Estado del Arte de la Biotónica en México

PRESENTACIÓN

La biofotónica se encarga del uso de la luz en el estudio de procesos biológicos a nivel molecular, celular y de tejidos. La interacción de la luz con la materia resulta en procesos tales como reflexión, transmisión, absorción, fluorescencia y esparcimiento, los cuales pueden proveer información de un sistema, por ejemplo biológico, a diversos niveles: molecular, celular y de tejido. Una característica principal de la luz es que es no invasiva, lo que la convierte en una poderosa herramienta de estudio en las ciencias de la vida, tanto a nivel de ciencia básica como en ciencia aplicada (actualmente la luz se utiliza de manera amplia en el diagnóstico, el tratamiento y la cura de diversas enfermedades). Por su naturaleza, la biofotónica es una área multidisciplinaria que requiere de la participación de profesionales de la física, química, biología, ingeniería y medicina, entre otras disciplinas. Entre sus múltiples líneas de avance, la biofotónica se encarga de: el desarrollo de nuevas fuentes de luminosas (coherentes e incoherentes), el estudio de la propagación de la luz en medios complejos (tales como los biológicos), el estudio de la interacción luz-materia, el análisis de la dinámica de frentes de ondas, el desarrollo de detectores más sensibles, el desarrollo y la aplicación de la microscopía moderna, aplicación de técnicas ópticas (que incluyen a la espectroscopia y la microscopía) para desarrollar sensores biológicos altamente selectivos, la manipulación de células y moléculas individuales por medios ópticos, etc.

Estados Unidos y Europa han identificado a la biofotónica como tecnologías de excepcional importancia para las economías basadas en el conocimiento. Globalmente, el valor del mercado de la biofotónica era de \$28 billones de dólares en 2013 y se espera un crecimiento de aproximadamente 11% entre 2014 y 2020. Se prevee que la biofotónica transforme el sector salud globalmente dado el envejecimiento de la población, alta incidencia de enfermedades crónicas, la necesidad reducir tiempos de recuperación y por lo tanto reducir costos de los procedimientos médicos.

Cabe mencionar que en México, la industria biofotónica no existe y la investigación en biofotónica se realiza en un buen número de instituciones, aunque de manera incipiente y no coordinada, de ahí que surge la necesidad de tomar acciones para impulsar esta temática en nuestro país ya que corremos el riesgo de retrasarnos aún más con respecto al resto del mundo. La idea de crear la red de biofotónica se originó como resultado de la reunión "Hacia dónde va la física en México" organizada por el CONACYT, la AMC y el CCC el 10 de abril 2015. La reunión se dividió en varias ramas de la física y uno de ellos fue óptica, donde participamos los siguientes investigadores: 1. Dr. Eugenio Méndez (CICESE), 2. Dr. Karen Volke-Sepúlveda (IF-UNAM), 3. Dr. Christopher Wood (IBT-UNAM), 4. Dr. Alfonso Lastras Martínez (IICO UASLP), 5. Dr. Alfred U Ren (ICN-UNAM), 6. Dr. Gabriel Ramos Ortiz (CIO) y 7. Dr. Rubén Ramos García (INAOE)

Uno de los acuerdo de dicha reunión, fue recomendar a los organizadores, el impulso de la biofotónica, entre otras áreas. Ahí mismo, se sugirió conformar la red de biofotónica. El Dr.

Gabriel Ramos Ortiz (CIO) y el Dr. Rubén Ramos García (INAOE), nos ofrecimos como los coordinadores de llevar a cabo dicha tarea.

El objetivo de establecer la Red Nacional de Biofotónica es conjuntar esfuerzos entre los investigadores mexicanos para impulsar el estudio y la aplicación de la luz en las ciencias de la vida, identificar áreas de oportunidad así como hacer más eficiente el uso de recursos disponibles en nuestros laboratorios. Esto implica establecer y estrechar colaboraciones de carácter interdisciplinario que fomenten la movilidad de estudiantes e investigadores. Así como explorar técnicas que pudieran tener un impacto en la medicina para obtener un mejor diagnóstico y tratamiento de ciertas enfermedades.

