Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Memòria justificativa de recerca de les convocatòries BE, PIV, BCC, NANOS i BP

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Nom de la convocatòria
BE

Llegenda per a les convocatòries:

BCC	Convocatòria de beques per a joves membres de comunitats catalanes a l'exterior (BCC)
BE	Beques per a estades per a la recerca fora de Catalunya (BE)
BP	Convocatòria d'ajuts postdoctorals dins del programa Beatriu de Pinós (BP)
NANOS	Beques de recerca per a la formació en el camp de les nanotecnologies (NANOS)
PIV	Beques de recerca per a professors i investigadors visitants a Catalunya (PIV)

Títol del projecte: ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Empleo de óptica adaptativa y fluorescencia en un oftalmoscopio laser de barrido para el registro de células ganglionares

Dades de l'investigador

Nom	Cognoms
David	**Williams**

Correu electrònic
david@cvs.rochester.edu

Dades del centre d'origen

Centro de Ciencias de la Visión. Universidad de Rochester
Meliora Hall 272, Rochester, New York 14627-0270 (USA)

Número d'expedient
2006BE 00152

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
Oftalmoscopio laser de barrido, optica adaptativa, rertina, celulas retinales, celulas ganglionares, resolución lateral y axila, sofware de diseño óptico

Data de presentació de la justificació
16/07/2007

Generalitat de Catalunya
Departament d'Educació
i Universitats

Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Resum del projecte: cal adjuntar dos resums del document, l'un en anglès i l'altre en la llengua del document, on s'esmenti la durada de l'acció

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

La estancia realizada en la Universidad de Rochester estuvo orientada al aprendizaje en profudidad del oftalmoscopio laser de barrido. Este oftalmoscopio emplea una técnica confocal con la finalidad de visualizar diferentes estructuras retinianas en seres vivos. El intrumento diseñado y desarrollado en el Centro de Ciencias de la Visión donde fueran realizadas las prácticas, incorpora un sistema de óptica adaptativa y fluorenscencia. La optica adaptativa aplicada en este oftalmoscopio tiene como objetivo corregir las aberraciones existentes en el ojo y así permitir observar detalles de la retina que de otra forma se verían emborronados. De esta forma se consigue alncazar valores de resolución muy cercanos a los impuestos por difracción. Por otro lado el uso de fluorescencia tiene por objetivo el permitir la visualización de células y estructuras que, de no ser teñidas, son transparentes a la luz y visible. Esta técnica se ha estado utilizando principalmente en primates y ratas, aunque actualmente también se están llevando a cabo medidas de celulas de epitelio pigmentario en seres humanos ya que el pigmento contenido en estas células permite la aplicación de la fluorescencia sin necesidad de utilizar tinción. Mi mayor participación estuvo orientada al soporte en las sesiones de medidas llevadas a cabo en monos mediantes el manejo del sistema que controla la optica adaptativa. Además, parte de mi trabajo consistió en la medida de la reolución axial del sistema en condiones reales de medida. En una segunda etapa mi dedicación estuvo diriijida al diseño de un sistema que permita la corrección de aberraciones de bajo orden como desenfoque y astigmatismo en ratas que, debido a la gran potencia optica de estos seres vivos, su corrección no resulta algo trivial.

Resum en anglès(màxim 300 paraules)
The aim of the staying in the University of Rochester was the learning in detail of the scanning laser ophthalmoscope. This ophthalmoscope employ a confocal tecnique to visualize different retinal structures in living beings. This instrument was designed and developed in the Center for Visual Sciences where the practices were carried out. It incorpores an adaptive optics system and fluorescence. Adaptive optcis aplied to ophthalmology has the objetive of correcting aberrations of the eye and, thus, to allow us to see retinal details which, in other cases, would be seen blurred. In this way it is posible to get resolution values very close to the one imposeed by difraction. On the other hand, the aplication of fluorescence allows us visualize cells and structures that are transparent to visible light without the use of dye. This technique has been used mainly in primates and rats, although presently measurements of retinal pigmentary epithelium are carried out since the pigment located in this cells allows us the aplication of fluoresence without having to use any kind of dye. My principal participation was targeted to the support in sessions where monkies were measured and my task, in most of the cases, was to manipulate the software that controls the adaptive optics system. Furthemore, mi work was aimed to the measurement of the axial resolution of the system under actual measurement condicions. In a second stage, I dedicated to the design of a system that corrects low order aberrations, like defocus and astigmatism in rats which due to the high optical power of the rat eyes, its correction is not trivial.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

Contenidos

1. Introducción 4
2. Imágenes de celulas retinales 2
3. Incorporación de óptica adaptativa y fluorescencia 2
4. Trabajo realizado. 5
4.1. Medida de la resolución del sistema SLO 5
4.1.1. Resultados sobre la resolución lateral 7
4.2. Mejoras propuestas al sistema utilizado en ratas 9
4.2.1. Resultados de los sistemas propuestos 12
5. Discusión 15
6. Conclusiones 15
7. Agradecimientos 16
8. Referencias 17

1. Introducción

La retina humana es una estructura en capas compleja responsable de la detección de la luz y su transmisión neuronal al cerebro. Pasando a través de la córnea, el cristalino y los humores vítreo y acuoso, la luz encuentra las primeras capas transparentes de la retina como la capa de fibras, la capa de células ganglionares, capa sináptica, capa de fibras nerviosas y, finalmente, conos y bastones que son los fotorreceptores donde la mayor parte de la luz es absorbida. Esta luz dispara ciertas conexiones sinápticas en los fotorreceptores que comunican con las diferentes tipos de células. El registro de imágenes retinianas es una herramienta clínica de gran importancia que actualmente presenta grandes desafíos, algunos de los cuales han sido superados recientemente gracias al avance tecnológico. El ojo ofrece una pequeña apertura de entrada, la pupila, la cual puede variar en tamaño entre 1 y 8 mm dependiendo del uso de midríaticos. Además el ojo no mantiene una posición estática sino que se producen movimientos sacádicos, cerca de 6 por segundo, lo cual requiere de una técnica que permita obtener imágenes en un corto tiempo de exposición. Este requerimiento es complicado debido a la sensibilidad del tejido retiniano a la luz lo que excluye el uso de fuetes de luz de alta energía. Además el fundus en si mismo tiene una estructura compleja reuniendo una serie de funcionalidades diferentes lo cual hace deseable el obtener imágenes de la retina en tres dimensiones.

El oftalmoscopio láser de barrido (en adelante SLO, del inglés scanning laser ophthalmoscope) ofrece un número de soluciones únicas a estos problemas. En esta introducción se brindará una breve descripción del principio de funcionamiento de estos sistemas aunque las bases teóricas y una descripción más detallada podrán encontrarse en la bibliografía indicada. El principio de funcionamiento del SLO ha sido explicado en varias publicaciones (por ejemplo Manivannan (1993)). Básicamente el frente de onda de un haz láser es modificado por un conjunto de lentes para permitir que este sea enfocado en la retina. El haz pasa a través de un divisor de haz (del inglés beamspliter) el cual se utiliza para separar el camino de iluminación del camino de registro. Además, este láser es deflectado tanto horizontal como verticalmente por medio de dos espejos capaces de oscilar a frecuencias superiores a los 16 kHz. De esta forma se consigue que el haz barra una determinada área en la retina. La luz es reflejada en la retina viajando en sentido contrario y atravesando nuevamente los medios oculares. En el camino inverso la luz reflejada vuelve a recorrer el camino formado por los espejos produciendo el desescaneo del haz. Nuevamente atraviesa el separador de haz para finalmente ser enfocado por medio de una lente sobre un fotodetecor cuya señal eléctrica es digitalizada por medio de una placa de video. Así la información puede ser almacenada, procesada y visualizada en un ordenador. Los tiempos típicos de adquisición son de decenas de milisegundos lo cual minimiza la degradación que podría producirse en la imagen debido a

los movimientos sacádicos. El gran avance producido en este tipo de sistema se dio en 1987 cuando se introdujo al sistema una apertura delante del fotodetector convirtiéndolo en un sistema confocal (Weeb, 1987) lo cual reduce la difusión de la luz colectada y, además, le confiere al sistema resolución axial lo cual ofrece la posibilidad de obtener imágenes en 3D de la retina. Con la introducción del SLO digital (Plesch, 1987) las imágenes pudieron ser registradas a una frecuencia de 25 cuadros por segundo lo que permitió el uso de placas de video convencionales. El primer sistema SLO comercial utilizaba una fuente láser de He-Ne y daba un ángulo de observación de 40º. Actualmente solo un pequeño número de empresas ofrecen SLOs para uso clínico.

