

Métodos polarimétricos para la mejora de imágenes en aplicaciones biológicas

Polarimetric methods for the image enhancement in biological applications

Albert Van Eeckhout^{1,2,S*}

1. ALBA Synchrotron Light Source, Carrer de la Llum 2-26, 08290 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain
2. Grup d'Òptica, Departament de Física, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain

(*) E-mail: aveeckhout@cells.es

S: miembro de SEDOPTICA / SEDOPTICA member

Received: 22/07/2024

Accepted: 27/09/2024

DOI: 10.7149/OPA.57.3.51181

RESUMEN:

Este artículo resume el trabajo de investigación llevado a cabo por el autor en el Grupo de Óptica de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) para la realización de la Tesis Doctoral "Polarimetric methods for the image enhancement in biological applications" dirigida por el Dr. Àngel Lizana Tutusaus y el Cat. Juan Campos Coloma. En ella se estudia, por primera vez, la implementación experimental de una serie de métodos polarimétricos para mejorar el análisis y la visualización de tejidos biológicos, tejidos animales y vegetales. Se ha investigado la relación entre los dos principales grupos de técnicas polarimétricas, las Puertas de Polarización (del inglés Polarization Gating) y las técnicas basadas en la medida de la matriz de Mueller, y se ha propuesto un nuevo método para obtener Puertas de Polarización en base a medidas de una única matriz de Mueller. Debido a que, hasta el momento, el análisis de la despolarización de la luz en estudios biomédicos se restringe al uso de observables globales, se analiza el interés de utilizar en dicho contexto los Índices de Pureza Polarimétrica, que son un grupo de observables que describen con más detalle las propiedades de despolarización de la muestra. Estos se aplican a la inspección de tejidos de origen animal, permitiendo mejorar la visualización de tejidos, revelando ciertas estructuras ocultas en canales de despolarización estándar, y también mejorando la eficiencia al clasificar diferentes tipos de tejido. También se estudia el uso de la polarimetría en tejidos de origen vegetal, ámbito en el que las técnicas basadas en la matriz de Mueller son escasamente utilizadas. Por ello, los estudios con muestras de origen vegetal se centran en el potencial de la polarimetría de Mueller, obteniendo como resultado información complementaria, o incluso superior en ciertos casos, a otras técnicas ópticas no polarimétricas.

Palabras clave: Polarimetría, Tejidos biológicos, Despolarización, Biomedicina, Técnicas de Imagen, Matriz de Mueller, Clasificación de tejidos, Plantas

ABSTRACT:

This paper summarizes the research work undertaken by the author at the Optics Group of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) for the completion of the Doctoral Thesis "Polarimetric methods for image enhancement in biological applications" supervised by Dr. Àngel Lizana Tutusaus and Prof. Juan Campos Coloma. It is studied, for the first time, the experimental implementation of a series of polarimetric methods to improve the analysis and visualization of biological tissues, both animal and plant tissues. The Thesis analyses the relationship between the two main groups of polarimetric techniques, Polarization Gating and Mueller matrix-based techniques, and a new method to obtain Polarization Gates based on measurements from a single Mueller matrix is proposed. Since the analysis of light depolarization in biomedical studies is restricted to the use of global observables, we studied the interest of applying to the study of biological tissues the Indices of Polarimetric Purity,

a group of specialized observables that describe the depolarization properties of samples in more detail. These are applied in the inspection of animal tissues, improving tissue visualization, revealing certain structures hidden in standard depolarization channels, and also enhancing efficiency in classifying different types of tissue. The Thesis also studies the use of polarimetry in plant tissues, an area where Mueller matrix-based techniques are scarcely used. For this reason, our studies with plant samples focus on the potential of Mueller polarimetry, resulting in complementary, or even yielding to superior information, to other non-polarimetric optical techniques.

Key words: Polarimetry, Biological tissues, Depolarization, Biomedicine, Imaging Techniques, Mueller Matrix, Tissue classification, Plants

REFERENCES AND LINKS / REFERENCIAS Y ENLACES

- [1] A. R. Kherlopian, T. Song, Q. Duan, M. A. Neimark, M. J. Po, J. K. Gohagan, A. F. Laine, "A review of imaging techniques for systems biology," *BMC Syst. Biol.* (2008).
- [2] R. Carriles, D. N. Schafer, K. E. Sheetz, J. J. Field, R. Cisek, V. Barzda, A. W. Sylvester, J. A. Squier, "Invited Review Article: Imaging techniques for harmonic and multiphoton absorption fluorescence microscopy," *Rev. Sci. Instrum.* (2009).
- [3] S. Jacquemoud, S. Ustin, *Leaf Optical Properties* (Cambridge University Press, 2019).
- [4] V. V. Tuchin, *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis: Third Edition*. SPIE Press, Bellingham (2015).
- [5] V. V. Tuchin, L. V. Wang, D. A. Zimnyakov, *Optical Polarization in Biomedical Applications*. Springer, Berlin (2006).
- [6] L. Rey-Barroso, F. J. Burgos-Fernández, X. Delpueyo, M. Ares, S. Royo, J. Malvehy, S. Puig, M. Vilaseca, "Visible and extended near-infrared multispectral imaging for skin cancer diagnosis," *Sensors* (2018).
- [7] L. van Manen, J. Dijkstra, C. Boccara, E. Benoit, A. L. Vahrmeijer, M. J. Gora, J. S. D. Mieog, "The clinical usefulness of optical coherence tomography during cancer interventions," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* (2018).
- [8] O. Maiques, M. Georgouli, V. Sanz-Moreno, "Recent advances in tissue imaging for cancer research," *F1000Research* (2019).
- [9] V. Singh, N. Sharma, S. Singh, "A review of imaging techniques for plant disease detection," *Artif. Intell. Agric.* (2020).
- [10] C. Farber, M. Mahnke, L. Sanchez, and D. Kurouski, "Advanced spectroscopic techniques for plant disease diagnostics. A review," *TrAC - Trends Anal. Chem.* (2019).
- [11] E. Vilaprinyo, T. Puig, M. Rue, "Contribution of early detection and adjuvant treatments to breast cancer mortality reduction in Catalonia, Spain," *PLoS One* (2012).
- [12] R. C. N. van den Bergh, S. Loeb, M. J. Roobol, "Impact of Early Diagnosis of Prostate Cancer on Survival Outcomes," *Eur. Urol. Focus* (2015).
- [13] S. Savary, A. Ficke, J. N. Aubertot, C. Hollier, "Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security," *Food Secur.* (2012).
- [14] C. J. R. Sheppard, "Microscopy: Phase Contrast Microscopy," in *Encyclopedia of Modern Optics*, Five-Volume Set (2004).
- [15] A. Peinado, A. Lizana, J. Campos, "Design of polarimeters based on liquid crystals and biaxial crystals for polarization metrology," *Opt. Pura y Apl.* (2016).
- [16] M. Shinki, M. T. Ivanov, J. S. Post, S. Vagle, J. T. Cullen, D. K. Hore, "Autocalibrating Stokes polarimeter for materials characterization," *Appl. Opt.* (2012).
- [17] P. Li, D. Lv, H. He, H. Ma, "Separating azimuthal orientation dependence in polarization measurements of anisotropic media," *Opt. Express* (2018).
- [18] N. Uribe-Patarroyo, A. Alvarez-Herrero, R. L. Heredero, J. C. Del Toro Iniesta, A. C. López Jiménez, V. Domingo, J. L. Gasent, L. Jochum, V. Martínez Pillet, "IMaX: A polarimeter based on liquid crystal variable retarders for an aerospace mission," in *Physica Status Solidi (C) Current Topics in Solid State Physics* (2008).
- [19] J. Hough, "Polarimetry: A powerful diagnostic tool in astronomy," *Astron. Geophys.* (2006).
- [20] J. S. Tyo, D. L. Goldstein, D. B. Chenault, J. A. Shaw, "Review of passive imaging polarimetry for remote sensing applications," *Appl. Opt.* (2006).
- [21] A. S. Alenin, L. Morrison, C. Curiel, J. S. Tyo, "Hyperspectral measurement of the scattering of polarized light by skin," in *Polarization Science and Remote Sensing V* (2011).
- [22] F. Vasefi, N. MacKinnon, R. B. Saager, A. J. Durkin, R. Chave, E. H. Lindsley, D. L. Farkas, "Polarization-sensitive hyperspectral imaging in vivo: A multimode dermoscope for skin analysis," *Sci. Rep.* (2014).