A finales del 2015 se hizo un llamado a la comunidad científica del País a participar en dicha red mediante envio de correos electrónicos. Posterior a la fecha de aprobación por CONACYT, en julio 2016, ha habido un creciente interés de participar en las actividades de la red de diversas partes del País, dado que la primera llamada no alcanzo a todos los investigadores del país trabajando en biofotónica en México.

La Red Temática de Biofotónica 2016 esta constituida por 198 miembros (119 Investigadores, 79 estudiantes). Los miembros se agruparon según su interés principal en una de las siguientes 9 áreas y coordinados por un miembro del CTA: 1) Pinzas ópticas y micromanipulación, Dr. Braulio Gutierrez Medina (IPICYT); 2) Propagacion de luz en medios altamente esparcidores y speckle laser imaging, Dr. Julio C. Ramirez San Juan INAOE); 3) Tomografía fotoacústica, fenómenos fototérmicos y biosensores, Dr. Crescencio García Segundo (CCADET UNAM); 4) Terapia fotodinámica, Dra Teresita Spezzia Mazzocco (INAOE) y Dra Eva Ramón Gallegos (ENCB-IPN); 5 Microscopía Óptica y Espectroscopia, Dr, Christopher Wood (LNMA-IBT UNAM); 6) Materiales para biofotonica, Dr. Gabriel Ramos Ortiz (CIO); 7) Cavitación, Dr. Francisco Perez Gutierrez (UASLP); 8) Procesado de Imágenes Médicas, Dr. Jousé Álvarez Borrego (CICESE); 9) Optica visual, Dr. David Iturbe Castillo (INAOE)

Uno de los objetivos de la Red Temática fue crear un documento del *Estado del Arte de la Biofotónica en México*. Se trata de un primer intento de evaluar el nivel de desarrollo de la disciplina en México. Los miembros del CTA que se responsabilizaron de cada capítulo consultaron a sus colegas y recabaron información con base en documentos publicados e información accesible por internet. Tanto ellos como el coordinador de la Red declaramos haber hecho nuestro mejor esfuerzo para ser lo mas incluyente posible, pero estamos conscientes de las limitaciones de este reporte. Ante las omisiones que seguramente cometimos, solicitamos a quienes fueron involuntariamente olvidados, nos contacten para subsanar las carencias en futuras versiones.

Dr Ruben Ramos García Coordinación de Óptica, INAOE Coordinador Red Temática de Biofotónica Puebla, Pue, Diciembre 2016

Contenido

Introducción: Biofotónica y la salud	6
1. Terapia fotodinámica (TFD)	
1.1 Introducción	9
1.1.1 Definición e historia	10
1.1.2 Mecanismo de acción de la TFD	10
1.1.3 Fotosensibilizadores	12
1.1.4 Terapia láser de bajo nivel (LLLT por sus siglas en inglés)	13
1.2 Mecanismos de muerte celular inducidos por la TFD	14
1.3 Aplicaciones diagnósticas y de tratamiento en México y en el mundo	15
1.3.1 TFD antitumoral	15
1.3.2 TFD antimicrobiana	15
1.3.3 Otras investigaciones sobre TFD en México	15
1.4 Avances tecnológicos en la TFD	17
1.4.1 TFD bifotónica	17
1.4.2 El uso de nanotecnología en la TFD	18
1.4.3 Identificación de genes involucrados en el proceso de TFD	19
1.5 Resistencia a la TFD	19
1.6 Análisis FODA	21
1.7 Consideraciones futuras	21
1.8 Conclusión	22
1.9 Referencias	22
2. Microscopía óptica y espectroscopía	28
2.1 Introducción	29
2.2. Estado del arte en el mundo	29
2.2.1 Microscopía confocal	29
2.2.2 Centros de servicio en microscopía	30
2.2.3 Interdisciplinaridad	30
2.2.4 Ciencia de transferencias	31
2.2.5 Optogenética	32
2.2.6 Microscopía espectroscópica para estudios moleculares	32
2.2.7 Nanoscopía	33
2.2.8 Microscopía de alto rendimiento	33
2.2.9 Microscopía Holográfica Digital y Cuantitativa de Fases	34
2.3. Estado del arte en México	34
2.4 Espectroscopía	38
2.4.1 Estado del arte en el mundo	38
2.4.2 Estado del arte en México	42
2.5 Referencias	43
3. Pinzas ópticas y micromanipulación	45
3.1 Introducción	46
3.1.1 Las pinzas ópticas aplicadas a la biología molecular	47
3.1.2. Las pinzas ópticas: Estado del arte en México	48
3.2 Manipulación celular con pinzas ópticas	49