2. Imágenes de células retinianas

La retina tiene un espesor entre 200 y 400 micrómetros y en este espesor se encuentran millones de células divididas en diferentes clases dedicadas al procesamiento y la transmisión de la información. Estas clases celulares son: los fotorreceptores (conos y bastones), células bipolares, células horizontales, células ganglionares, y células amácrinas. Cada grupo celular se divide a su vez en numerosas subclases, las cuales se distinguen por su especificación funcional y morfológicamente por su tamaño, campo dendrítico (área sobre la cual las señales son colectadas), e interconexiones celulares. La variedad en subclases es un área que está actualmente en investigación.

El interés en el registro de imágenes de células retinianas fue motivado inicialmente por la necesidad de entender la estructura básica y las diferentes funciones de la retina. Cajal realizó un enorme aporte al conocimiento acerca de la morfología de las células retinianas a finales del siglo XIX. En el siglo 20 a medida que la medicina y la tecnología avanzaron, la observación de células retinianas se volvió importante para el entendimiento en la progresión de patologías retinianas y sus mecanismos de acción. Actualmente el registro de imágenes retinianas es de gran importancia para el diagnóstico y el tratamiento de determinadas patologías.

El registro de células in vivo es un método de gran impacto desde el punto de vista clínico para la mayoría de las aplicaciones, no solo porque puede aplicarse en cualquier individuo, sino además, porque no altera la estructura y las células pueden funcionar normalmente. Pero la tecnología requerida para la generación de este tipo de imágenes está disponible desde hace unos pocos años.

3. Incorporación de óptica adaptativa y fluorescencia

Los sistemas de óptica adaptativa utilizan elementos ópticos activos para compensar la degradación inducida en el frente de onda por las aberraciones en el camino óptico entre el objeto y la imagen. El astrónomo, Horace Badcock fue el primero en utilizar esta idea en 1953 en astronomía realizada desde la tierra. Dos décadas más tarde, cuando la tecnología se encontraba en un estado mucho más avanzado, el Departamento de Defensa de los Estados Unidos de América clasificó el desarrolló de los sistemas de óptica adaptativa utilizados en imagen satelital. El problema que se trataba de resolver consistía en generar imágenes de objetos ubicados en el espacio desde la tierra, a través de la atmósfera. La atmósfera es un medio en constante cambio, con diferentes gradientes de temperatura que pueden degradar significativamente la calidad de los telescopios terrestres.

En mayo de 1991 el gobierno desclasificó este trabajo sobre óptica adaptativa, creando oportunidades extraordinarias para los astrónomos y eventualmente para la ciencia de la visión y otras especialidades ópticas para mejorar la calidad de las imágenes y el funcionamiento de los sistemas ópticos. Desde entonces, numerosos observatorios terrestres han incorporado el uso de óptica adaptativa. Adicionalmente en 1996 (J. Liang; D Williams y D. Miller, 1996 y 1997) demostraron la aplicación de la óptica adaptativa en la corrección de aberraciones en ojos humanos.

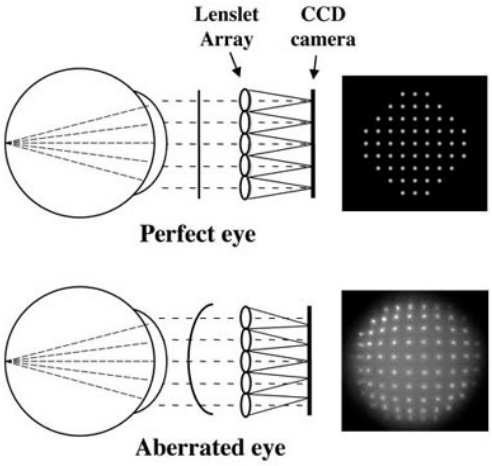

Figura 1. Ejemplo de un sensor Hartmann-Shack

Los sistemas de óptica adaptativa de tiempo real para astronomía y visión requieren el uso de sensores de frente de onda rápidos. El sensor más comúnmente utilizado es el Hartmann-Shack. Este dispositivo muestrea el frente de onda en un punto ópticamente conjugado con el medio que genera la aberración a través de una matriz de microlentes de corta longitud focal. Cada microlente crea la imagen de un punto (en adelante spot) la cual es digitalizada por medio de una cámara CCD. Si la imagen estaría representando un frente de onda perfecto, la imagen obtenida sería una cuadrícula uniforme de puntos. Pero si el frente de onda presenta aberraciones cada spot no estará enfocado en el centro de cada microlente, y será desviado de acuerdo al grado de la aberración (ver figura 1). Este desplazamiento transversal representa la pendiente del frente de onda. A través de un simple algoritmo, el frente de onda puede ser recreado por medio del análisis de cada spot y su desplazamiento relativo al centro de su correspondiente microlente. Dado el actual estado tecnológico de las cámaras CCD se pueden obtener sensores extremadamente rápidos para ser aplicados en óptica adaptativa. Una vez que la aberración de onda ha sido medida se debe corregir. Los dispositivos más ampliamente utilizados para realizar esta corrección son los espejos deformables que se ubican en un plano que, nuevamente, está ópticamente conjugado con el medio aberrante. Sin embargo otros dispositivos han sido utilizados como Moduladores de Luz de cristal líquido y su aplicación ya ha sido demostrada en este campo. De forma simplificada un espejo deformable consiste de una capa flexible reflectora apoyada sorbe una matriz de pistones actuadores. Estos actuadores empujan el espejo independientemente de acuerdo a la deformación deseada.

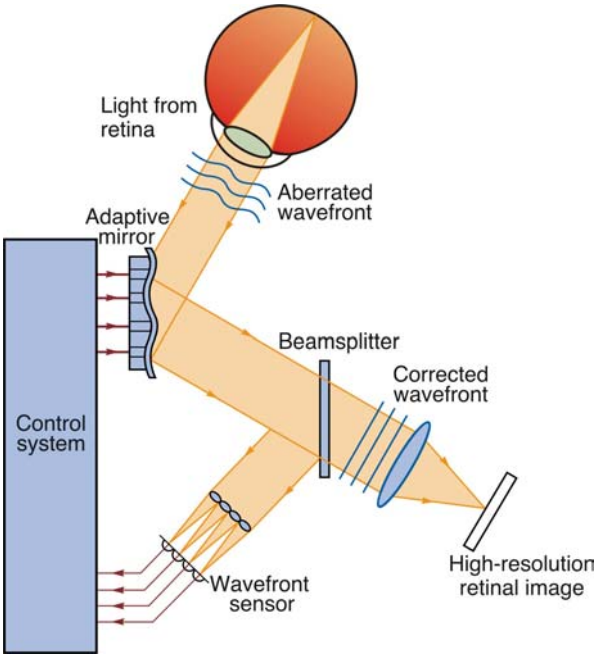

Figura 2. Representación de un sistema de óptica adaptativa adaptado de una figura de Chris Dainty, Nation University of Ireland, Galway.

Para que el sistema de OA funcione se requiere que un sensor mida el frente de onda, un ordenador calcule la corrección requerida y una señal sea enviada al espejo deformable para producir la compensación en el frente de onda (ver figura 2). En sistemas de tiempo real la corrección de óptica adaptativa ocurre repetidamente hasta que se alcanza un umbral donde el error observado es suficientemente pequeño para ser despreciado.

En los últimos 10 años los sistemas de óptica adaptativa (en adelante OA) han demostrado permitir la visualización de células retinianas in vivo vistas a través de la óptica ocular (Williams, 1999; Hofer, 2001; Liang 1997; Yoon, 2001) (ver figura 3). Hasta la aplicación de la OA la degradación de las imágenes retinianas debido a las imperfecciones de la óptica ocular imposibilitaba la observación de determinadas células como los fotorreceptores. El estudio sobre estas células y pruebas fisiológicas realizadas ha brindado importantes aportes al entendimiento de de los fotorreceptores y su función visual. En 2002 la OA ha sido aplicada también en sistemas SLO por Roorda y colaboradores (Roorda, 2002). En esta aplicación los sistemas de OA aportan mejoras a las ventajas ya existentes de la microscopía confocal.