- [23] E. Gnanatheepam, U. Kanniyappan, K. Dornadula, A. Prakasarao, G. Singaravelu, "Polarization gating technique extracts depth resolved fluorescence redox ratio in oral cancer diagnostics," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* (2020).
- [24] A. N. Yaroslavsky, X. Feng, A. Muzikansky, M. R. Hamblin, "Fluorescence Polarization of Methylene Blue as a Quantitative Marker of Breast Cancer at the Cellular Level," *Sci. Rep.* (2019).
- [25] T. Yasui, Y. Tohno, T. Araki, "Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry," *J. Biomed. Opt.* (2004).
- [26] B. Yang, P. Y. Lee, Y. Hua, B. Brazile, S. Waxman, F. Ji, Z. Zhu, I. A. Sigal, "Instant polarized light microscopy for imaging collagen microarchitecture and dynamics," *J. Biophotonics* (2020).
- [27] J. Chue-Sang, Y. Bai, S. Stoff, M. Gonzalez, J. Gomes, A. Gandjbakhche, V. V. Chernomordik, J. C. Ramella-Roman, "Use of Mueller matrix polarimetry and optical coherence tomography in the characterization of cervical collagen anisotropy," in *Diagnosis and Treatment of Diseases in the Breast and Reproductive System* (2017).
- [28] J. Qi, D. S. Elson, "Mueller polarimetric imaging for surgical and diagnostic applications: a review," *J. Biophotonics* (2017).
- [29] V. M. Turzhitsky, A. J. Gomes, Y. L. Kim, Y. Liu, A. Kromine, J. D. Rogers, M. Jameel, H. K. Roy, V. Backman, "Measuring mucosal blood supply in vivo with a polarization-gating probe," *Appl. Opt.* (2008).
- [30] M. P. Siegel, Y. L. Kim, H. K. Roy, R. K. Wali, V. Backman, "Assessment of blood supply in superficial tissue by polarization-gated elastic light-scattering spectroscopy," *Appl. Opt.* (2006).
- [31] A. Pierangelo, A. Nazac, A. Benali, P. Validire, H. Cohen, T. Novikova, B. H. Ibrahim, S. Manhas, C. Fallet, M.-R. Antonelli, A.-D. Martino, "Polarimetric imaging of uterine cervix: a case study," *Opt. Express* (2013).
- [32] E. Du, H. He, N. Zeng, M. Sun, Y. Guo, J. Wu, S. Liu, H. Ma, "Mueller matrix polarimetry for differentiating characteristic features of cancerous tissues," *J. Biomed. Opt.* (2014).
- [33] P. Schucht, H. R. Lee, H. M. Mezouar, E. Hower, A. Raabe, M. Murek, I. Zubak, J. Goldberg, E. Kövari, A. Pierangelo, T. Novikova, "Visualization of White Matter Fiber Tracts of Brain Tissue Sections with Wide-Field Imaging Mueller Polarimetry," *IEEE Trans. Med. Imaging* (2020).
- [34] M. Kupinski, M. Boffety, F. Goudail, R. Ossikovski, A. Pierangelo, J. Rehbinder, J. Vizet, T. Novikova, "Polarimetric measurement utility for pre-cancer detection from uterine cervix specimens," *Biomed. Opt. Express* (2018).
- [35] B. Kunnen, C. Macdonald, A. Doronin, S. Jacques, M. Eccles, I. Meglinski, "Application of circularly polarized light for non-invasive diagnosis of cancerous tissues and turbid tissue-like scattering media," *J. Biophotonics* (2015).
- [36] L. Graham, Y. Yitzhaky, and I. Abdulhalim, "Classification of skin moles from optical spectropolarimetric images: a pilot study," *J. Biomed. Opt.* (2013).
- [37] S. P. Morgan, I. M. Stockford, "Surface-reflection elimination in polarization imaging of superficial tissue," *Opt. Lett.* (2003).
- [38] J. M. Bueno, "Measurement of parameters of polarization in the living human eye using imaging polarimetry," *Vision Res.* (2000).
- [39] K. M. Twietmeyer, R. A. Chipman, A. E. Elsner, Y. Zhao, D. VanNasdale, "Mueller matrix retinal imager with optimized polarization conditions," *Opt. Express* (2008).
- [40] V. N. Du Le, I. Saytashev, S. Saha, P. F. Lopez, M. Laughrey, J. C. Ramella-Roman, "Depth-resolved Mueller matrix polarimetry microscopy of the rat cornea," *Biomed. Opt. Express* (2020).
- [41] P. G. Ellingsen, M. B. Lilledahl, L. M. S. Aas, C. de L. Davies, M. Kildemo, "Quantitative characterization of articular cartilage using Mueller matrix imaging and multiphoton microscopy," *J. Biomed. Opt.* (2011).
- [42] M. K. Swami, S. Manhas, P. Buddhivant, N. Ghosh, A. Uppal, P. K. Gupta, "Polar decomposition of 3 x 3 Mueller matrix: a tool for quantitative tissue polarimetry," *Opt. Express* (2006).
- [43] S. Sridhar and A. Da Silva, "Enhanced contrast and depth resolution in polarization imaging using elliptically polarized light," *J. Biomed. Opt.* (2016).
- [44] J. J. Gil Pérez, R. Ossikovski, *Polarized Light and the Mueller Matrix Approach*, CRC Press, Boca Raton (2016).
- [45] D. H. Goldstein, *Polarized Light: Third Edition*. CRC Press, Boca Raton (2017).
- [46] S.-Y. Lu, R. A. Chipman, "Interpretation of Mueller matrices based on polar decomposition," *J. Opt. Soc. Am. A* 13(5), 1106–1113 (1996).
- [47] E. Zeiger, P. K. Hepler, "Production of Guard Cell Protoplasts from Onion and Tobacco," *Plant Physiol.* (1976).
- [48] I. Shtein, Y. Shelef, Z. Marom, E. Zelinger, A. Schwartz, Z. A. Popper, B. Bar-On, S. Harpaz-Saad, "Stomatal cell wall composition: Distinctive structural patterns associated with different phylogenetic groups," *Ann. Bot.* (2017).



- [49] V. Bischoff, S. Nita, L. Neumetzler, D. Schindelasch, A. Urbain, R. Eshed, S. Persson, D. Delmer, W. R. Scheible, "TRICHOME BIREFRINGENCE and its homolog AT5G01360 encode plant-specific DUF231 proteins required for cellulose biosynthesis in arabidopsis," *Plant Physiol.* (2010).
- [50] R. L. Long, M. P. Bange, S. G. Gordon, G. A. Constable, "Measuring the Maturity of Developing Cotton Fibers using an Automated Polarized Light Microscopy Technique," *Text. Res. J.* (2010).
- [51] S. V. Berdyugina, J. R. Kuhn, D. M. Harrington, T. Šantl-Temkiv, E. J. Messersmith, "Remote sensing of life: Polarimetric signatures of photosynthetic pigments as sensitive biomarkers," in *International Journal of Astrobiology* (2016).
- [52] V. C. Vanderbilt, L. Grant, C. S. T. Daughtry, "Polarization of Light Scattered by Vegetation," *Proc. IEEE* (1985).
- [53] V. I. Kharuk, V. V. Yegorov, "Polarimetric indication of plant stress," *Remote Sens. Environ.* (1990).
- [54] F. Stabo-Eeg, D. Letalick, O. Steinvall, M. Lindgren, "Discriminating land mines from natural backgrounds by depolarization," in *Electro-Optical Remote Sensing, Photonic Technologies, and Applications II* (2008).
- [55] P. J. Curran, "Polarized visible light as an aid to vegetation classification," *Remote Sens. Environ.* (1982).
- [56] I. San José, J. J. Gil, "Invariant indices of polarimetric purity: Generalized indices of purity for $n \times n$ covariance matrices," *Opt. Commun.* (2011).
- [57] A. Van Eeckhout, "Polarimetric methods for the image enhancement in biological applications," *Tesis de doctorado, Universitat Autònoma de Barcelona* (2021).
- [58] G. G. Stokes, "On the composition and resolution of streams of polarised light from different sources," *Trans. Cambridge Philos. Soc.* (1852).
- [59] H. Mueller, "The foundation of optics," *J. Opt. Soc. Am.* (1948).
- [60] A. Lizana, A. Van Eeckhout, K. Adamczyk, C. Rodríguez, J. C. Escalera, E. Garcia-Caurel, I. Moreno, J. Campos, "Polarization gating based on Mueller matrices," *J. Biomed. Opt.* (2017).
- [61] A. Van Eeckhout, A. Lizana, E. Garcia-Caurel, J. J. Gil, R. Ossikovski, J. Campos, "Synthesis and characterization of depolarizing samples based on the indices of polarimetric purity," *Opt. Lett.* (2017).
- [62] A. Van Eeckhout, J. J. Gil, E. Garcia-Caurel, J. García Romero, R. Ossikovski, I. Moreno, J. Campos, A. Lizana, "Unravelling physical information of depolarizers," *Opt. Express* (2021).
- [63] A. Van Eeckhout, A. Lizana, E. Garcia-Caurel, J. J. Gil, A. Sansa, C. Rodríguez, I. Estévez, E. González, J. C. Escalera, I. Moreno, J. Campos, "Polarimetric imaging of biological tissues based on the indices of polarimetric purity," *J. Biophotonics* (2017).
- [64] A. Van Eeckhout, E. Garcia-Caurel, R. Ossikovski, A. Lizana, C. Rodríguez, E. González-Arnay, J. Campos, "Depolarization metric spaces for biological tissues classification," *J. Biophotonics* (2020).
- [65] A. Van Eeckhout, E. Garcia-Caurel, T. Garnatje, M. Durfort, J. C. Escalera, J. Vidal, J. J. Gil, J. Campos, A. Lizana, "Depolarizing metrics for plant samples imaging," *PloS one* (2019).
- [66] A. Van Eeckhout, E. Garcia-Caurel, T. Garnatje, J. C. Escalera, M. Durfort, J. Vidal, J. J. Gil, J. Campos, A. Lizana, "Polarimetric imaging microscopy for advanced inspection of vegetal tissues," *Sci. Rep* (2021).

1. Introducción

Las técnicas de imagen juegan un papel fundamental en el campo de la biomedicina y la botánica, ya que se pueden utilizar para visualizar las diferentes estructuras de los tejidos biológicos [1,2] y medir algunas de sus propiedades físicas [3-5]. Esta información puede usarse para identificar grados de desorden en las estructuras que componen los tejidos, demostrando ser útil en aplicaciones de diagnóstico, como el reconocimiento temprano de tejidos cancerosos [6-8] o la detección de enfermedades en plantas [9,10], entre otros. La detección temprana de enfermedades es de gran interés para la sociedad, pudiéndose citar a modo de ejemplo, el aumento significativo de la supervivencia a largo plazo [11,12], o su potencial para reducir las pérdidas en campos de cultivo debido a la incidencia de plagas [13].

En este contexto, las técnicas ópticas, como la imagen multispectral o hiperespectral [6], la tomografía de coherencia óptica [7], la microscopía de contraste de fase [14], la microscopía de fluorescencia [2], y la imagen polarimétrica [4,5], son herramientas de imagen interesantes porque son técnicas no invasivas y sin contacto. Además, estas técnicas suelen ser complementarias porque su principio de operación consiste en explotar diferentes propiedades fundamentales de la luz (i.e. intensidad, frecuencia, coherencia y polarización).