3.3 Atrapamiento de micropartículas con fibra óptica.	51
3.4 Haces estructurados.	53
3.5 Microfluídica	56
3.6 Guiado óptico de proyecciones neuronales.	58
3.7 Estudio de sistemas dinámicos microscópicos	60
3.8 Pinzas plasmónicas.	63
4. Propagación de luz en medios altamente esparcidores y speckle laser imaging	65
4.1 Introducción	66
4.2 Técnicas de recuperación de propiedades ópticas	66
4.3 Óptica adaptiva en biofotónica	68
4.3.1 Estado del arte en el mundo	68
4.3.2 Microscopía de óptica adaptiva	68
4.3.3 Óptica adaptiva en visión	70
4.3.4 Estado del en México	71
4.4 Métodos de Monte Carlo	73
4.4.1 Situación actual en México: Problemas abiertos	74
4.5 Estado del arte de la tomografía de coherencia óptica	76
4.6 Speckle laser imaging (SLI)	78
4.6.1 Modelo teórico	79
4.6.2 Algoritmos para el cálculo de contraste de imágenes de SLI	80
4.6.2.1 Algoritmo espacial	80
4.6.2.2 Algoritmo temporal	81
4.6.2.3 Algoritmo espacio-temporal	81
4.6.4 Aplicaciones	82
4.7 Estado del arte en México	82
4.7 Estado del alte eli Mexico	02
5. Tomografía fotoacústica, fenómenos fototérmicos y biosensores	85
5.1 Tomografia fotoacústica	86
5.2 Imagenología Fototérmica y Fenómenos fototérmicos	90
5.3 Imagenología Infrarroja Médica	90
5.4 Terapia Fototérmica e Imágenes Fototérmicas	92
5.5 Resumen general	94
5.6 Instituciones se desarrollan actividades de investigación	94
6. Materiales para biofotonica	96
6.1 Aspectos Generales	97
6.2 Uso de Materiales en técnicas y dispositivos biofotónicos	98
6.3 Desarrollo de materiales y Biofotónica en México	103
6.4 Fortalezas y Retos en el desarrollo de materiales biofotónicos en México	113
6.5 Grupos de Trabajo de materiales y Biofotónica en México	113
7. Cavitación	114
7.1. Breve historia y desarrollo de la cavitación en el mundo	115
7.2 Tipos de Cavitación	115

7.3 Mecanismos de producción	116
7.3.1 Absorción lineal	116
7.3.2 Termocavitación	117
7.3.3 Partículas calentadas por láser	117
7.3.4 Absorción no lineal	117
7.3.5 Esfuerzo de tensión	117
7.4. Dinámica de las burbujas y métodos de detección	118
7.4.1 Video de alta velocidad	118
7.4.2 Imágenes resueltas en el tiempo	118
7.4.3 Transmitancia espacial modulada	119
7.4.4 Deflexión del haz de prueba	119
7.4.5 Interferometría Mach-Zehnder	120
7.4.6 Detección ultrasónica/acústica	120
7.5 Aplicaciones	120
7.5.1 Cirugía de córnea	121
7.5.2 Litotripsia	121
7.5.3 Medición de presión intraocular	121
7.5.4. Destrucción celular y tejidos	121
7.5.5.Propiedades mecánicas de fluidos, tejidos y células	121
7.5.6. Flujos inducidos por burbujas	121
7.5.7 Entrega de medicamentos	122
7.5.8 Formación de imágenes por ultrasonido	122
7.5.9 Facoemulsificación	122
7.6 Investigación de la cavitación en México	122
7.6.1 UNAM	122
7.6.2 CICESE	123
7.6.3 INAOE	124
7.6.4 UASLP	124
7.6.5. Dr. Leonardo Traversoni (Investigador independiente)	124
7.7 REFERNCIAS	124
8. Procesado de Imágenes	129
8.1 Introducción	130
8.2. Referencias	135
9. Optica Visual	139
9.1 Introducción	140
9.2 Situación nacional	140
9.3 Laboratorio Nacional de Optica de la Vision	141
-	

Introducción: Biofotónica y la salud

Dr. Celso Ramos García

Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública.