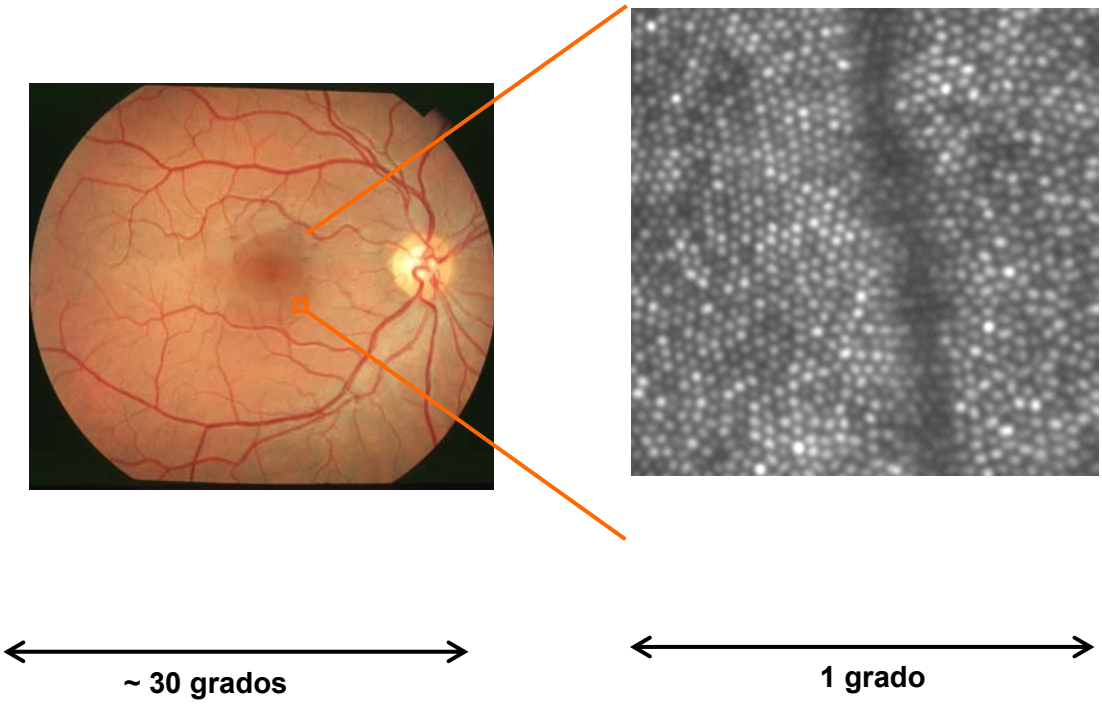

Figura 3. Porción de la retina a visualizar (izquierda) e imagen de alta resolución de la retina utilizando óptica adaptativa (derecha) donde se pueden observar conos.

Por otro lado, sistemas SLO de fluorescencia son utilizados rutinariamente en estudios clínicos con el fin de observar grandes áreas de la retina por medio del uso de colorantes para permitir la visualización de la función vascular. En este sentido cabe aclarar que el uso de OA y fluorescencia no había sido aún probado en sistemas SLO y era el principal objetivo de unos de los proyectos llevados a cabo en el Centre for Visual Sciences de la Universidad de Rochester.

Como ya fuera mencionado, muchas de las células retinianas son transparentes y no pueden ser observadas a través de imágenes típicas de reflectancia. La posibilidad de observar in vivo células como las ganglionares es de gran importancia ya que no solo permitiría conocer muchas de las funciones que estas células desempeñan, sino además, diagnosticar ciertas

patologías retinianas ya que es sabido que estas células son las primeras en sufrir los efectos del glaucoma. El glaucoma es la principal causa de ceguera irreversible en los Estados Unidos. Mientras 2.5 millones de personas tienen glaucoma, solo 1 millón sabe que padece la enfermedad. Esto se debe en parte a la incapacidad de contar con un sistema que permita medir esta patología antes que la misma presente los primeros síntomas. Debido al tamaño de las células ganglionares y su transparencia, no hay manera de saber si las células están muriendo debido a esta patología. Contar con un dispositivo capaz de discriminar células ganglionares marcadas por medio de la aplicación de fluorescencia podría permitir identificar glaucoma antes que se produzca pérdida de visión. Actualmente el glaucoma puede ser tratado pero cualquier pérdida de visión producto de la muerte de células retinianas es irreversible. Sin embargo actualmente no existen métodos de marcaje seguros para ser aplicados en seres humanos lo que imposibilita el uso de fluorescencia para la visualización de células ganglionares. Se debe aclarar que no es este el objetivo de este proyecto, sino el desarrollo de la tecnología que pueda ser probada en animales y que, en el futuro, podría ser aplicada en seres humanos en condiciones seguras.

4. Plan de trabajo

4.1. Medida de la resolución del sistema SLO

Una vez incorporado al Centre for Visual Science de la Universidad de Rochester, comencé con el estudio acerca del sistema SLO que fuera diseñado y desarrollado íntegramente en el centro. En los días inmediatos a mi incorporación al grupo de investigación se llevó adelante el Fall Vision Meeting de la OSA, los días 6 a 8 de octubre, organizado por el grupo de Rochester. Ya habíamos acordado con el Dr. Williams mi asistencia al congreso el cual fue de gran utilidad ya que me permitió asistir a diversas comunicaciones sobre las diferentes técnicas empleadas para la visualización de la retina. Esto me brindó un panorama mucho más detallado del estado del arte en el que se encuentran los diferentes instrumentos dedicados al registro de imágenes retinianas.

Posteriormente comencé a asistir a sesiones de medidas que se estaban llevando a cabo en primates. En este punto cabe indicar que existen diferentes proyectos en los que se hace uso del mismo instrumento, pero que cada uno tiene finalidades muy diferentes. A esto se suman otros grupos de investigación de otras universidades de los Estados Unidos los cuales cuentan con sistemas con capacidades similares. Y en este sentido se hace evidente el gran beneficio que esto genera creando una dinámica de trabajo de rápida respuesta y gran capacidad resolutiva, ya que los conocimientos son compartidos por todos los grupos con el afán de avanzar hacia un sistema robusto y que pueda aportar en un futuro inmediato una herramienta de gran utilidad oftalmológica.

Estos grupos han iniciado un proyecto de investigación conjunto con la finalidad de estudiar diferentes estructuras y funciones de células retinianas mediante el uso del oftalmoscopio láser de barrido con optica adaptativa (AOSLO). El centro de Rochester está llevando a cabo tres estudios con este sistema, los cuales incorporarán fluorescencia. El profesor William Merigan (http://www.cvs.rochester.edu/people/w_merigan/merigan.html) y Dan Gray (http://www.cvs.rochester.edu/williamslab/p_gray.html) utilizan el sistema AOSLO para registrar células ganglionares coloreadas con Rodamina Dextran en primates vivos. A su vez Jessica Wolfing (http://www.cvs.rochester.edu/williamslab/p_wolfing.html) dedica sus esfuerzos en la visualización de células del epitelio pigmentario, y Ying Geng tiene por objetivo tomar imágenes de fotorreceptores marcados de un modelo de rata de Retinitis pigmentosa.

Durante las primeras visitas al laboratorio Dan Gray se encargó de mostrarme las diferentes posibilidades que ofrece el sistema, ciertos aspectos teóricos relacionados con la óptica del equipo y el modo de funcionamiento de algunas de las partes que componen dicho sistema. Se debe tener presente que el SLO requiere de componentes interrelacionados que deben

funcionar en forma muy sincronizada para permitir la formación de las imágenes. Dentro de estos podemos mencionar los scanners y el sistema de óptica adaptativa como dos de los más complejos.

Después de este entrenamiento comencé a colaborar en las sesiones de medidas en primates y comencé a asistir a ciertas sesiones en las cuales las medidas se realizaban en ratas. Mi colaboración estuvo basada en el manejo del ordenador que controla el sistema de óptica adaptativa. Para cada sesión se requieren al menos tres personas, una dedicada al control del sistema de óptica adaptativa, otra encargada de tomar las imágenes y la tercera que se encarga de coordinar la medida, elegir las zonas de la retina a observar, etc.

