temperatura, encontrando que la fibrogénesis se lleva a cabo en un lapso de dos horas. La regulación del pH a niveles utilizados según el protocolo, pH = 7.5, resulta en una generación conglomerada de fibras. Se encuentra que mediante la regulación del pH con valores cerca del valor neutro, pH=7, ayuda a disminuir dicha conglomeración, resultando fibras más definidas. Se confirma que la temperatura influye en gran manera en el tiempo de la fibrogénesis, un aumento en la temperatura de tan sólo un par de grados puede acelerar el proceso de formación de fibras.

5.3 Respecto a la no linealidad de segundo orden en fibras de colágeno crecidas *in vitro*

- Se confirma la fibrogénesis *in vitro* mediante la medición de la señal de segundo armónico. Las señales de GSA, obtenidas en zonas de la muestras donde ocurre la generación de fibras confirman las dependencias cuadrática y anisotrópicas típicas en de GSA en fibras de colágeno natural.
- Se mide experimentalmente la razón $\rho = \chi_{xxx}/\chi_{yyy}$, en fibras de colágeno crecidas *in vitro*, obteniendo valores en un rango de 1.52 a 2.24, lo cual indica un grado de ordenamiento entre las moléculas de colágeno auto-ensambladas, similar a las obtenidas en fibras de colágeno natural.

- El GSA en función de la polarización del haz fundamental muestra buena correlación con trazos simulados para fibras delgadas. Por tanto, las fibras generadas son de menor tamaño que la resolución del sistema ($\ll 1 \mu\text{m}$), lo cual se confirma por la baja resolución en las imágenes de GSA obtenidas utilizando el objetivo de baja abertura numérica.

5.4 Aportaciones realizadas

Las aportaciones principales de este trabajo de tesis son:

- La construcción y caracterización de un microscopio óptico no lineal en base a la generación de segundo armónico por primera vez en México. Asimismo marca el inicio del área de la microscopía no lineal en CICESE.
- Establecer la metodología para la preparación de muestras de colágeno crecidas *in vitro*.
- La incursión a un tema reciente y de gran impacto a nivel mundial, tal y como lo es el estudio del autoensamble del colágeno *in vitro* utilizando microscopía no lineal.

5.5 Propuestas para trabajos futuros

Dentro de las mejoras que se pueden realizar al trabajo realizado están: implementar el sistema en un microscopio óptico comercial, el uso de nuevos fotomultiplicadores con mayor eficiencia y nuevos objetivos de microscopio de mayor apertura numérica. Esto tendrá como consecuencia una mejoría en la resolución, en la colección de la señal y dará la posibilidad de desarrollar experimentos con muestras inmersas en líquidos. Asimismo se implementará un control en la dirección axial (eje z), para la toma de imágenes en 3D.

Respecto a la continuación del estudio de la fibrogénesis del colágeno *in vitro*, se suministrará Riboflavina (Rb) seguida de una iluminación con luz ultravioleta (UVA). Se espera aumentar la generación de enlaces covalentes entre las moléculas y reforzar su auto-ensamble. Los resultados obtenidos serán utilizados para derivar conclusiones sobre la influencia del tratamiento Rb/UVA, conocido en oftalmología como “Corneal Cross Linking” (CLL, por sus siglas en inglés), en el proceso de auto-ensamble del colágeno.

Referencias bibliográficas

Bancelin, S., Aimé, C., Coradin, T. & Schanne-Klein, M., (2012). In situ three-dimensional monitoring of collagen fibrillogenesis using GSA microscopy. *Biomedical Optics Express*, 3(6), 1446-1454.

Boyd, R. W., (2008). *Nolinear Optics*. Rochester, New York, Elsevier Inc..

Campagnola, P. C., Dong, C. Y., (2009). Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis. *Laser & Photonics Reviews*, 5(1), 13-26.

Campagnola, P. J., Millard, A. C. & Terasaki, M. H., (2002). Three-Dimensional High-Resolution Second-Harmonic Generation Imaging of Endogenous Structural Proteins in Biological Tissues. *Biophysical Journal*, 82(1), 493-508.

Campagnola, P. J., Mei-de Wei, L. A. & M., L. L., (1999). High-Resolution Nonlinear Optical Imaging of Live Cells by Second Harmonic Generation. *Biophysical Journal*, 77(6), 3341–3349.

Cudney, R.S., Ríos, L. A., Orozco Arellanes, M. J., Alonso, F. y Fonseca, J., (2002). Fabricación de Niobato de Litio periódicamente polarizado para óptica no lineal. *Revista Mexicana de Física*, 48(6), 548-555.

De Paz Lugo, P. (2006). Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares. (Tesis Doctoral) Universidad de Granada, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Recuperada de:
<http://www.imsersomayores.csic.es/documentos/documentos/tesis-paz-estimulacion.pdf>

Erikson, A, Ortegren, J., Hompland, T., De Lage Davies, C. & Lindgren, M. (2007). Quantification of the second order nolinear susceptibility of collagen I using a laser scanning microscope. *Journal of Biomedical Optics*, 12(4), 044002.

Freund, I., Deutsch., M., (1986). Macroscopic polarity of connectivetissue is due to discrete polar structures. *Biopolymers*, 25(4), 601–606.

Freund, I., Deutsch, M. & Sprecher, A., (1986). Connective-tissue polarity-optical 2nd-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon. *Biophysical Journal*, 50(4), 693–712.

Guy, C., Colin, J. R. S., (2004). Practical Limits of Resolution in Confocal and Non-Linear Microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 63, 18–22.

Helmchen, F., Winfried, D., (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*, 2 (12), 936.