Actualmente México está atravesando por una transición demográfica y epidemiológica que tiene repercusiones en la salud de la población. Así, ha habido un incremento de las enfermedades crónicas y degenerativas como la hipertensión, la diabetes, una variedad de tumores, enfermedades neurológicas, etc., que afectan principalmente a las personas en edad productiva. Por otro lado, se creía que las enfermedades infecciosas y parasitarias habían dejado de ser un problema de salud pública, sin embargo las evidencias señalan que no solo se han incrementado diversas enfermedades infecciosas y parasitarias, sino también han aparecido nuevas enfermedades (emergentes) asociadas con la aparición de nuevos agentes patógenos y también la re-aparición de enfermedades que ya se habían controlado (re-emergentes) o la presencia de enfermedades que han persistido en la población (persistentes o enfermedades "olvidadas" o del rezago social) que por diversas razones ha sido difícil su control o erradicación y que generalmente están asociadas con diversos determinantes sociales como la pobreza, la precariedad de la vivienda, la falta de los servicios básicos (p.e. acceso al agua potable, la eliminación de la basura, etc.), y el acceso a la atención médica y los medicamentos.

Sin duda uno de los problemas relacionados con las enfermedades crónicas (no infecciosas) y las enfermedades infecciosas y parasitarias, es el diagnóstico temprano que permita una intervención médica adecuada y oportuna; generalmente en el caso de las enfermedades crónicas y degenerativas el diagnóstico es tardío y hace difícil su tratamiento. En algunas enfermedades como el cáncer cérvico-uterino (Cacu), existen herramientas de diagnóstico que pueden detectarla en las primeras etapas de la enfermedad, sin embargo muchas mujeres no asisten a los servicios de salud para la realización de los estudios de diagnóstico. Por otro lado, algunos procedimientos de diagnóstico son invasivos y poco sensibles y específicos, por lo que se requieren mejores herramientas que sean fáciles de realizar, que no sean costosas y que tengan una elevada sensibilidad y especificidad. Básicamente el diagnóstico de las enfermedades tanto crónicas y degenerativas como las infecciosas y parasitarias, se hace desde el punto de vista médico-clínico, epidemiológico y con herramientas inmunológicas y de biología molecular. Así, es común el uso de técnicas que permiten detectar anticuerpos contra diversos antígenos asociados con enfermedades crónicas y degenerativas, y también contra moléculas que distinguen a los agentes infecciosos y parasitarios. Las técnicas inmunológicas más comúnmente utilizadas se basan en marcar anticuerpos con fluoróforos (pe. Isotiocianato de fluoresceína) o enzimas que permiten detectar antígenos de parásitos y/o anticuerpos en fluidos biológicos o tejidos; su principal inconveniente es la reactividad cruzada (moléculas compartidas entre diversos parásitos). Actualmente es cada vez más común el uso de herramientas de biología molecular (p.e. amplificación de ácidos nucleicos a partir de diversos fluidos biológicos (p.e. suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, saliva, orina, etc.) y de tejidos (p.e. biopsias y necropsias); el uso de estas herramientas han sido de gran utilidad ya que son altamente sensibles y específicas, sin embargo son relativamente caras, se requiere personal calificado, equipo e infraestructura especializada para llevarlas a cabo. En algunas