Si bien siempre consideramos muy importante mi asistencia a las sesiones de medidas y estas eran prioritarias, el Dr. Williams consideró oportuno que me incorporará a un trabajo que estaba comenzando a ser llevado a cabo en el marco del proyecto de registros en primates. Este trabajo consistía en la medida de la resolución del sistema. Como fuera mencionado por tratarse de un sistema confocal, el SLO tiene la capacidad de generar imágenes 3D de la retina. De esto se desprende que la caracterización de la resolución estará dada tanto por su resolución espacial como por su resolución axial. En principio solo intentamos determinar la resolución lateral del sistema en condiciones reales de medida. La resolución axial fue medida posteriormente por Dan Gray a partir de utilizar las imágenes de axones de células ganglionares.

Para la medida de la resolución lateral se propuso el empleo de esferas fluorescentes las cuales tienen un radio cercano a 1 micrómetro. Estas esferas podrían utilizarse como fuentes puntuales una vez introducidas en la retina. El procedimientos para colocar estas microesferas por medio del uso de una jeringa ha sido descrito por Wen (Wen J, 2005). Este tipo de medidas solo puede ser llevado a cabo en animales de experimentación. El uso de estas microesferas nos permitiría contar con una fuente que puede considerarse puntual y de esta forma medir la PSF (del inglés Point Spread Function) del sistema (ver figura 4). Una vez obtenida la PSF la resolución espacial puede describirse utilizando algún para metro extraído de la misma. El más comúnmente utilizado es el ancho a la mitad del máximo de intensidad (en inglés FWHM).

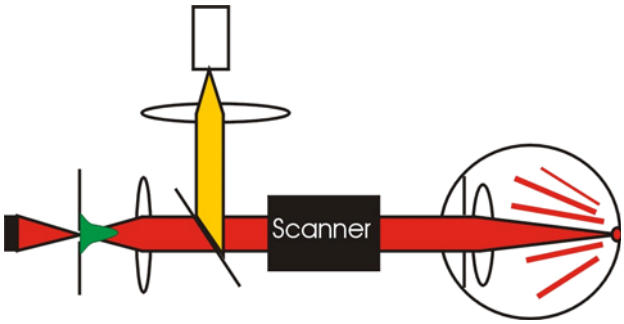

Figura 4. Sistema SLO simplificado. El pequeño circulo e la retina representa una microesfera utilizada para medir la PSF del sistema que se forma sobre la apertura colocada delante del detector (pinhole)

El inconveniente de utilizar las microesferas es que posiblemente el sistema no es lo suficientemente sensible como detectarlas en la retina. Esto debido a que dada la pequeña superficie proyectada de estas microesferas produzcan una irradiancia que posiblemente no sea lo suficientemente elevada como para ser detectada por el fotomultiplicador.

Otra posible medida a realizar consistía en el uso de una CCD. Mediante el uso de un espejo plano se debía el haz y por medio de un objetivo de microscopio se consigue enfocar dicho haz sobre la cámara CCD. A diferencia del caso anterior, la imagen enfocada en la CCD es comúnmente llamada imágenes aérea o imagen de doble paso ya que ha viajado dos veces a través de los medios oculares. Una vez desde la fuente láser hacia la retina y la segunda vez desde la retina hacia la cámara. Si bien esto no expresa la resolución real que puede alcanzar el sistema, esta información permite conocer el valor límite sabiendo que en todo momento el sistema tendrá capacidades resolutivas superiores a las medidas y, generalmente, muy próximas.

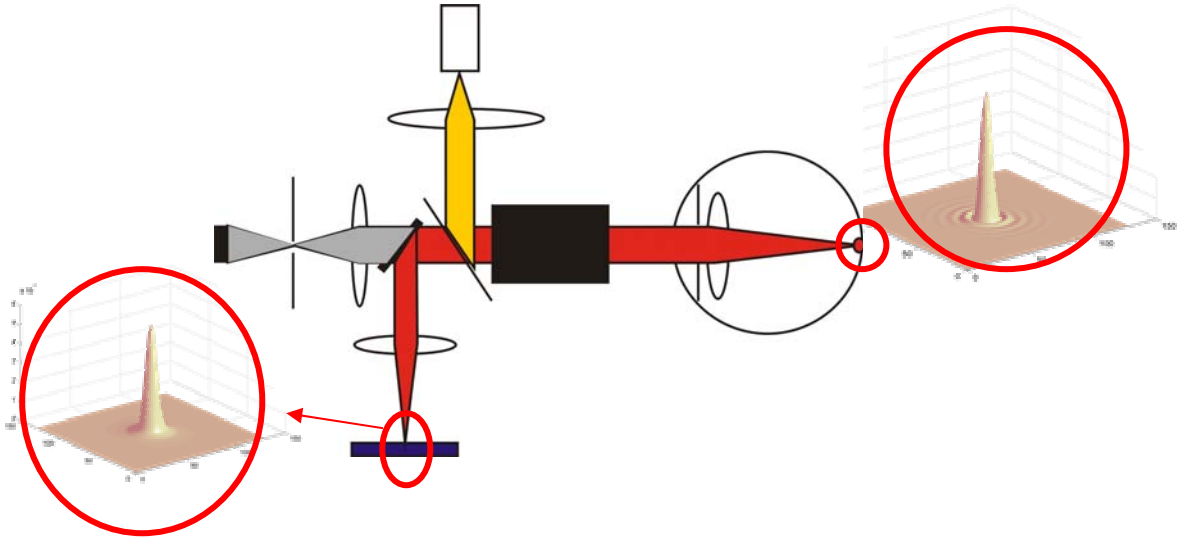

Figura 5. Sistema SLO simplificado. Incorporación de una cámara CCD al sistema para el registro de la PSF

Para esto realizamos una rápida modificación del sistema como se muestra en la figura 5, para que, como fuera explicado, poder registrar sobre una cámara CCD la PSF de doble paso. La resolución lateral está dada por la el tamaño de la PSF en la retina. Dos detalles que se encuentan más cerca que el diámetro de la PSF no podrán ser reconocidos por el sistema y serán observados como uno solo.

4.1.1. Resultados sobre la resolución lateral

El uso de la cámara CCD nos permitió poder generar una imagen de la PSF que se forma sobre la apertura micrométrica (en inglés pinhole). Esta es una herramienta que no se utiliza pero que después de las imágenes registradas consideramos que es de gran importancia para la evaluación del comportamiento del sistema.

En la figura 5.A se puede observar la PSF registrada y las diferentes representaciones en tres dimensiones. Una de las ventajas de registrar la PSF con una cámara CCD radica en la posibilidad de simular el efecto de colocar una apertura sobre el plano donde se forma la imagen de la PSF. El volumen que puede ser cuantificado de las figura 5.B y 5.C representan la intensidad registrada por el fotodetector cuando se utiliza una apertura alineada y una desalineada respectivamente. Este mismo ejemplo podría extrapolarse a otras aperturas de diferente tamaño. Lo que el detector medirá sería el volumen encerrado en casa grafica 3D antes mostrada.