Los sistemas de imagen polarimétrica (conocidos como polarímetros de imagen [15]) funcionan de manera similar a los sistemas de imagen estándar, pero midiendo las propiedades de polarización de la luz. Estas propiedades aportan información relevante para una amplia variedad de campos, como la caracterización de materiales [16,17], la astronomía [18,19], la teledetección [20], o la biomedicina [4,21-43], entre otras. Además, las técnicas polarimétricas han demostrado ser compatibles con otras técnicas ópticas, como la imagen multiespectral o hiperespectral [21,22], la imagen de fluorescencia [23,24], o la imagen de generación de segundo armónico [25], mejorando los resultados finales.

En el campo de la biomedicina, la polarimetría se ha utilizado para determinar la orientación y densidad de las fibras en los tejidos [25-28], determinar la concentración de hemoglobina y oxígeno en la sangre [29,30], discriminar entre tejidos sanos y malignos en el reconocimiento temprano de cáncer [31-35], evaluar enfermedades dermatológicas [21,22,36,37], caracterizar fibras de colágeno [25-27], detectar trastornos oculares [38-40], y caracterizar cartílagos articulares [41], entre otros. Los métodos polarimétricos comúnmente utilizados en estas aplicaciones se suelen dividir en dos grupos: Puertas de Polarización [4,21-26,29,30,35-37,43] y técnicas basadas en la matriz de Mueller [27,28,31-34,38-42].

Las Puertas de Polarización se basan en iluminar la muestra con un cierto estado de polarización incidente y analizar la respuesta polarimétrica de la muestra utilizando, por lo general, un estado de polarización (analizador) con la misma polarización, o con la ortogonal, a aquella utilizada en la incidencia. Con estas técnicas se suelen eliminar los fotones provenientes de reflexiones directas en la muestra, visualizando así las capas más profundas del tejido [23,35-37,43]. Las Puertas de Polarización presentan la ventaja de ser fácilmente implementables en microscopios estándar mediante la inclusión de únicamente dos polarizadores lineales.

Por otro lado, los métodos basados en la matriz de Mueller permiten el análisis de un conjunto de propiedades polarimétricas (dicroísmo, birrefringencia y despolarización), siendo más adecuadas para aplicaciones biomédicas de caracterización y diagnóstico [27,28,31-34,38-42]. La matriz de Mueller es una matriz real de 4x4 elementos que describe como la luz polarizada incidente, con una cierta longitud de onda y dirección de propagación, se modifica debido a su interacción con la muestra medida [44,45]. Los 16 elementos reales que componen esta matriz codifican de forma compleja la información correspondiente a las características polarimétricas de la muestra, por lo que se necesita el uso de descomposiciones matriciales para su correcta interpretación física [44,45].

En la mayoría de estudios biomédicos basados en la matriz de Mueller, ésta es interpretada en base a la descomposición de Lu-Chipman [46] y el cálculo de una serie de observables (métricas) para la caracterización de la birrefringencia y la despolarización de las muestras [4,27,28,31-34,38-42]. En estos estudios, la birrefringencia es ampliamente analizada en base a multitud de observables como el retardo total R [31,33,34,40], el retardo lineal δ [32,41,42], el ángulo de orientación del eje rápido, θ [31,33,41,42], y la rotación óptica del retardo circular, ϕ [41,42]. Por el contrario, el análisis de la despolarización suele restringirse al cálculo del índice de despolarización, P_d [34,41], o al poder de despolarización, Δ [31-33,40,42], ambos observables globales que cuantifican la despolarización general pero que no tienen en cuenta ninguna dependencia de la despolarización con el estado de polarización de la luz incidente (es decir, no miden la anisotropía de despolarización).

En contraposición al ámbito biomédico, el número de estudios que utilizan la polarimetría para mejorar la imagen de muestras de tejidos vegetales es sorprendentemente limitado. De todos modos, los estudios existentes demuestran la utilidad de las técnicas polarimétricas en la caracterización de estomas [47,48] y tricomas [49], en determinar la madurez de las células vegetales [50], en el estudio del proceso de fotosíntesis [51], el estudio del estrés hídrico producido en las plantas [52,53], en la teledetección de áreas de vegetación [54] y en la clasificación de la vegetación [55], entre otras. Cabe destacar que el uso de técnicas de polarimetría de Mueller en aplicaciones con plantas es ínfimo, siendo las Puertas de Polarización [47-50] y la medición del grado de polarización [51-55] las técnicas con más presencia en estas aplicaciones.

En éste artículo se resume la tesis que lleva por título “Polarimetric methods for the image enhancement in biological applications” [57]. La tesis se compone de una serie de estudios que tratan de satisfacer los siguientes objetivos: (i) Entender qué relación hay entre las técnicas de Puertas de Polarización y la matriz de Mueller; (ii) Explorar el uso de observables que den una información más detallada de la despolarización producida por una muestra que la de los observables globales de despolarización P_d y Δ . En particular, se estudia la información que proporcionan los Índices de Pureza Polarimétricos (IPP) [56]; (iii) El uso experimental de los IPP para mejorar la visualización de tejidos biológicos de origen animal; (iv) Incorporar

la información de despolarización de los IPP en sistemas de clasificación de tejidos de origen animal para la mejora de resultado; y (v) Analizar el potencial del uso de la polarimetría de Mueller para la inspección de tejidos vegetales.

2. Formalismo Matemático

2.a. Formalismo de Stokes y Mueller

Los estudios polarimétricos de tejidos biológicos presentados en la tesis [57] están fundamentados en el formalismo de Mueller-Stokes [58,59]. Este formalismo describe el estado de polarización de un haz de luz en base a cuatro parámetros, llamados parámetros de Stokes, los cuales pueden representarse como un vector de cuatro dimensiones $\mathbf{S}$, conocido como vector de Stokes.

$$\mathbf{S} = (S_0, S_1, S_2, S_3)^T \quad (1)$$

donde S_0 corresponde a la intensidad total del haz, S_1 indica la cantidad de polarización lineal horizontal o vertical, S_2 cuantifica la cantidad de polarización lineal diagonal o anti-diagonal, y S_3 corresponde a la cantidad de polarización circular dextrógira o levógira. Este formalismo es particularmente interesante para las aplicaciones con tejidos biológicos ya que el vector de Stokes $\mathbf{S}$ describe completamente cualquier estado de polarización de luz, incluyendo los estados parcialmente polarizados, que son predominantes en este tipo de estudios.

Para caracterizar la cantidad de luz polarizada de un haz parcialmente polarizado se utiliza el grado de polarización (DoP), el cual se define como:

$$DoP \equiv \frac{\sqrt{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2}}{S_0} \quad (2)$$

El grado de polarización comprende valores entre el 0, luz completamente despolarizada, y el 1, luz totalmente polarizada. Cualquier valor intermedio describe un estado parcialmente polarizado.

Bajo este formalismo, la interacción polarimétrica de la luz con la materia está descrita mediante una matriz $\mathbf{M}$, llamada matriz de Mueller, la cual relaciona el vector de Stokes del haz antes y después de la interacción luz-materia, $\mathbf{S}_{in}$ y $\mathbf{S}_{out}$, respectivamente.

$$\mathbf{S}_{out} = \mathbf{M} \cdot \mathbf{S}_{in} = \begin{pmatrix} m_{00} & m_{01} & m_{02} & m_{03} \\ m_{10} & m_{11} & m_{12} & m_{13} \\ m_{20} & m_{21} & m_{22} & m_{23} \\ m_{30} & m_{31} & m_{32} & m_{33} \end{pmatrix} \cdot \mathbf{S}_{in} \quad (3)$$

donde m_{ij} son 16 parámetros reales, de los cuales m_{00} corresponde a la reflectancia o transmitancia del medio con luz incidente completamente despolarizada. Cabe destacar que $\mathbf{M}$ no solo depende de las características del material, sino también de la longitud de onda, la dirección del haz incidente y la dirección de salida del haz [44,45]. Sin embargo, una vez que estas variables están fijas, la matriz de Mueller $\mathbf{M}$ describirá cómo se modifica la polarización de todos los posibles haces incidentes debido a la interacción luz-materia en procesos lineales. En otras palabras, si $\mathbf{M}$ es conocida, se puede calcular el estado de polarización resultante de una interacción luz-materia $\mathbf{S}_{out}$, para cualquier estado de polarización incidente $\mathbf{S}_{in}$.

2.b. Puertas de Polarización a partir de la Matriz de Mueller

En las Puertas de Polarización el haz resultante es analizado con un medio diatenuador y una cámara/detector. En esta configuración, el medio diatenuador suele dejar pasar sólo un estado de polarización y este suele ser el mismo, o el ortogonal, a la polarización del haz incidente. Un ejemplo común de Puerta de Polarización sería iluminar una muestra con luz linealmente polarizada en el eje horizontal y analizar la respuesta con un polarizador lineal orientado verticalmente. El polarizador lineal actuaría como un analizador $\mathbf{A}$ y la intensidad de la luz resultante se mediría con una cámara. Siguiendo esta descripción, la intensidad medida con la cámara vendría descrita por la siguiente ecuación:

$$I = \mathbf{A} \cdot \mathbf{M} \cdot \mathbf{S}_{in} \quad (4)$$

donde el analizador es caracterizado por el estado de polarización discretizado $\mathbf{A} = (\mathbf{A}_0, \mathbf{A}_1, \mathbf{A}_2, \mathbf{A}_3)$.