infecciones virales es posible detectar el agente causal durante la fase de viremia (virus en sangre), sin embargo ésta puede ser de poca duración y la factibilidad de detectar los virus en sangre, es limitada; en algunos casos es posible detectarlos en las células y tejidos como sucede en la infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) que infecta linfocitos CD4+ o que se integra al genoma de las células, en otros casos como la infección por Trypanosoma cruzi (agente causal de la enfermedad de Chagas) es posible visualizar el parásito en la sangre durante la fase aguda (de corta duración y donde el tratamiento disponible puede eliminar el parásito) mediante técnicas parasitológicas convencionales que son poco sensibles y específicas; posterior a la fase aguda, aproximadamente un tercio de las personas infectadas evolucionan a la fase crónica (asintomática o sintomática) donde los parásitos infectan una variedad de células y permanecen allí, causando con el tiempo un proceso inflamatorio crónico asociado con alteración de la función de los tejidos u órganos (p.e. miocardiopatía chagásica crónica); en esta fase no existe tratamiento efectivo. En esta enfermedad en particular y en otras similares, es evidente que un diagnóstico temprano altamente sensible y específico, puede coadyuvar al tratamiento efectivo que permita la curación del paciente; en los casos crónicos sintomáticos el tratamiento convencional con medicamentos puede mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Las herramientas de diagnóstico altamente sensibles y específicas son de utilidad no solo para fortalecer la vigilancia epidemiológica de las enfermedades más comunes en una localidad o región, sino también en el caso de epidemias con alto potencial de riesgo internacional. Son notorios los casos de epidemias/pandemias que han ocurrido en este siglo como son el Síndrome Agudo Respiratorio Severo (SARS, 2003), influenza AH1N1 (2009), cólera (2010), ébola (2014) y más recientemente Chikungunya y Zika (2013- a la fecha); en algunas otras enfermedades causadas por virus a pesar de que existen herramientas de diagnóstico aprobadas por el Sector Salud, se requiere mejorar su sensibilidad y especificidad. El uso de mejores herramientas de diagnóstico se requiere también en la vigilancia de las enfermedades zoonóticas (transmisión de animales al hombre), en los viajeros internacionales, migrantes, puestos de control sanitario (calidad alimentaria) en puertos marítimos, aeropuertos y sitios de entrada terrestre (fronteras). Por otro lado, se requieren mejores herramientas de diagnóstico para la vigilancia de microorganismos resistentes a los medicamentos como sucede en la tuberculosis cuyo agente causal Mycobacterium tuberculosis, puede ser resistente a múltiples antibióticos (multi-drogo resistentes, MDR) o extensamente resistentes (XDR), situación que representa no solo un problema social y económico, sino también un verdadero problema de salud pública a nivel internacional. En los párrafos anteriores hemos señalado la necesidad de mejorar los procedimientos diagnósticos no solo para las enfermedades infecciosas y parasitarias, sino también para las crónicas y degenerativas y otros campos de la salud pública y la salud animal.

Ramos-García y cols, señalan que la biofotónica tiene por lo menos 3 grandes áreas de aplicación: el estudio de procesos orgánicos en seres vivos, el diagnóstico y el tratamiento de algunas enfermedades. Es claro que la terapia fotodinámica tiene un alto potencial para el tratamiento de algunos tumores en humanos, debido a su acción selectiva en células malignas sin afectar las células sanas, esta intervención contrasta con los efectos secundarios de la radioterapia y la quimioterapia. Si se asume que las células tumorales tienen un metabolismo diferente al de las células sanas, y que el foto-sensibilizador es

retenido mayor tiempo por las células malignas, la aplicación de la luz puede tener un efecto deletéreo en estas células. Este mismo efecto pudiera ocurrir en células infectadas con parásitos intracelulares como son los virus, protozoarios y algunas bacterias, por lo que el uso de la terapia fotodinámica en procesos infecciosos, es altamente prometedor; también es posible que su efecto sea efectivo no solo en células presentes en la circulación sanguínea, sino también en tejidos y órganos infectados. Si esto fuera posible, sería factible eliminar selectivamente linfocitos CD4+ infectados con el VIH sin afectar a las células sanas, del mismo modo que células cardíacas infectadas con Trypanosoma cruzi serían eliminadas sin afectar a las células sanas que rodean los nidos de amastigotes, al mismo tiempo la eliminación del parásito influiría en la disminución del proceso inflamatorio característico de la lesión cardíaca crónica. Este tipo de estudios se pueden realizar en modelos animales en ratones infectados con cepas cardiotrópicas de Trypanosoma cruzi. La eliminación de células infectadas en la fase crónica temprana o fase indeterminada de la infección, impediría el avance del proceso infeccioso (fase crónica sintomática), etapa en la que a pesar de la eliminación de las células infectadas sería difícil recuperar la función orgánica debido al daño tisular independiente de la presencia del parásito y/o sus productos.