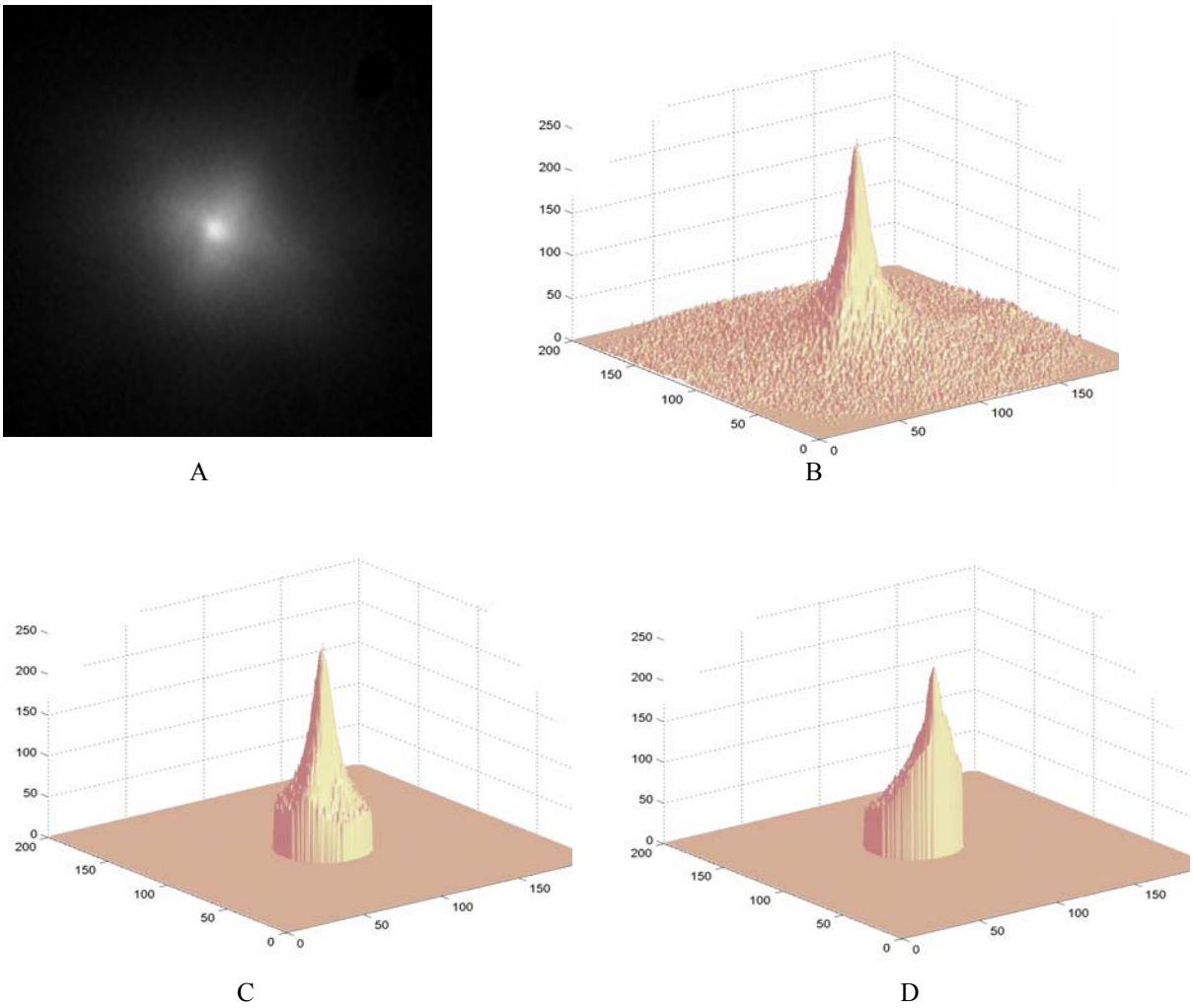

Figura 5. A) Imagen de la PSF registrada con una cámara CCD. B) Representación en tres dimensiones. Simulación del uso de una apertura C) centrada y D) descentrada.

Otra técnica que se ha probado consistió en el uso de franjas ubicadas en el plano de la retina de un ojo artificial. De esta forma lo que se está midiendo es la capacidad que tiene el sistema para describir lo más finamente posible un borde. Como se sabe, el estímulo es un borde y de aplicar la derivada a la imagen registrada se obtiene la LSF (del inglés Line Spread Function, función de transferencia de una línea). Si bien este parámetro no es equivalente a la PSF, en términos prácticos, puede ser considerado un buen estimador de la resolución del instrumento, principalmente si consideramos que el sistema posee resolución simétrica de revolución.

En la figura 6 se muestra la forma de obtener la LSF. El FWHM es esperable que sea muy similar al FWHM obtenido a partir de la PSF por lo que podríamos aproximar la resolución del sistema por este parámetro. Entonces, una vez registrada la imagen de un borde se procesa como fuera mencionado anteriormente (figura 7).

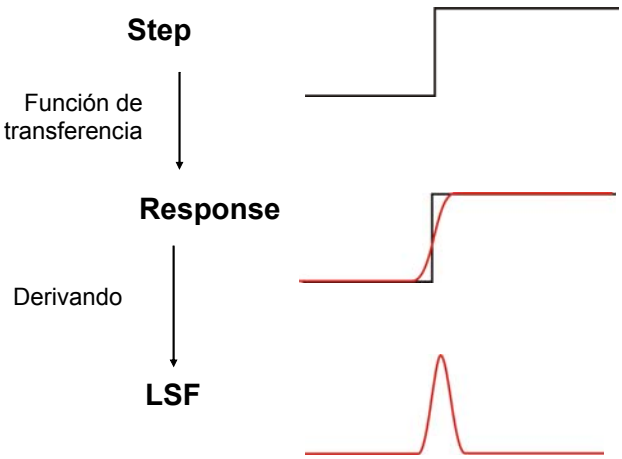

Figura 6. Representación del proceso
para la obtención de la LSF

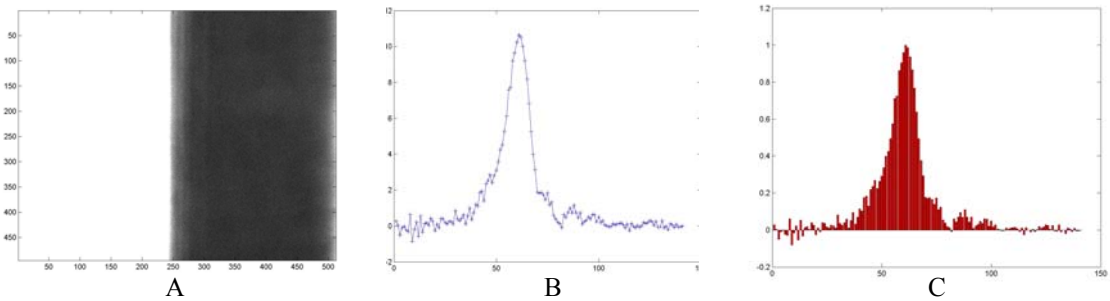

Figura 7. A) Imagen de un borde registrada por el sistema. B) Derivada
de la imagen y C) representación de los píxeles bajo la curva.

Cada píxel registrado por la placa de video corresponde a cada una las barras mostradas en la figura 7.C y, como es de esperar, este es el nivel de resolución más pequeño impuesto por la digitalización de la imagen. De todas formas, la óptica del sistema es en este caso quien limita la calidad de las imágenes ya que como puede observarse, varios píxeles de la imagen caen dentro de la LSF. Como la imagen posee 512 píxeles que corresponden a 0.5 grados o, 174 micrómetros, 12 píxeles, que son lo abarcados por la LSD, ocuparían en la retina un campo de 4.8 micrómetros aproximadamente. Finalmente esta es la mínima distancia a la que pueden estar separados dos detalles de la retina y que podrían ser detectados en las imágenes registradas.

4.2. Mejoras propuestas al sistema utilizado en ratas

Durante la estancia se propuso colaborar en ciertos aspectos técnicos relacionados con el sistema utilizado en la medida de ratas. El instrumento utilizado es el mismo que el empleado en la medida de primates y ha sido diseñado de manera que con la incorporación de un espejo se consigue modificar tanto el camino óptico como la magnificación del sistema. Muchas de las propuestas sugeridas se basaron en observaciones realizadas durante las sesiones en las que he podido participar. Principalmente debido a la poca repetibilidad y eficacia encontradas en las medidas.

Se debe entender primero que la medida en la rata cambia notoriamente debido a la gran diferencia que presentan los ojos de estos animales. Un aspecto importante a tener en cuenta es la potencia óptica del ojo de estos individuos que está alrededor de las 300 dioptrías con una longitud focal de 4,5 mm aproximadamente. Si se lo compara con la potencia del ojo de un ser humano que es de 60 dioptrías y una longitud focal de 22 mm se puede inferir que las correcciones que pueden ser necesarias en uno y otro caso son muy diferentes. Por ejemplo, un desenfoque de unas 10 D en el ojo de una rata sería un valor normal mientras que para un ser humano es un valor alto, aunque no por ello imposible de encontrar. Esto evidencia que los requerimientos para la corrección de aberraciones de bajo orden son muy diferentes.