En base a la Ec. (3), podemos determinar la intensidad medida con una configuración de Puerta de Polarización siempre que se conozca la matriz de Mueller del medio a estudiar. Esto es demostrado experimentalmente en la referencia [60], donde se proporciona una ecuación para calcular cualquier configuración de Puertas de Polarización en base a los 16 parámetros m_{ij} de la matriz de Mueller de la muestra, a la elipticidad ε y al azimut α de la polarización incidente y analizada. En el anterior ejemplo con iluminación linealmente polarizada en horizontal y con un analizador de luz verticalmente polarizada, la intensidad sería descrita por la siguiente ecuación:

$$I_{H-V} = m_{00} + m_{01} - m_{10} - m_{11} \quad (5)$$

El caso anterior es solo un ejemplo que demuestra que conociendo la matriz de Mueller de un sistema somos capaces de reproducir las condiciones de cualquier configuración de Puerta de Polarización sin la necesidad de implementarlas experimentalmente. Es decir, tenemos acceso a todos los posibles escenarios basados en Puertas de Polarización a partir de una única medida experimental de la matriz de Mueller (la matriz de Mueller se obtiene a partir de medir un mínimo de 16 Puertas de polarización con diferentes configuraciones polimétricas [57]). Además, la matriz de Mueller nos abre la posibilidad de aplicar otras técnicas basadas en los observables, que permiten un mayor conocimiento físico del sistema estudiado. Por estos motivos, se recomienda realizar estudios en base a la matriz de Mueller, en lugar de Puertas de Polarización, cuando no se conoce la respuesta polarimétrica de una muestra.

2.c. Observables de despolarización

La matriz de Mueller describe el comportamiento polarimétrico de un material, el cual se puede modelizar como la combinación de tres propiedades polarimétricas [44]: diatenuación-polarización (dicroísmo), retardo (birrefringencia) y despolarización. Estas propiedades son caracterizadas y estudiadas mediante observables polarimétricos. Los tejidos biológicos tienen una muy baja respuesta dicroica pero una alta respuesta en retardo y despolarización [4]. Como se ha mencionado en la introducción, el retardo es ampliamente analizado con una extensa serie de observables: R , δ , θ y ϕ [31-33,41,42], pero por contra, el análisis de la despolarización se suele limitar al uso de observables globales como el índice de despolarización P_Δ , o el poder de despolarización, Δ .

Índice de despolarización

El índice de despolarización, P_Δ , es una medida global de la despolarización de una determinada matriz de Mueller $\mathbf{M}$, que se calcula directamente a partir de los parámetros de dicha matriz [44].

$$P_\Delta \equiv \sqrt{\frac{(\sum_{i,j=0}^3 m_{ij}^2) - m_{00}^2}{3}} \quad (6)$$

donde los subíndices ij indican el elemento de la matriz $\mathbf{M}$.

P_Δ es una generalización del grado de polarización a las matrices de Mueller [44]. En lugar de caracterizar el contenido de despolarización de los haces de luz, el índice de despolarización caracteriza el comportamiento de despolarización de las muestras. El valor máximo de P_Δ es 1, caracterizando matrices no despolarizantes, y el valor mínimo es 0, asociado con sistemas totalmente despolarizantes (despolarizadores ideales). Los valores intermedios cuantifican el proceso aleatorio general detrás de los mecanismos de despolarización.

Poder de despolarización

El poder de despolarización, Δ , tiene una interpretación física equivalente a P_Δ pero se obtiene a partir de la descomposición de Lu-Chipman [46]. En la descomposición de Lu-Chipman la matriz de Mueller se descompone en una concatenación de 3 matrices, cada una conteniendo una de las principales propiedades polarimétricas.

$$\mathbf{M} = m_{00} \mathbf{M}_\Delta \mathbf{M}_R \mathbf{M}_D \quad (7)$$

donde $\mathbf{M}_D$ contiene la información sobre la diatenuación, $\mathbf{M}_R$ encierra la información sobre el retardo y $\mathbf{M}_\Delta$ incluye todas las propiedades despolarizantes de la muestra. Desgraciadamente, debido a la simetría de $\mathbf{M}$, no es posible separar al 100% estas propiedades en 3 matrices puras y es por eso que la matriz de despolarización $\mathbf{M}_\Delta$ incluye cierto contenido dicróico, dentro del llamado vector polarizancia, $\mathbf{P}_\Delta$, como puede verse en la siguiente ecuación [46].

$$\mathbf{M}_\Delta = \begin{pmatrix} 1 & \mathbf{0}^T \\ \mathbf{P}_\Delta & \mathbf{m}_\Delta \end{pmatrix} \quad (8)$$

Bajo esta descomposición el poder de despolarización, Δ , se obtiene a partir de la traza de la matriz 3x3 $\mathbf{m}_\Delta$.

$$\Delta = 1 - \frac{|\text{tr}(\mathbf{m}_\Delta)|}{3} \quad (9)$$

En el caso de matrices físicamente realizables, el poder de despolarización presenta valores entre 0, muestras no despolarizantes, y 1, muestras completamente despolarizantes. Es importante destacar que para muestras no dicróicas $\Delta = P_\Delta - 1$. También es importante remarcar que P_Δ y Δ son dos observables globales que no dan información de posibles dependencias de la despolarización con la polarización del haz incidente, y por tanto, sobre anisotropías de despolarización.

Índices de Pureza Polarimétrica

Alternativamente, los Índices de Pureza Polarimétrica (IPP) describen el contenido despolarizante de una matriz de Mueller con mayor profundidad [56]. Estos observables fueron descritos por I. San José and J. J. Gil en 2011 y se obtienen a partir de la descomposición espectral de Cloude [44]. En la descomposición de Cloude la matriz de Mueller se escribe como la combinación lineal de cuatro matrices de elementos no despolarizantes, con diferentes pesos.

$$\mathbf{M} = \sum_{i=0}^3 \lambda_i \mathbf{M}_i \quad (10)$$

Los diferentes pesos, λ_i , son los autovalores de la matriz de covarianza $\mathbf{H}(\mathbf{M})$ [44]. Estos autovalores están ordenados de manera que $m_{00} \geq \lambda_0 \geq \lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \lambda_3 \geq 0$.

Los Índices de Pureza Polarimétrica son tres observables que se definen a partir de estos autovalores, siguiendo la expresión a continuación:

$$P_i \equiv \frac{1}{m_{00}} \sum_{k=1}^i k(\lambda_{k-1} - \lambda_k) \quad (11)$$

donde $i = 1, 2$, y 3 .

De acuerdo con el orden fijado para los autovalores, los IPP se establecen como $0 \leq P_1 \leq P_2 \leq P_3 \leq 1$. En muestras no despolarizantes los tres valores son igual a 1, y en despolarizadores ideales, $\mathbf{M}_{\Delta 0} = \text{diag}(m_{00}, 0, 0, 0)$, el valor de los tres IPP es 0.

2.d. Interpretación de los Índices de Pureza Polarimétrica

Para interpretar los IPP es útil valerse de la Descomposición Trivial [44] y de una serie de simulaciones que han sido validadas experimentalmente [61,62]. En la descomposición trivial la matriz de Mueller se obtiene

a partir de una combinación lineal de cuatro matrices donde los pesos de las matrices están definidos a partir de los IPP.

$$\mathbf{M} = m_{00}[P_1\mathbf{M}_{H1} + (P_2 - P_1)\mathbf{M}_{H2} + (P_3 - P_2)\mathbf{M}_{H3} + (1 - P_3)\mathbf{M}_{H4}] \quad (12)$$

donde $\mathbf{M}_{Hi}$ son las matrices asociadas a los cuatro vectores propios de la matriz de covarianza [44]. La utilidad de esta descomposición reside en que $\mathbf{M}_{H1}$ es la única matriz no despolarizante y que $\mathbf{M}_{H4}$ es un despolarizador ideal, $\mathbf{M}_{\Delta 0}$. En consecuencia, P_1 indica la cantidad de un elemento no despolarizante con el que se puede asimilar el medio, y P_3 la cantidad de un despolarizador ideal que se puede asociar con $\mathbf{M}$. Además, si $P_1 = P_3 \neq 1$ tendremos un medio con despolarización isotrópica, y si $P_1 \neq P_3$ tendremos un medio con despolarización anisótropa. Esto se puede observar en la siguiente simulación (Fig. 1) donde se construyen, siguiendo la Ec. (9), dos despolarizadores diferentes combinando elementos no despolarizantes y se les hacen interactuar con todos los estados totalmente polarizados [62]. Nótese que la construcción de los despolarizadores puede hacerse mediante la suma incoherente de elementos polarimétricos simples [61].

Los dos despolarizadores, $\mathbf{M}_A$ y $\mathbf{M}_B$, siguen la siguiente estructura:

$$\mathbf{M}_A = \frac{3 + \sqrt{5}}{8}\mathbf{M}_{air} + \frac{1}{4}\mathbf{M}_{HWP(0^\circ)} + \frac{3 - \sqrt{5}}{8}\mathbf{M}_{HWP(45^\circ)} \quad (13)$$

$$\mathbf{M}_B = \frac{3 + \sqrt{3}}{4\sqrt{3}}\mathbf{M}_{air} + \frac{\sqrt{3} - 1}{4\sqrt{3}}(\mathbf{M}_{HWP(0^\circ)} + \mathbf{M}_{HWP(45^\circ)} + \mathbf{M}_{HWP(45^\circ)}\mathbf{M}_{HWP(0^\circ)}) \quad (14)$$

donde $\mathbf{M}_{air}$ corresponde a la matriz de Mueller del aire y $\mathbf{M}_{HWP}$ es la matriz de Mueller de una lámina retardadora de media onda con diferentes orientaciones.