Sin lugar a dudas la aplicación de las diferentes técnicas de la biofotónica requiere la participación de grupos multidisciplinarios para analizar su factibilidad de uso en situaciones biológicas particulares. De este modo, el uso de las pinzas ópticas se puede aplicar al estudio del tropismo celular y tisular de los microorganismos y entender con más detalle las interacciones de la célula susceptible con el parásito (interacción huésped-parásito), y el estudio de las moléculas de los parásitos que participan como ligando de moléculas receptoras en la membrana de las células susceptibles. Originalmente la terapia fotodinámica fue propuesta para el tratamiento del cáncer, sin embargo actualmente hay investigaciones que apoyan su uso en la terapia de algunas enfermedades infecciosas e inclusive su uso para controlar vectores (mosquitos) transmisores de una variedad de agentes patógenos. Evidentemente, el potencial de aplicación de la biofotónica en el campo de la salud pública, es altamente prometedor y lo constataremos en el futuro cercano con la participación de profesionales de diversas disciplinas.

Referencias

- Pinto JG, et al. Chlorin E6 phototoxicity in *L.major* and *L.braziliensis* promastigotes- in vitro study- Photodiagnosis Photodyn Ther 15: 19, 2016.
- Bacellar IO, et al. Photodynamic efficiency: From molelcular photochemistry to cell death. Int J Mol Sci. 16:20523, 2015.
- Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem Photobiol Sci 3: 436, 2014.
- Baptista MS, Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotheraphy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. Braz J Med Biol Res 44:1, 2011.
- Chang KP et al. New "light" for one-world approach toward safe and effective control of animal diseases and insect vectors from leishmanial perspectives. Parasites & Vectors 9: 396, 2016.
- Ramos-García R y cols. La biofotónica y tu salud. Ciencia (Revista de la Academia Mexicana de Ciencias) 67: 46, 2016.

1. TERAPIA FOTODINÁMICA

Dra. Teresita Spezzia Mazzocco. Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica Dra. Eva Ramón Gallegos Escuela de Ciencias Biológicas IPN Dr. Héctor Hugo Cerecedo Núñez Facultad de Fisica, Universidad Veracruzana Dra. Alma Reed Valor Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica Dr. Suren Stolik Isakina Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica Dr. Juan Manuel de la Rosa Vásquez Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica **Dr. Gabriel Ramos Ortiz** Centro De Investigaciones En Óptica, A. C. Dra. Dania Hernández Sánchez Graphenemex, S.A. de C.V.

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. Definición e Historia

La TFD es una técnica innovadora que lleva a la destrucción selectiva de células, a través de procesos biológicos activados por la luz. El desarrollo de la TFD se puede dividir en tres períodos, según los avances científicos significativos:

- 1. Período de los precursores (3000 a.C. 1957). En esta etapa se incluye la fototerapia con un hito en 1900. Oskar Raab estudiante del Prof. Hermann Von Tappeiner de la Universidad de Munich, encontraron que paramecios teñidos con naranja de acridina murieron cuando fueron colocados en zona muy iluminada. Posteriormente, encontraron que la naranja de acridina se volvía tóxica bajo iluminación visible. Usando este hecho, Von Tappeiner utilizó TFD para tratar carcinoma de piel. Niels Finsen demostró su utilidad en el tratamiento de viruela y lupus, lo que lo llevó a obtener el premio Nobel de medicina en 1903. En este período se utilizaba luz UVA y radiación solar, y se emplearon colorantes y hematoporfirina no purificada como fotosensibilizadores.
- 2. Período de los innovadores (1958-1975). Inició con el desarrollo del láser, que permitió entregar la luz de forma más eficiente, a través de una fibra óptica, y acoplarse a endoscopios para tratamientos intersticiales. Se han realizado estudios para entender el efecto de la luz sobre los tejidos y del desarrollo de equipos para la entrega de luz, se obtuvo un derivado de la hematoprofirina, el precursor del Fotofrin, se introdujo el uso de cultivos celulares, se proó la TFD en ensayos pilotos en ratones y humanos, lográndose un gran avance en el conocimiento de la respuesta tumoral a esta nueva terapia de reciente resurgimiento. Se confirmaron las hipótesis propuestas por los precursores.
- 3. Período emergente (1976 a la fecha). Este período inició con los estudios clínicos de Kelly y Snell, en 1976, y Dougherty et al., en 1978, quienes dieron la seguridad y confianza a la comunidad científica de la aplicación de la TFD para tratar el cáncer en humanos. A partir de estos trabajos se han desarrollado nuevos fotosensibilizadores, fuentes de luz, y con el apoyo de la biología molecular y la ingeniería genética se han dilucidado los mecanismos de respuesta celular, muerte celular inducida y resistencia a la TFD. Con el apoyo de la nanotecnología se han planteado estrategias para hacer llegar el fotosensibilizador de una forma más eficiente. Se ha establecido la TFD en varios países como opción de tratamiento para lesiones no malignas, premalignas y malignas con gran éxito. Además se han sumado a la investigación expertos de diferentes áreas como físicos, químicos, biólogos, médicos, etc. haciendo de la TFD una herramienta multidisciplinaria.