Por este motivo se propuso el diseño y la implementación de un sistema Badal que permita corregir el desenfoque de las imágenes en la retina y, además, la incorporación de un sistema de cilindros cruzados para la compensación del astigmatismo. La ventaja que este sistema aportaría sobre el instrumento es que añadiría un nuevo plano pupilar conjugado con el plano de la pupila de la rata. Este plano podría ser de utilidad para la colocación de lentes de pruebas adicionales cuyo valor es el indicado por el sensor de frente de onda. Actualmente la corrección se realiza fuera del plano pupilar ya que por motivos de espacio no es posible colocar la lente a menos de 5 cm del ojo del animal. Esto provoca que el valor requerido para la corrección no sea el mismo que el medido por el sensor Hartmann-Shack.

El diseño y la evaluación del sistema se realizaron utilizando el programa de diseño óptico Zemax (de Zemax development corporation). Las ventajas de utilizar este tipo de programas radican en que los sistemas ópticos pueden ser probados bajo diferentes condiciones y evaluar de esta manera que el diseño se ajusta mejor a los requerimientos de cada caso. Esto evita el tener que realizar el montaje de las configuraciones propuestas reduciendo los costos y los tiempos hasta determinar cuales podrían ser los mejores componentes a utilizar.

La construcción de un Badal puede ser llevada a cabo por medio de espejos esféricos, espejos parabólicos o lentes. La ventaja de utilizar espejos es que se evitan reflejos que pueden producirse cuando la luz viaja desde la fuente hasta el ojo del individuo. La desventaja es que siempre se deben utilizar fuera de eje por cuestiones físicas. Desde un punto de vista óptico esto es equivalente a utilizar lentes inclinadas en lugar de colocarlas con su eje óptico paralelo a la dirección del haz. En primer término nuestro trabajo consistió en determinar cual es la calida óptica que puede alcanzarse con los diferentes componentes utilizados.

En la figura 8 se muestra una de las configuraciones propuestas utilizando espejos esféricos. Si bien los espejos parabólicos permiten eliminar el astigmatismo y el coma introducido por los espejos esféricos, tienen el inconveniente de presentar un comportamiento relativamente no lineal cuando se cambia la posición de la fuente. En sistemas estáticos tienen un comportamiento que puede ajustarse mejor a los requerimientos corrigiendo las aberraciones introducidas por los ya mencionados, espejos esféricos.

Como puede observarse la incidencia del haz sobre el espejo se realiza sobre un ángulo relativamente pequeño. De esta forma se consigue reducir notablemente el grado de aberración introducida. Además, el segundo espejo se ha rotado sobre un eje perpendicular al anterior con el fin de compensar el astigmatismo introducido por el primero.

En la gráfica 9 se observa desde otra vista como ahora el haz es desviado por debajo de uno de los espejos planos del Badal. Si bien este haz podría ser reenviado en cualquier dirección por medio del empleo de un espejo plano, este ángulo de inclinación podría tener ciertas ventajas. En varias sesiones se ha observado que la lente de contacto utilizada sobre el ojo de la rata consigue separase de la córnea posiblemente debido a que los radios de curvatura no coinciden. Esto provoca que la medida se vuelva incontrolable debido a la dificultad de medir y corregir el frente de onda producto de las aberraciones presentadas. El colocar la rata en una posición levemente inclinada o, incluso, horizontal dado que el eje óptico posee una pequeña orientación hacia arriba, permitiría corregir el problema del desprendimiento de las lentes de contacto solo por gravedad.

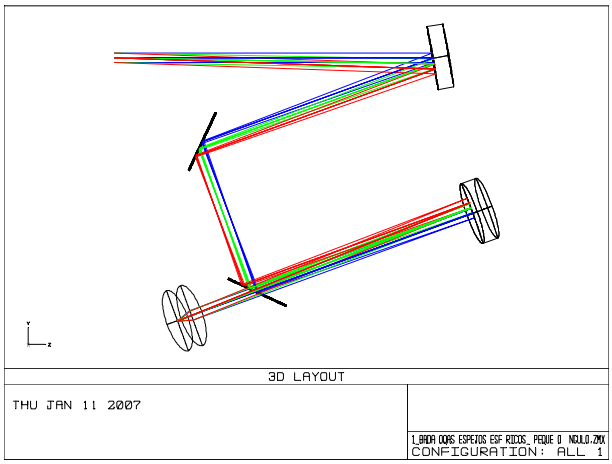

Figura 8. Vista 2D del sistema Badal utilizando espejos esféricos.

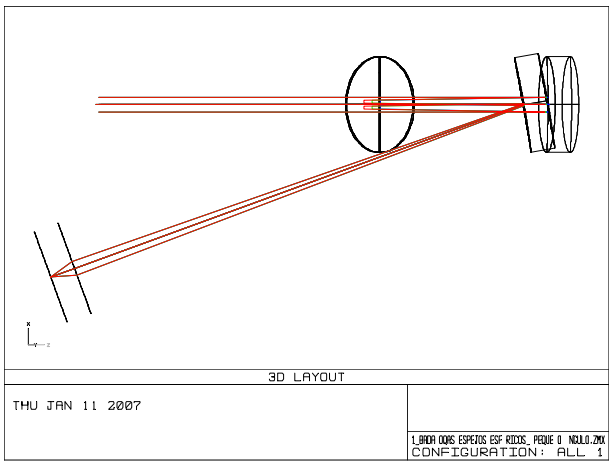

Figura 9. Vista 2D del sistema de la figura 8 pero donde se observa la inclinación producida en el haz de salida.

A partir de la configuración mostrada se realizó el análisis sobre su comportamiento óptico. Como fuera mencionado, con esta incorporación se pretende corregir el desenfoque que puedan presentar los ojos de ratas. Y es esperable que la compensación requiera introducir varias dioptrías por lo que el Badal debe tener un rango de al menos +/- 10 dioptrías. El sistema mostrado solo puede tener una compensación máxima de 8 dioptrías ya que como puede observarse, el espejo plano que se mueve para permitir el cambio en refracción esférica bloquea el haz cuando dicho espejo se acerca demasiado al espejo esférico del sistema (figura 9).

Otra posible configuración hace uso de lentes para compensar la refracción esférica. La ventaja de utilizar lentes radica en que las aberraciones introducidas para llevar adelante la corrección son muy inferiores a las que se producen mediante el uso de espejos esféricos. La desventaja es que se producen reflexiones sobre las diferentes superficies de la lente que pueden alterar la medida realizada con el sensor Hartmann-Shack. En la figura 10 se muestra un gráfico de la configuración final obtenida con Zemax.

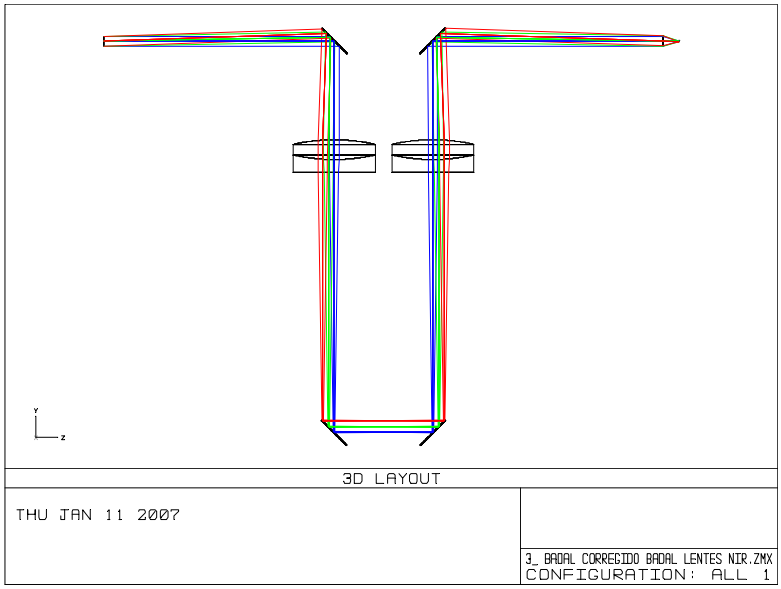

Figura 10. Diagrama del sistema Badal donde se han reemplazado los espejos esféricos por lentes

4.2.1. Resultados de los sistemas propuestos

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos para correcciones de entre +/-8 dioptrías con espejos esféricos y +/-10 dioptrías con lentes. El diagrama de impactos revela que el comportamiento es relativamente bueno en ambos casos ya que, si bien no en todas las correcciones los rayos trazados caen dentro del disco de Airy, la ubicación de los impactos es muy próxima a los mismos. En la evaluación utilizada en el sistema en el cual se emplean lentes se ha considerado además las diferencias obtenidas debido a la aberración cromática. Como es de sabido, en el caso de los espejos esto no es necesario ya que solo se produce reflexión en los mismos mientras que la aberración cromática tiene lugar cuando la luz atraviesa medios refractivos.