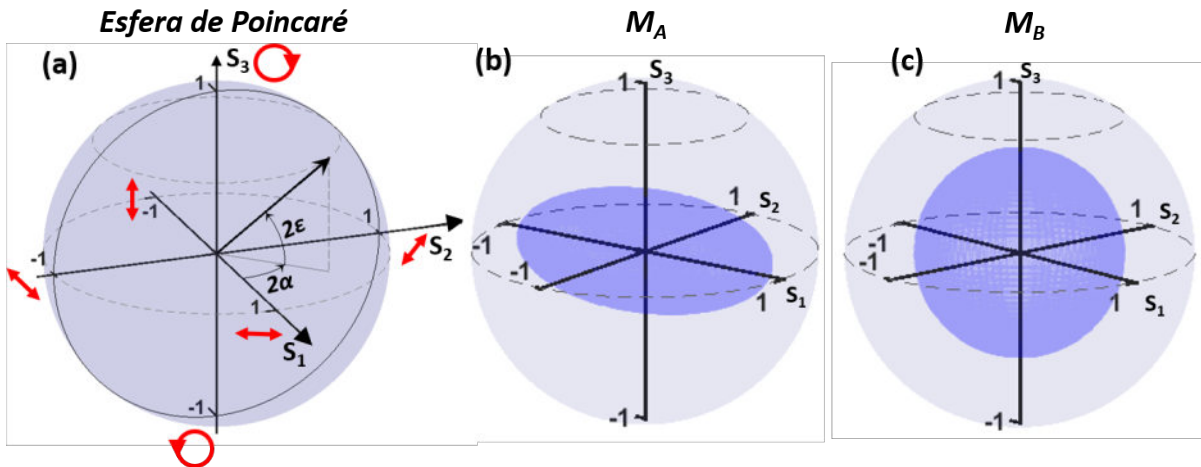


Fig.1. (a) Esquema de la esfera de Poincaré. (b) Representación de todos los estados de polarización completamente polarizados en la esfera de Poincaré después de interactuar con el medio $\mathbf{M}_A$ y (c) con el medio $\mathbf{M}_B$

En la Fig. 1. (a) se ha representado la esfera de Poincaré [44], la cual es una esfera de radio 1 donde un estado completamente polarizado es representado en la superficie de esta esfera y un estado completamente despolarizado es representado en el origen de coordenadas. Estados parcialmente polarizados están representado en el interior de esta esfera.

En las Figs. 1. (b) y (c) se representa en la esfera de Poincaré la transformación de todos los estados de polarización completamente polarizados después de interactuar con los medios $\mathbf{M}_A$ y $\mathbf{M}_B$, respectivamente (mientras que los estados totalmente polarizados son representados en un tono grisáceo sobre la superficie de la esfera de Poincaré, en el interior se muestran en azul los estados resultantes de la interacción con los medios). Se puede observar que $\mathbf{M}_B$ despolariza la luz incidente de igual manera independientemente de su estado de polarización inicial (isótopamente), mientras que $\mathbf{M}_A$ lo hace de forma dependiente con el estado

de polarización incidente (anisótricamente), por ejemplo, despolarizando en mayor medida los estados circularmente polarizados que aquellos linealmente polarizados en las direcciones vertical u horizontal.

Si analizamos el índice de despolarización y los IPP de las dos matrices, proporcionados en la TABLA 1, observamos que los medios comparten el mismo valor de P_Δ pero que sus IPP son completamente distintos. Es decir, que los medios se pueden distinguir en base a los IPP, pero no se pueden diferenciar si se analiza su P_Δ . Esto es debido a que la media de la despolarización sobre todos los estados incidentes es similar (cuantificado por P_Δ), pero esta despolarización es distinta si nos fijamos en las transformaciones específicas estado por estado (cuantificado por los IPP). Estos resultados se han demostrado experimentalmente en la ref. [61].

TABLA 1. Índice de despolarización y IPP de M_A y M_B .

Observable	M_A	M_B
P_Δ	0.58	0.58
P_1	0.40	0.58
P_2	0.71	0.58
P_3	1.00	0.58

Es relevante mencionar que P_Δ se puede calcular a partir de los IPP [44], pudiéndose afirmar que los IPP nos proporcionan la información de despolarización de P_Δ , pero de una manera más relevante y completa.

3. Montaje experimental: Polarímetro de imagen de Mueller

En la mayoría de los experimentos que se discuten en la tesis se utiliza un polarímetro de matriz de Mueller de imagen completa. Este polarímetro está compuesto por dos brazos móviles independientes que tienen la función de generar luz con distintos estados de polarización y de analizar el estado de polarización resultante de la interacción con la muestra (representados en la Fig. 2). Cada uno de estos brazos se compone de un polarizador lineal orientado a 0° con respecto a la vertical del laboratorio y dos láminas retardadoras de cristal líquido de alineamiento paralelo orientadas a 45° y 0° , respectivamente. En el sistema analizador estos elementos se encuentran en el orden inverso al mencionado. Adicionalmente el sistema generador se compone de una fuente de luz que puede iluminar con tres longitudes de onda diferentes dentro del rango visible (luz roja = 625 nm, luz verde = 530 nm y luz azul = 470 nm). Por su parte, el sistema analizador se comprende, adicionalmente, de una camera CCD de 2452x2056 pixeles y un objetivo de focal de 35 mm que forma la imagen de la muestra. Con esta configuración se obtiene una resolución lateral de 22 μm .

Mediante la combinación del sistema generador y del sistema analizador se pueden obtener las imágenes de la matriz de Mueller experimental de las muestras. Esto requiere generar como mínimo 4 estados de polarización distintos y el uso de 4 analizadores distintos (un total de 16 imágenes de intensidad son necesarias).

Como los sistemas generador y analizador están armados en brazos independientes, el instrumento permite explorar diferentes configuraciones de medición angular. En la tesis [57], se trabajó con una configuración en reflexión para medir la luz dispersada por las muestras (Fig. 2 (a)) y en una configuración en transmisión (Fig. 2 (b)). En la configuración en reflexión la muestra es iluminada a 30° con respecto a la horizontal del laboratorio y el sistema analizador está orientado a 0° con respecto a la vertical del laboratorio para evitar reflejos directos. La configuración en transmisión se ha utilizado principalmente en experimentos con tejidos de origen vegetal y es la misma configuración utilizada para calibrar el polarímetro.

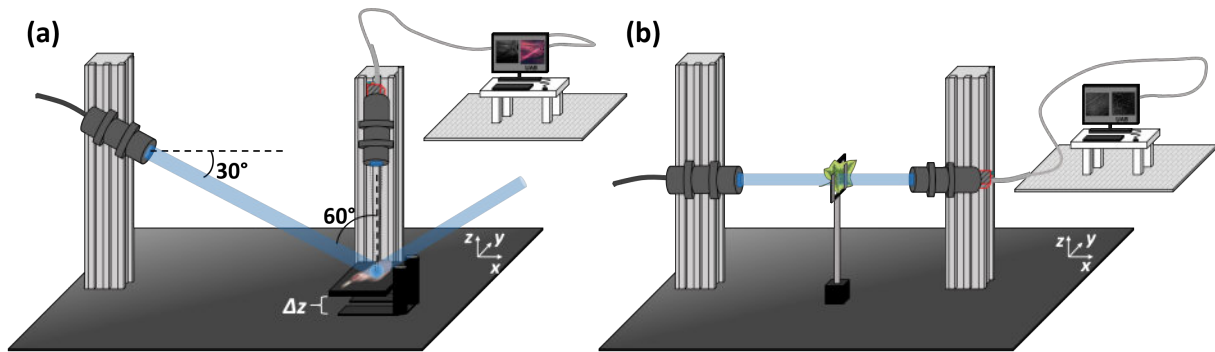


Fig.2. Esquema del polarímetro de imagen de Mueller (a) en reflexión y (b) en transmisión.

4. Aplicaciones biomédicas de los Índices de Pureza Polarimétrica

Tal como se introdujo previamente, esta tesis se centra en explorar el potencial de los IPP dentro del ámbito médico y en relación con los tejidos de origen animal. En particular analizamos el interés de los IPP en la visualización y clasificación de tejidos animales.

4.a. Índices de Pureza Polarimétrica para la visualización de tejidos animales

A lo largo de la tesis aparecen una amplia variedad de experimentos donde se utilizan los IPP para visualizar distintos tejidos de origen animal [57, 63]. Para no extendernos, en esta revisión nos centraremos en dos de los resultados más ilustrativos: (a) una medida de una disección de una pata de conejo y (b) una imagen endocárdica de un corazón de cordero. Además, en este estudio nos limitaremos a observables de despolarización.

Disección de una pata de conejo

La matriz de Mueller de la disección de una pata de conejo se midió usando el polarímetro de Mueller descrito anteriormente en la configuración de reflexión y utilizando la longitud de onda de 470 nm. Se utilizó la longitud de onda de 470 nm porque queríamos inspeccionar estructuras biológicas ubicadas en la superficie de la muestra y las longitudes de onda mayores penetran más en la muestra. Se han calculado los principales observables de despolarización que vamos a analizar (P_Δ , Δ , y los IPP) y los resultados se presentan en la Fig. 3. En la Fig. 3 también se incluye la imagen correspondiente al coeficiente m_{00} , que es equivalente a la imagen de intensidad que obtendríamos con un instrumento estándar no polarimétrico.

En la Fig. 3 (a), la imagen de intensidad, podemos distinguir un músculo estriado (representado en gris), un tendón alargado que se visualiza horizontal sobre el músculo (representado en blanco y marcado con una flecha azul) y el soporte de la muestra (coloreado en negro en la parte inferior de la imagen). Nótese que la parte inferior de la imagen presenta niveles de intensidad más bajos debido a las irregularidades de la muestra, lo que obliga a mantener la iluminación baja para evitar posibles saturaciones en la cámara CCD y asegurar la correcta medición de la polarización.