Hetch, E., Zajac, A., (2000). Optics. San Francisco, C.A., Addison Wesley.

Kaya, Y., Sarikcioglu, L., Aslan, M., Kencebay, C., Demir, N., Derin, N., Angelov, D. N. & Yildirim, F. B., (2012). Comparison of the beneficial effect of melatonin on recovery after cut and crush sciatic nerve injury: a combined study using functional, electrophysiological, biochemical, and electron microscopic analyses. *Childs Nervous System*, 29(3):389-401. doi: 10.1007/s00381-012-1936-0

Meyer, H., Beneke, G., Kilian, H. G. & Wilke, W., (1978). Investigation of the superstructure of native collagen by a combination of small angle X-ray scattering, electron microscopy and light diffraction. *Colloid & Polymer Sci.*, 256(4), 313-322.

Nadkarni, S. K., Bouma, B. E., de Boer, J. & Tearney, G. J., (2009). Evaluation of collagen in atherosclerotic plaques: the use of two coherent laser-based imaging methods. *Lasers in Medical Sciences*, 24(3), 439–445.

Nan-Chang Su, G., Hidayat, M., Kimura, Y. & Yamamoto, G., (2003). In situ collagen gelation: a new method for constructing large tissue in rotary culture vessels. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 39(8), 368-374.

Raub, C. B., Suresh, V., Krasieva, T., Lyubovitsky, J., Mih, J. D., Putnam, A. J., Tromberg, B. J., & George S.C., (2007). Noninvasive Assessment of Collagen Gel Microstructure and Mechanics Using Multiphoton Microscopy. *Biophysical Journal*, 92(6), 2212–2222.

Reiser, K. M., Bratton, C., Yankelevich, D. R., Knoesen, A., Rocha-Mendoza, I., & Lotz, J., (2007). *Journal of Biomedical Optics*, 12(6), 064019.

Robles Agudo, M., (2005). Generación simultánea del segundo y tercer armónicos mediante cuasi-empatamiento de fases. (Tesis de Maestría) Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, Ensenada, México.

Rocha-Mendoza, I., Yankelevich, D. R., Wang, M., Reiser, K. M., Frank, C. W. & Knoesen, A., (2007). Sum Frequency Vibrational Spectroscopy: The Molecular Origins of the Optical Second-Order Nonlinearity of Collagen. *Biophysical Journal*, 93(12), pp. 4433-4444.

Roth, S., Freund, I., (1979). Second harmonic-generation in collagen. *Journal of Chemical Physics*, 70(4), 1637–1643.

Roth, S., Freund, I., (1981). Optical 2nd-harmonic scattering in rattail tendon. *Biopolymers*, 20(6), 1271–1290.

Roth, S., Freund, I., (1982). Second harmonic-generation and orientational order in connective-tissue a mosaic model for fibril orientational ordering in rat-tail tendon. *Journal of Applied Crystallography*, 15(1), 72–78.

Sellaro, T. L., (2003). Effects of collagen orientation on the medium-term fatigue response of heart valve biomaterials. (Master's Thesis) University of Pittsburgh, School of Engineering, Pittsburgh, Pennsylvania. Recuperada de: <http://d-scholarship.pitt.edu/7546/1/Sellaro.pdf>

Squier, J., Müller, M., (2001). High resolution nonlinear microscopy: A review of sources and methods for achieving optimal imaging. 72 (7), 2875.

Tamayo Rivera, L., (2009). Estudio de la dinámica de la respuesta no lineal en materiales orgánicos y materiales nanoestructurados (Tesis Doctoral) Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, Ensenada, México. Recuperada de: <http://biblioteca.cicese.mx/catalogos/tesis/download.php?id=18271>

Tan, H. Y., Sun, Y., Lin, S. J., Lo, W., Hsueh, C.M., Hsiao, C.H., Lin, W.Ch., Huang, S.C.M, Chen-Yuan. D., Jee, S.H., Chen, Y.F., & Yu, H.S., (2006). Multiphoton Fluorescence and Second Harmonic Generation Imaging of the Structural Alterations in Keratoconus Ex Vivo. *Investigative Ophthalmology Visual & Science*, 47(12), 5251-5259.

Teng, S. W, Tan, H.Y., Sun, Y., Lin, S.J., Lo, W., Hsueh, Ch.M., Hsiao, C.H., Lin, W.C., Huang, S. C.M. & Chen-Yuan, D., (2007). Multiphoton Fluorescence and Second Harmonic Generation Microscopy for Imaging Structural Alterations in Corneal Scar Tissue in Penetrating Full Thickness Wound. *Arch Ophthalmol*, 125(7), 977-978.

Thomson , H. J., Busuttil, A., Eastwood, M. A., Smith, A. N. & Elton, R. A., (1987). Submucosal collagen changes in the normal colon and in diverticular disease. *International Journal of Colorectal Disease*, 2(4), 208-213.

Wachler, B. S. B., (2005). Corneal Collagen Crosslinking with Riboflavin, *Cataract and Refractive Surgery Today*. Recuperada de: <http://www.keratoconusinserts.com/images/pdf/C3-RforKC.pdf>

Williams, R. M., Zipfel, W. R. & Webb, W. W., (2005). Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils. *Biophysical Journal*, 88,1377-1386.

Zimmerly, M., Younger, R., Valenton, T., Oretel, D. C., Ward, J. L. & Potma, E. O., (2010). Molecular orientation in Dry and Hydrated Cellulose Fibers: A Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy Study. *The Journal Physical. Chemistry B*, 114,10200-10208.

Zipfel, W. R., Williams, R. M., Christie, R., Yu Nikitin, A., Hyman, B. T. & Webb, W., (2003). Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 7075–7080.