El análisis sobre la aberración cromática sobre el sistema con lentes es importante ya que para llevar a cabo registros de imágenes retinianas se emplean diferentes longitudes de onda. Las longitudes de onda más cortas, cercanas a los 580 nm, son utilizadas para el registro de fluorescencia. Principalmente porque los pigmentos que se encuentran en la retina tienen el pico de sensibilidad en estas longitudes de onda. Por otra parte, la luz utilizada para medir el frente de onda es de 904 nm la cual no provoca ningún estímulo visual en la retina y la reflexión obtenida es suficiente para el sensado del frente de onda. Finalmente se utiliza un tercer haz de 680 nm para registrar imágenes de reflectancia. El estímulo producido es relativamente bajo ya que a esta longitud de onda la sensibilidad es muy baja y la reflexión de esta luz sobre los fotorreceptores es alta. A su vez, las diferencias en longitudes de onda entre los haces permite el uso de filtros y así evitar que llegue luz indeseada a los diferentes detectores.

En la figura 12 se muestra los resultados obtenidos para correcciones teóricas entre +10 y -10 dioptrías para el sistema que hace uso de lentes. Se puede observar que los resultados obtenidos están muy próximos a los valores esperados teóricamente. En la tabla 1 se muestran todos valores. Solo para correcciones de +10 dioptrías se observa una separación entre el valor teórico y los valores computados para las tres longitudes de onda. Además, se observa una separación entre las correcciones producidas para cada longitud de onda, acentuándose principalmente para el haz de 500 nm. De todas formas, estas diferencias encontradas son muy bajas comparadas con la potencia del ojo de la rata por lo que pueden ser despreciables.

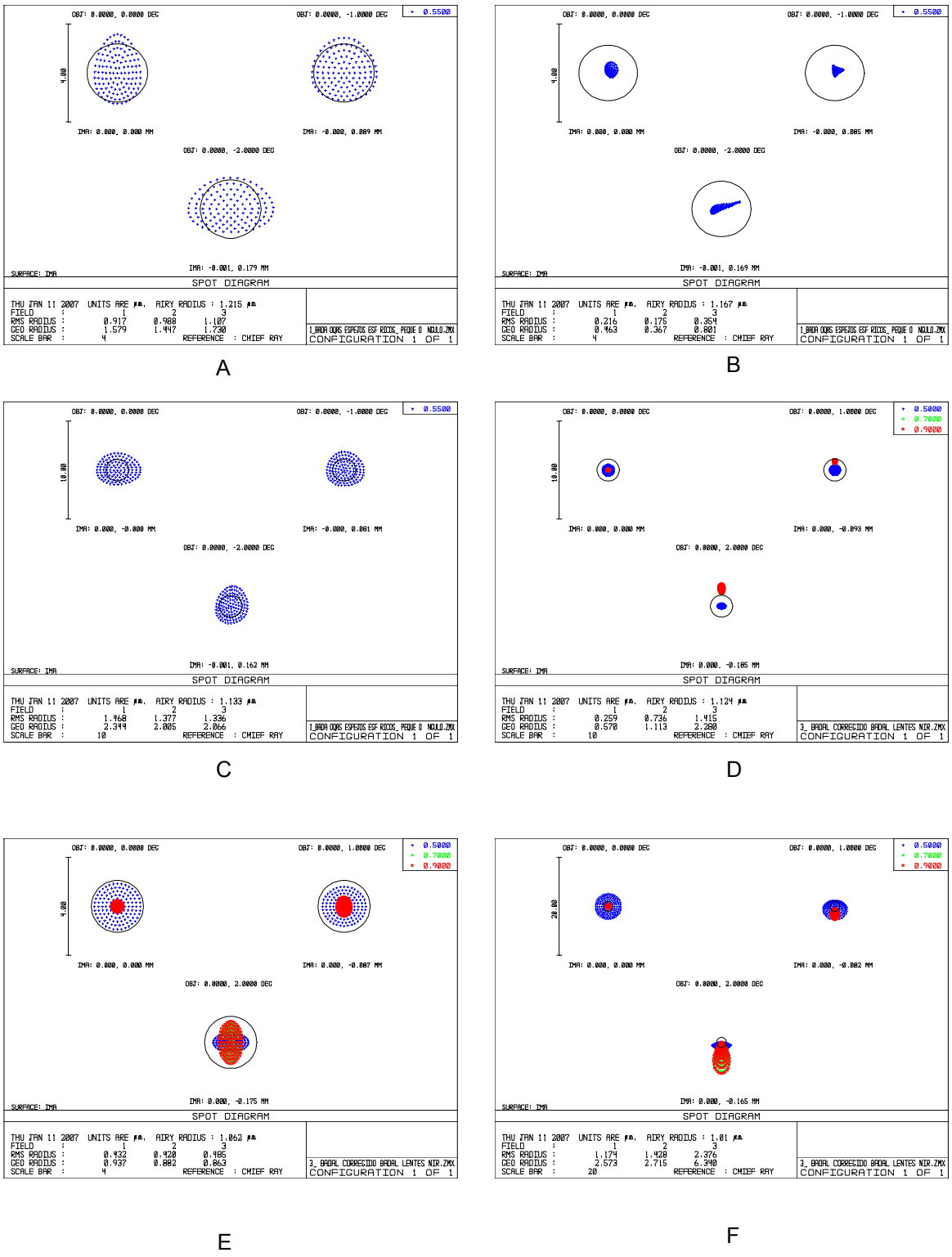

Figura 11. Diagrama de impactos utilizados en la evaluación de los sistemas. Las figuras corresponden a correcciones de (A) -8, (B) 0, y (C) +8 dioptrías con el sistema que utiliza espejos esféricos y (D) -10, (E) 0 y (F) +10 dioptrías el compuesto por lentes.

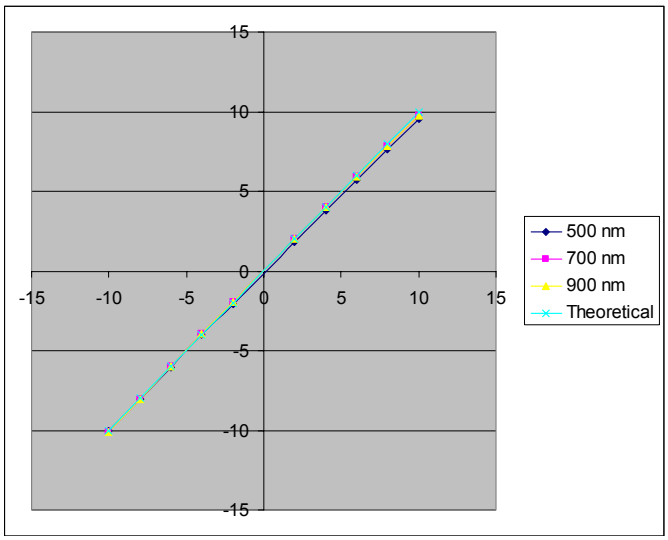

Figura 12. Representación de los valores de refracción esférica introducidos por el Badal para tres longitudes de onda. En la gráfica se observa que la diferencia con el valor teórico esperado es muy pequeña

Teórico	500	700	900
-10	-10.03	-10.13	-10.14
-8	-8.03	-8.06	-8.06
-6	-6.03	-6.01	-6.01
-4	-4.04	-3.96	-3.96
-2	-2.07	-1.96	-1.93
2	1.83	2	2.02
4	3.78	3.98	3.99
6	5.72	5.92	5.95
8	7.65	7.84	7.87
10	9.56	9.76	9.78

Tabla 1. Valores de corrección teóricos y los obtenidos por medio de Zemax para tres longitudes de onda

5. Discusión

Durante el período de la estancia se han podido llevar a cabo diferentes estudios con la finalidad de realizar aportes al instrumento SLO. En las primeras etapas mi principal dedicación estuvo orientada al estudio del sistema y en comprender como funciona el equipo, ya no solo desde un punto de vista teórico, sino intentando identificar la ubicación de las diferentes partes componentes del mismo. Además, como es de imaginar, existe una gran cantidad de controles y parámetros a inicializar cuando el sistema se va a poner en funcionamiento. Todos este ejercicio fue de gran utilidad no solo para entender el funcionamiento real, sino además, poder identificar cuales son las partes del sistema que podrían se mejoradas y así corregir y mejorar el equipo.