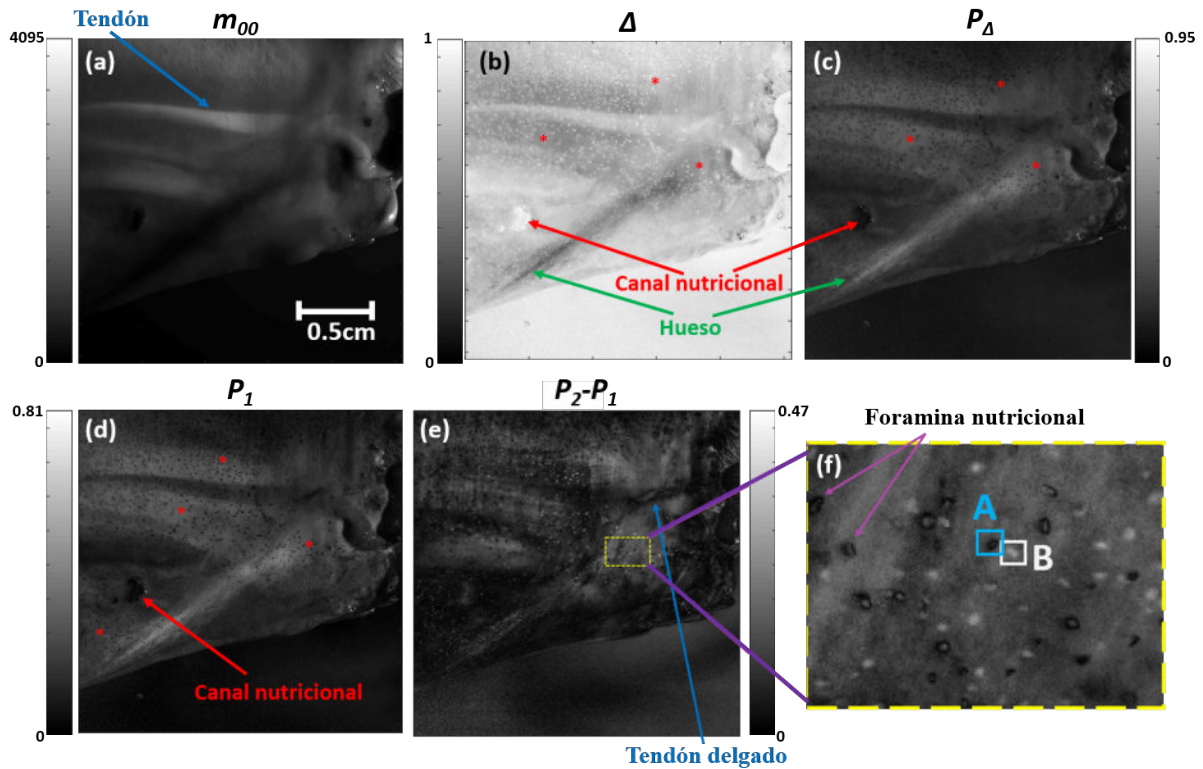


Fig.3. Medidas polarimétricas de imagen de una disección de una pata de conejo. Los observables mostrados son: (a) m_{00} , (b) Δ , (c) P_{Δ} , (d) P_1 y (e) $P_2 - P_1$. La figura (f) es la imagen ampliada del recuadro amarillo de la figura (e).

Las imágenes correspondientes a los canales de despolarización comúnmente utilizados en la literatura, Δ y P_{Δ} (Figs. 3 (b) y (c)), muestran las mismas estructuras vistas en la imagen de intensidad (Fig.3 (a)) pero además revelan algunas estructuras, como un canal nutritivo del hueso (marcado con flechas rojas en las Figs. 3 (b) y (c)) y una cresta ósea que cruza diagonalmente la parte inferior de la imagen de la muestra (marcada con flechas verdes en las Figs. 3 (b) y (c)). Estas dos estructuras fisiológicas apenas se pueden observar en la imagen de intensidad, pero en los canales de despolarización aparecen mucho mejor contrastadas. Esto es debido a que la medida de la capacidad de despolarización de la muestra es independiente de la intensidad de iluminación utilizada para obtener las imágenes (obviando la propagación del error experimental).

Analizando en más detalle las imágenes de despolarización (Figs. 3 (b) y (c)) nos percatamos de una estructura moteada que cubre toda la muestra, marcada con asteriscos rojos (*), pero que no aparece en la imagen de m_{00} . Asociamos esta estructura a la ubicación de foramina nutricional del hueso poroso. Esta foramina nutricional tiene la misma reflectividad que los tejidos circundantes, pero despolarizan la luz de manera diferente.

Una vez analizados Δ y P_{Δ} , calculamos los IPP y los representamos en la Fig. 3. En esta revisión nos hemos limitado a representar los canales más interesantes. En concreto, P_1 es representado en la Fig. 3 (d) y la diferencia $P_2 - P_1$ se enseña en la Fig. 3 (e). Con el observable P_1 identificamos las mismas estructuras que en Δ y P_{Δ} , pero con mayor contraste. Los valores de visibilidad de las estructuras se pueden consultar en la ref. [63]. A diferencia del canal P_1 , en el observable $P_2 - P_1$ se puede identificar un tendón delgado localizado debajo de del tendón principal que cruza horizontalmente la imagen (el tendón delgado aparece señalizado con una flecha azul en la Fig. 3 (e)). Este tendón delgado es visible en esta imagen debido a que la combinación de los dos tendones despolariza la luz de manera anisótropa y de forma distinta a la despolarización producida por un solo tendón. Por contra, la despolarización media de la mezcla de los dos tendones es muy parecida a la despolarización de un tendón y eso dificulta su visualización en los canales convencionales.

En la Figura de $P_2 - P_1$, Fig.3 (e), también se observa la estructura moteada previamente mencionada. A diferencia de los otros canales de despolarización, Δ , P_{Δ} , y P_1 , donde la foramina nutricional se representa

siempre con el mismo color, ésta aparece representada en dos tonos claramente diferenciados (blanco y negro) en el canal $P_2 - P_1$ (para una mejor visualización, la Fig. 3 (f) muestra una ampliación de la región marcada con un rectángulo amarillo en la Fig. 3 (e)). Los diferentes tonos de color indican que esos poros son físicamente diferentes (blanco y negro corresponden a una tipología de poro diferente) porque su anisotropía de despolarización es diferente. Dado que la porosidad del hueso cortical puede surgir tanto de pequeños vasos corticales como de la estructura inherente del propio hueso cortical, suponemos que esta variación blanco-negro puede estar relacionada con la profundidad del poro y, en consecuencia, con su origen fisiológico.

Imagen endocárdica de un corazón de cordero

En un segundo experimento se ha explorado cómo presentar toda la información de los IPP en una sola imagen. Para tal fin, se codifica la información de los tres IPP en los colores RGB de una imagen coloreada. La técnica de pseudocoloración seguiría la siguiente estructura de color:

$$C_{pix}(x, y) = (\alpha_1 P_1(x, y), \alpha_2 P_2(x, y), \alpha_3 P_3(x, y)) \quad (15)$$

donde $P_1(x, y)$, $P_2(x, y)$, y $P_3(x, y)$ son los píxeles en las coordenadas x e y de las imágenes IPP y α_1 , α_2 , y α_3 son tres pesos que nos proporcionan cierta flexibilidad a fin de compensar los valores generalmente más bajos de P_1 en comparación con los de P_2 y P_3 .

Esta técnica la ponemos en práctica con la medida en reflexión de un corazón de cordero disecado que incluye un músculo cardíaco cubierto de endocardio y tejido conectivo rico en aparato subvalvular (ver Fig. 4). El corazón se cortó en dos partes para obtener imágenes de la sección interna. Las medidas se realizaron en el canal de 625 nm. Con el propósito de ilustrar el método de la pseudocoloración y su comparación, hemos representado el coeficiente m_{00} (Fig. 4 (a)), el índice de despolarización P_Δ (Fig. 4 (b)) y una imagen pseudocoloreada basada en la Ecuación (14) con $\alpha_1=3$, $\alpha_2=1$ y $\alpha_3=1$ (Fig. 4 (c)).

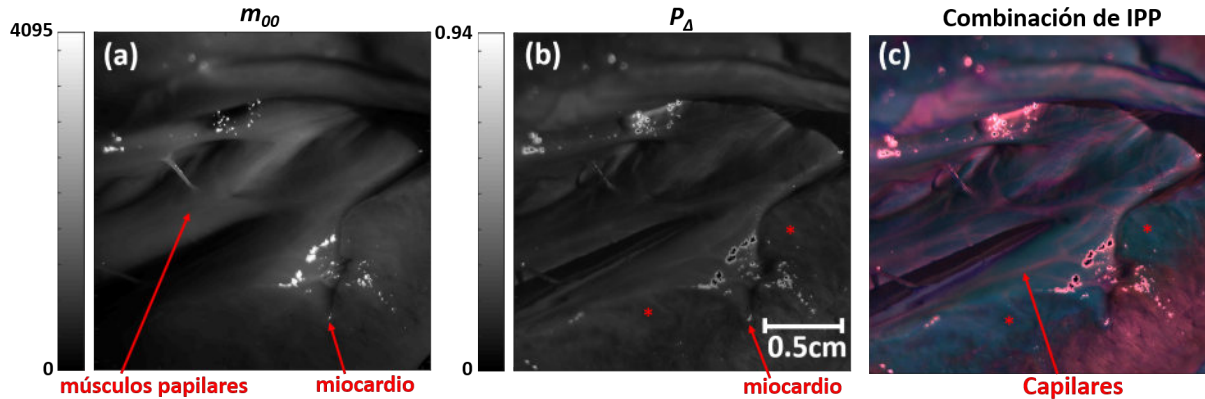


Fig.4. Imagen de (a) intensidad m_{00} , (b) P_Δ y (c) pseudocoloreada de un corazón de cordero disecado. La imagen pseudocoloreada se ha calculado a partir de la Ec. (14) con $\alpha_1=3$, $\alpha_2=1$, y $\alpha_3=1$