El estudio de la resolución nos permitió determinar las diferentes vías por medio de las cuales es posible establecer cual es el mínimo detalle que el sistema es capaz de discriminar. Como ya fuera mencionado, lo que se pretendió fue medir la resolución lateral del sistema, obviando la resolución axial otorgada por el carácter confocal del instrumento. Las medidas obtenidas mostraron estar muy próximas a los valores teóricos impuestos por los límites ópticos.

Finalmente, se estudió cual de los sistemas de corrección de aberraciones de bajo orden era el que mejor se ajustaba a los requerimientos de las medidas. Esto estuvo orientado principalmente en las medidas de rata donde se pueden encontrar desenfoques muy elevados y basados en la dificultad observada a la hora de corregir la refracción del ojo. Para esto se propuso la incorporación de un Badal y del análisis realizado se puede decir que el sistema que presenta mayores ventajas es aquel que hace uso de lentes. Principalmente debido a que la aberración cromática y las reflexiones que se pudieran generar son muy bajas comparadas con las aberraciones que presenta el sistema en el cual se utilizan espejos esféricos. Además, de acuerdo con el análisis realizado en todo el rango de correcciones, se puede observar que la aberración cromática no altera notoriamente los valores de refracción esférica introducidos.

6. Conclusiones

En primer lugar quiero mencionar algunas conclusiones técnicas que surgen como fruto del trabajo realizado. En este punto se puede decir que la medida de la resolución del sistema se ha podido llevar a cabo. Si bien aún no ha sido implementada en un sistema in vivo, el uso de una cámara CCD para el registro de la PSF ha dado las bases de cómo llevar adelante este procedimiento. Además esto brindaría una herramienta de control para determinar durante las medidas el límite resolutivo que se podrá alcanzar.

Además, el uso de un programa informático de diseño óptico nos ha permitido evaluar diferentes configuraciones de un Badal. De los resultados obtenidos consideramos que el sistema formado por lentes es el que mejor se adapta a los requerimientos de corrección. De todas formas, la posibilidad de encontrar reflejos que afecten la medida del frente de onda provocaría que este sistema deba reemplazarse por el que hace uso de espejos esféricos, aún cuando el rango de corrección que se puede alcanzar no es el deseado.

Finalmente deseo expresar mi conclusión acerca de esta estancia ya no desde la perspectiva científica sino desde un punto de vista formativo. Durante estos cuatro meses he podido participar en seminarios, congresos, realizar practicas de laboratorio; en resumen ha sido muy enriquecedor para mi formación como futuro doctor. Además, esta bolsa de viaje me ha permitido trabajar en el laboratorio de uno de los investigadores más reconocidos en el ámbito de la óptica fisiológica y estar presente en uno de los logros más importante recientemente alcanzados por su grupo. Por este motivo valoro de forma muy positiva esta estancia en la Universidad de Rochester deseando que se continúe con esta inversión realizada por el Gobierno de Catalunya para que, futuros estudiantes de doctorado, tengan la posibilidad de

vivir esta experiencia que, en mi opinión, es una de las importantes dentro de la formación como doctor.

7. Agradecimientos

A mi director de tesis, profesor Jaume Pujol, por apoyar rotundamente mi estancia en la Univesidad de Rochester.

Al profesor David Williams por todo el apoyo mostrado y su aceptación inmediata a mi asistencia al laboratorio y a todo el grupo de investigación del Center for Visual Science por todo el soporte recibido constantemente.

A la AGAUR por la bolsa de viaje concedida y por la perfección con la que se ha cumplido todo lo acordado lo cual pone de manifiesto la responsabilidad, el esfuerzo y el tiempo dedicados al servicio de los estudiantes de doctorado.

8. Referencias

Hofer H, et al. Improvement in retinal image quality with dynamic correction of the eye's aberrations. Optics Express, 2001. 8(11): p. 631-643.

Hofer H, et al., Dynamics of the eye's wave aberration. Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision, 2001. 18(3): p. 497-506.

Liang J, Williams D, Miller D. High resolution imaging of the living human retina with adaptive optics. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1997. 38(4): p. 55-55.

Liang J, Williams D, Miller D. Supernormal vision and high-resolution retinal imaging through adaptive optics. Journal of the Optical Society of America A, 1997. 14(11): p. 2882-2892.

Liang J, Williams D. Aberrations and retinal image quality of the normal human eye. Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision, 1997. 14(11): p. 2873-2883.

Liang J, Williams D, Miller D. High resolution imaging of the libing human retina with adaptive optics. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1997. 38(4):p. 55-55

Liang J, Williams D, Miller D. Supernormal vision and high. Resolution retinal imaging through adaptive optics. Journal of the optical Society of America A, 1997. 14(11):p. 2882-2892.

Manivannan A, Sharp P F, Philips R P,, Forrester J V. Digital imaging using a scanning laser ophthalmoscope. Physiol. Meas, 1993. 14: p. 43–56

Plesch A, Klingbeil U, Bille J. Digital laser scanning fundus camera Appl. Opt, 1987. 26: p. 1480–6

Roorda A, F.R.-B., Donnelly III, Queener H, Hebert T, Campbell M, Adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy. Optics Express, 2002. 10(9): p. 405-412.

Webb R, Hughes G and Delori F. Confocal scanning laser ophthalmoscope Appl. Opt, 1987. 26: p. 1492–9

Wen j, McKenna K, Brron B, Langston H, Kapp J. Use of superparamgnetic microbeads in tracking subretinal injections. Molecular Bision, 2005. 11: p. 256-62.

Williams D, Liang J. Adaptive optics for high resolution retinal imaging.Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1996. 37(3):p.1055-1055.

Williams D, Liang L, Miller D, Roorda A. Wavefront Sensing and Compensation for the Human Eye in Adaptive Optics Engineering Handbook, R.K. Tyson, Editor. 1999, Marcel Dekker: New York. p. 287-310.

Yoon G, et al. Dynamic correction of the eye's aberration with the Rochester 2nd generation adaptive optics system. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2001. 42(4): p. S99-S99.

Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

L'AGAUR inclourà a RECERCAT la memòria justificativa en versió digital. Per aquest motiu, us demanem el vostre consentiment per introduir a RECERCAT el contingut científic de la vostra justificació de recerca. Si esteu d'acord amb aquesta proposta, cal que llegiu la **llicència Creative Commons** i ens envieu el document que us adjuntem imprès, omplert i signat a:

Programa de documentació científica
Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca
Via Laietana, 28 2na planta
08003 Barcelona

RECERCAT

La persona sotasignant, , en qualitat de beneficiària de l'ajut de l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), amb núm d'expedient, manifesta el seu consentiment exprés per tal que la justificació presentada en el marc de l'esmentat ajut sigui introduïda al dipòsit digital RECERCAT del Consorci de Biblioteques Universitàries de Catalunya, d'acord amb els termes especificats a la llicència Creative Commons de Reconeixement-No-Comercial-SenseObra Derivada.

Aquesta llicència estableix que es permet copiar, distribuir i comunicar públicament l'obra sempre que se'n citi l'autor original i la institució que l'empara i no se'n faci cap ús amb finalitats comercials ni obra derivada. Per obra derivada s'entén aquell document que ha estat editat, traduït, combinat amb materials de tercers, canviat de format, o modificat de qualsevol altra forma.

☒ Sí, estic d'acord amb el text anterior.
☐ No, no estic d'acord.

Barcelona, 17 de julio de 2007

Signatura
DNI

Aquelles persones o institucions que ho requereixin, amb una adequada argumentació, podran sol·licitar, si escau, un retràs màxim de dos anys per introduir la memòria justificativa a Recercat.

Generalitat de Catalunya
Departament d'Educació
i Universitats