En la imagen de intensidad (Fig. 4 (a)) observamos algunos músculos papilares y un miocardio sólido. Al igual que con la pata de conejo, la imagen de intensidad tiene ciertas regiones más oscuras que otras debido a la falta de planitud de la muestra medida y a la iluminación oblicua. En cuanto a la imagen del índice de despolarización P_Δ (Fig. 4 (b)), ésta muestra las válvulas y las cavidades cardíacas claramente mejor contrastadas. Además, algunos detalles de los músculos papilares están realzados (ver las regiones ricas en tejido conectivo marcadas con asteriscos "*" rojos). Finalmente, la imagen pseudocoloreada basada en los IPP proporciona los mejores resultados (Fig. 4 (c)). La visualización de los músculos papilares y el miocardio sólido es superior, junto con un mejor contraste de las válvulas y las cavidades cardíacas. Además, la imagen pseudocoloreada también hace visibles los capilares sanguíneos del corazón (Fig. 4 (c)) los cuales son difíciles de ver o son completamente invisibles en los otros dos canales. Cabe destacar que los colores utilizados en la Fig. 4 (c) no solo son útiles para visualizar mejor las estructuras tisulares, sino que también proporcionan información sobre la anisotropía de despolarización. Esta información está relacionada con el mecanismo intrínseco de despolarización de los tejidos constituyentes de la muestra y no se puede

obtener con los parámetros globales de despolarización como P_Δ y Δ . En otras palabras, el color rojo de los capilares y el color azul de los músculos papilares (ver Fig. 4 (c)) indican que los mecanismos de despolarización de estos tejidos son diferentes, por lo que sus estructuras deben ser físicamente distintas.

4.b. Índices de Pureza Polarimétrica para la clasificación de tejidos animales

En el apartado anterior hemos visto que los IPP nos proporcionan información adicional a la obtenida con el índice de despolarización P_Δ . En el siguiente estudio examinaremos el potencial de los IPP para clasificar tejido y lo compararemos con P_Δ .

Para este experimento se midió la imagen de la matriz de Mueller de 120 muestras (40 músculos, 40 tendones, y 40 uniones mio-tendinosas; ver Fig. 5) utilizando el polarímetro de imágenes de Mueller descrito previamente. Todas las muestras se obtuvieron de 20 muslos de pollo diferentes y se midieron utilizando el mismo procedimiento para asegurar condiciones de descomposición similares (el procedimiento completo se puede consultar en la ref. [64]). La colección de tejidos se midió a tres longitudes de onda diferentes, 470, 530 y 625 nm, y para cada una de ellas, se aplicó un procedimiento de selección de datos (descrito en detalle en la ref. [64]) para elegir una región de interés compuesta únicamente de píxeles del tejido deseado (región de interés marcada con un cuadrado blanco en la Fig. 5 (c)). Cada región de interés se compone de 150×150 píxeles, es decir, $2.25 \cdot 10^4$ píxeles, y cada píxel corresponde a una matriz de Mueller. Por lo tanto, trabajamos con una base de datos de 2.7 millones de matrices de Mueller, las cuales describen la respuesta polarimétrica de los diferentes tejidos examinados.

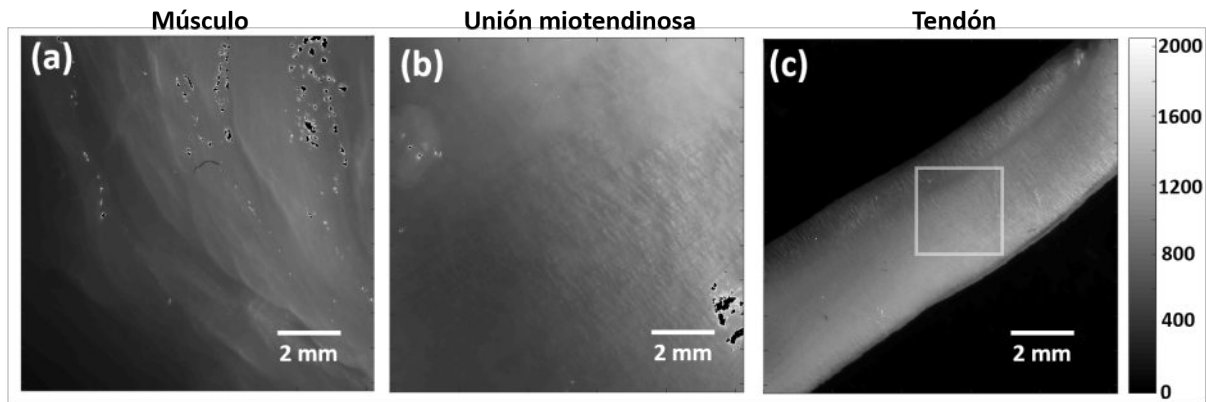


Fig.5. Imágenes de intensidad obtenidas con luz de 625 nm de (a) un músculo, (b) una unión miotendinosa, y (c) un tendón.

Una vez seleccionadas las 2.7 millones de matrices de Mueller, se calculan los IPP y el P_Δ . Luego, una sección aleatoria de los píxeles del 1% del total de datos, es decir, $2.7 \cdot 10^4$ píxeles, se utilizan para construir el clasificador supervisado. Después, el otro 99% de los píxeles se utiliza para probar la eficiencia de los clasificadores generados a partir de las diferentes métricas de despolarización. Cabe mencionar que sabemos de antemano el tipo de tejido asociado a cada píxel, por lo que podemos determinar los porcentajes de tejidos bien clasificados al usar cada grupo de métricas. Los resultados del experimento para el clasificador k-nearest neighbors con 50 nodos [64] se muestran en la TABLA 2.

TABLA 2. Porcentaje de píxeles de tejido bien clasificados en función de la longitud de onda. La última columna plasma los resultados obtenidos a partir de combinar las tres longitudes de onda para construir el clasificador.

Longitud de onda [nm]	470	530	625	625+530+470
Acierto con P_Δ [%]	52	50	60	76
Acierto con P_1, P_2 y P_3 [%]	59	59	65	86

Los resultados de la TABLA 2 nos muestran que para todas las longitudes de onda los tejidos se clasifican con un mayor porcentaje de acierto si utilizamos los IPP en comparación con P_Δ . Esta mejora es de 5 puntos porcentuales en el peor de los casos. Esto es gracias a la valiosa información sobre la anisotropía de despolarización que los IPP proporcionan, una ventaja que P_Δ no ofrece. Los resultados también nos muestran como la combinación de distintas longitudes de onda mejora significativamente el porcentaje de acierto (21 puntos porcentuales para IPP). Esto apoya la idea de realizar polarimetría hiperespectral para

sistemas de clasificación de tejidos. Por último, quiero mencionar que, en el trabajo original, ref. [64], y en la tesis, ref. [57], se exploran más métricas de despolarización y más clasificadores pero que las conclusiones principales son las presentadas en esta revisión.

5. Técnicas de polarización de Mueller para aplicaciones en plantas

En el campo de la polarimetría en plantas, el interés de la tesis reside en estudiar el potencial de la polarimetría de Mueller para aplicaciones botánicas. Aunque en la tesis se presentan resultados prometedores con la propiedad del retardo [57,66], en esta revisión nos limitaremos a discutir resultados obtenidos con observables de despolarización. Dividiremos los resultados en dos escalas de medida: (a) escala macroscópica y (b) escala microscópica.

5.a. Escala macroscópica

Para los resultados macroscópicos hemos medido una hoja de *Hedera maroccana* McAll. (Araliaceae) con el polarímetro de imagen de Mueller en configuración de transmisión y con el canal de 530 nm de longitud de onda. Las imágenes resultantes se muestran en la Fig. 6.

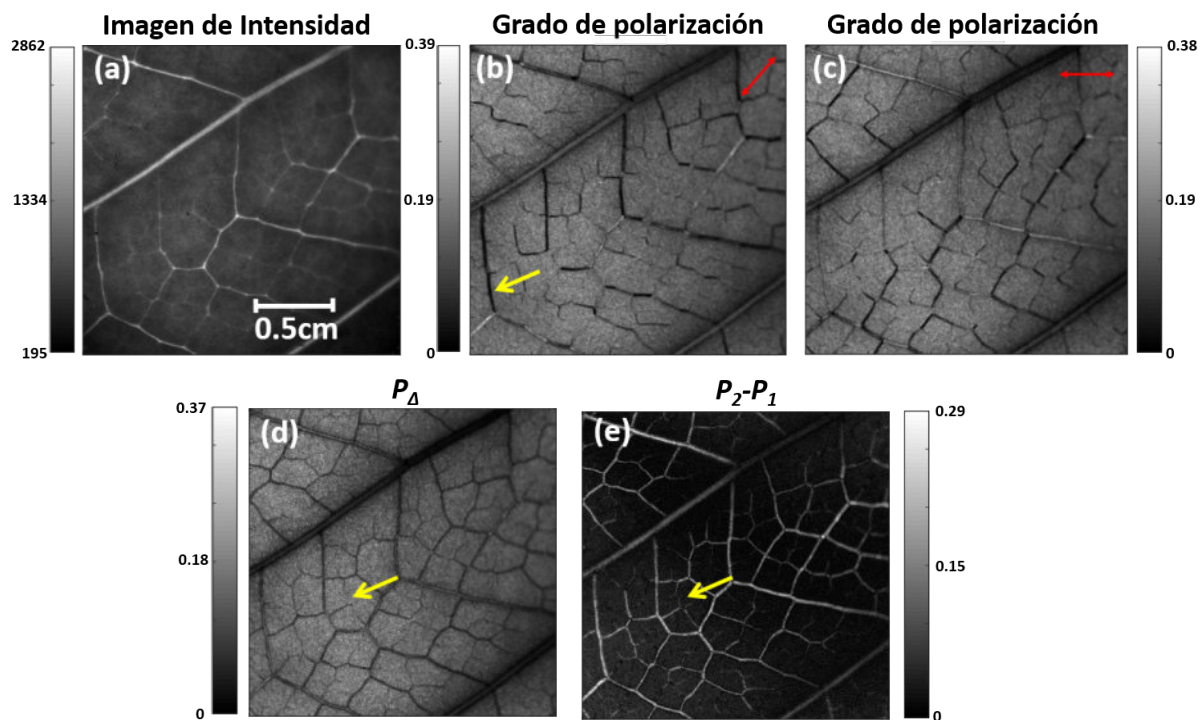


Fig.6. Imágenes de (a) intensidad, (b) grado de polarización de luz linealmente polarizada en diagonal, (c) grado de polarización de luz linealmente polarizada en horizontal, (d) P_{Δ} y (e) $P_2 - P_1$.

Como en experimentos anteriores, en la Fig. 6 (a) mostramos la imagen de intensidad para poder comparar. La medida en transmisión de la Fig. 6 (a) revela la presencia de las venas primarias (más gruesas) y secundarias (más delgadas) de la hoja, que son responsables de transportar agua y nutrientes. Las venas primarias aparecen con un alto contraste, mientras que las venas secundarias son menos visibles, con algunas partes de esas venas completamente invisibles. Usualmente, los estudios de polarización en plantas miden el grado de polarización de la luz transmitida por la planta. Por este motivo las Figuras 6 (b) y (c) muestran el grado de polarización de la luz transmitida cuando la hoja es iluminada con luz linealmente polarizada en diagonal y en horizontal, respectivamente. En estas dos imágenes, Fig. 6 (b) y (c), podemos observar un mayor contraste de las venas secundarias. No obstante, vemos que este contraste no es igual para todas las venas, y la despolarización de la luz depende de la orientación de la vena y la orientación de la polarización del haz incidente (ver la vena señalizada con una flecha amarilla en la Fig. 6 (b)). Este fenómeno no ocurre para el índice de despolarización (Fig. 6 (d)), el cual contrasta de manera muy similar y mejorada todas las venas secundarias. El contraste de P_{Δ} es invariante a rotación, pero el valor máximo para P_{Δ} es bastante inferior a los máximos observados en el grado de polarización. Esto se debe a que P_{Δ}

viene a ser como una media de todos los grados de polarización asociado a todas las posibles polarizaciones incidentes (una despolarización media). Por último, en la Fig. 6 (e) se representan los resultados de los observables $P_2 - P_1$. Debido a la gran anisotropía de despolarización de las venas secundarias, el canal $P_2 - P_1$ nos proporciona una mejora muy significativa respecto los otros observables, incluso superando los máximos obtenidos en imágenes de grado de polarización [65]. Además, las IPP son independientes a la orientación de la muestra, lo que las hace ideales para identificar venas secundarias y terciarias. De hecho, hay venas terciarias que sólo se observan en la imagen de $P_2 - P_1$, como la vena señalada con una flecha amarilla en las Figs. 6 (d) y (e).

5.b. Escala microscópica

En un segundo experimento se midió una sección de una hoja *Epipremnum aureum* (Linden & André) con un microscopio de imagen de Mueller localizado en el Laboratoire de Physique des Interfaces et Couches Minces (LPICM), de l'École Polytechnique [66]. La hoja se midió en transmisión con una longitud de onda de 533 nm y los principales observables polarimétricos están representados en la Fig. 7. En la imagen de intensidad, Fig. 7 (a), se pueden distinguir un estoma y un rafidio de inulina, marcados con una flecha roja y amarilla respectivamente. En esta revisión no entraremos a analizar el estoma ya que su respuesta polarimétrica es principalmente birrefringente, pero cabe mencionar que se obtienen muy buenos resultados cuando se analiza su respuesta en retardo [66]. Por otro lado, el rafidio de inulina tiene características totalmente distintas. En la imagen de intensidad, Fig. 7 (a), no se puede llegar a determinar los límites de este rafidio, especialmente por la zona superior de la imagen. Esta tarea es trivial cuando nos centramos en los observables de despolarización P_Δ (Fig. 7 (b)) y P_1 (Fig. 7 (c)). El rafidio de inulina aparece bien contrastado en estas imágenes, siendo su contraste mayor en P_1 gracias a una respuesta de despolarización de carácter anisótropo. En la tesis se muestra que la respuesta en P_1 es tan diferenciada que nos permite localizar esta estructura aun estando fuera del foco de la imagen [57,66]. Por este motivo, la microscopia de polarización puede ser ideal para detectar estructuras cristalinas microscópicas en hojas de plantas sin necesidad de hacer ningún tratamiento invasivo.

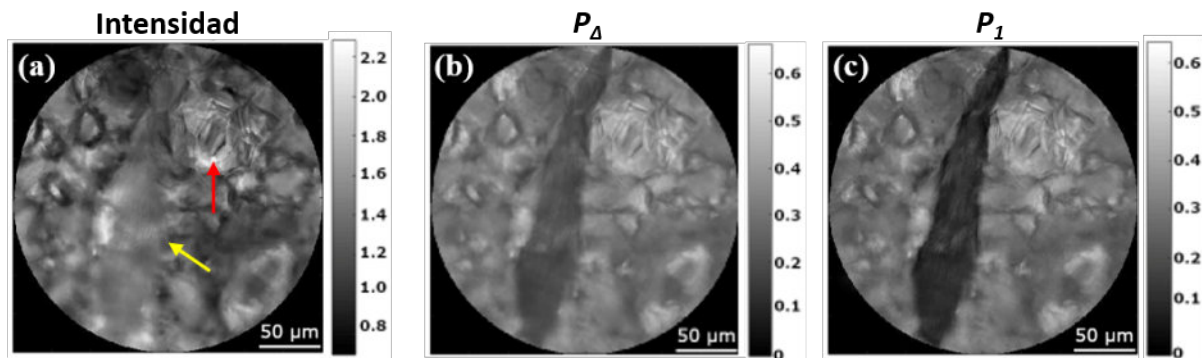


Fig.7. Imágenes de (a) intensidad m_{00} , (b) P_Δ , y (c) P_1 de una sección de una hoja *Epipremnum aureum* obtenidos con un microscopio de imagen de Mueller.

6. Conclusiones

En este artículo se ha revisado la tesis que lleva por título “Polarimetric methods for the image enhancement in biological applications”, defendida en septiembre de 2021 [57].

En la tesis, se estudiaron, implementaron experimentalmente y aplicaron por primera vez diversos métodos polarimétricos para obtener información adicional de la respuesta de polarización y despolarización de los tejidos biológicos. Primero, se demostró que las técnicas de Puerta de Polarización pueden entenderse como casos particulares de la interacción luz-materia en base al tratamiento de Mueller. Consecuentemente se sugiere el uso de la matriz de Mueller, especialmente en aplicaciones de exploración, por su mayor contenido en información física del sistema y su capacidad de implementar cualquier modelo de Puerta de Polarización. Luego, se discutió la interpretación de los índices de pureza polarimétrica (IPP) a través de un conjunto de muestras simuladas y sintetizadas experimentalmente. Los IPP están relacionados con las propiedades de despolarización de las muestras y, en comparación a las métricas de despolarización comúnmente utilizadas P_Δ y Δ , tienen la ventaja de sintetizar aún más el contenido de despolarización de las muestras, proporcionando información sobre la anisotropía de la despolarización. En la tesis también se

estudian los componentes de pureza (CP), los cuales nos dan información sobre la naturaleza de las estructuras físicas involucradas en el proceso de despolarización [57,62], y que por falta de espacio no se han incluido en esta revisión.

Una vez entendidas las propiedades de los IPP, estos se aplicaron en la inspección de tejidos biológicos de origen animal y vegetal. Para hacerlo se realizaron distintos experimentos con un polarímetro de Mueller detalladamente descrito en la tesis [57].

En el caso de la inspección de tejidos animales, los estudios se centran en explotar las propiedades de despolarización de la muestra a través del uso de las métricas IPP. Los IPP mejoran el contraste de la imagen de las estructuras del tejido, revelando ciertas estructuras ocultas al usar las técnicas polarimétricas estándar. Se propone una representación basada en imágenes a color para codificar toda la información de los IPP en una sola imagen. Además, los IPP también se utilizaron para clasificar automáticamente los tejidos animales mediante procesos de aprendizaje supervisado. Con los IPP se consigue un mejor porcentaje de tejidos bien clasificados en comparación con el índice de despolarización P_Δ , gracias a la información extra sobre anisotropía de despolarización contenida en los IPP.

En el caso de la inspección de plantas, los diferentes estudios proporcionados tienen como objetivo comparar las técnicas de Mueller con otros métodos de imagen polarimétricos. La polarimetría de Mueller mostró que P_Δ y los IPP son independientes a rotación, siendo esto una ventaja respecto al grado de polarización para la visualización de las venas en hojas. También se demuestra como la polarimetría de Mueller proporciona información adicional sobre las muestras, siendo esto de utilidad para el estudio de estructuras internas en las hojas y para facilitar la localización de estructuras cristalinas, incluso fuera del foco de la imagen. Por último, es importante mencionar que en la tesis se compara la polarimetría con otras técnicas ópticas, concluyéndose que las diferentes técnicas proporcionan información complementaria que puede ser muy útil si se utiliza de forma conjunta [57].

Acknowledgements

Quiero agradecer a mis directores de tesis, Juan Campos y Ángel Lizana, su gran apoyo y mentoría durante toda la tesis. También quiero agradecer a Enrique García-Caurel permitirme realizar dos estancias en su laboratorio “Laboratoire de Physique des Interfaces et des Couches Minces”. Por último, quiero agradecer a todos los co-autores y colegas que han colaborado para que la tesis “Polarimetric methods for the image enhancement in biological applications” haya sido posible.