1.1.2. Mecanismo de Acción de la TFD

La TFD requiere de un Fotosensibilizador (FS), que por lo general es un colorante inocuo en ausencia de luz, que puede ser absorbido por las células o los microorganismos, una fuente de luz con una longitud de onda adecuada y la presencia de oxígeno en la célula. El colorante absorbe la luz y se excita, de tal manera que puede interactuar con el oxígeno

presente y producir compuestos de oxígeno muy reactivos, causando un estrés oxidativo. El estrés oxidativo representa un disturbio en el balance entre los prooxidantes (causantes del daño) y los antioxidantes, causando como consecuencia, la muerte celular.

La eficiencia de la TFD depende del tipo de Fotosensibilizador, la concentración del mismo y la localización intracelular, el tiempo de incubación, los parámetros de radiación (longitud de onda y densidad), la accesibilidad de oxígeno, generalmente se obtienen mejores resultados cuando el tejido tiene mayor vascularización. Así como también de la susceptibilidad de la estructura blanco, incluidos los mecanismos de defensa antioxidantes y de la suficiente penetración de la luz (Krammer 2014).

Los compuestos FSs poseen una configuración electrónica estable (**Figura 1**). Cuando el FS absorbe un fotón de una longitud de onda específica, ocurre un salto cuántico del electrón y la molécula es promovida a un estado de excitación inestable de corta duración (10⁻⁶ a 10⁻⁹). En este estado ocurren rápidamente varios procesos. El FS puede regresar al nivel bajo de energía a través de la emisión de un fotón en forma de fluorescencia, o por conversión interna con pérdida de energía en forma de calor. Alternativamente, la molécula puede excitarse al estado triplete (Lyon *et al.*, 2011) en un nivel de energía más bajo que el singlete, pero de mayor duración (microsegundos en lugar de nanosegundos).

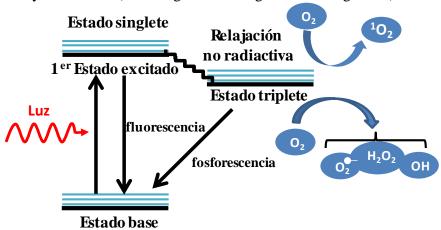


Figura 1. Diagrama típico de un Fotosensibilizador.

El estado singlete de excitación interactúa con el entorno molecular vía reacciones tipo I, mientras que el estado triplete interactúa a través de reacciones tipo II. Las reacciones tipo I permiten la formación de radicales libres a través de transferencia de hidrógeno o electrones, que reaccionan con el oxígeno y producen especies de oxígeno reactivo, tales como, peróxido o aniones de superóxido, los cuales atacan a los blancos celulares. Las reacciones tipo I producen oxígeno molecular en estado singlete y pueden causar daño directamente por la acción de los radicales libres (Lyon *et al.*, 2011; Cronin *et al.*, 2014). Bajo iluminación, el FS es excitado al primer estado de excitación. De ahí puede regresar al estado base mediante la emisión de un fotón (fluorescencia) o es posible que el electrón sea transferido no radiactivamente al estado triplete de la molécula. En el estado triplete, la molécula puede regresar al estado base mediante la emisión de un fotón de menor energía que el incidente (fosforescencia) o puede interactuar con moléculas del medio ambiente y producir agentes reactivos de oxígeno. Por ejemplo, el estado base del oxígeno molecular

 O_2 es el triplete y cuando reacciona con el FS en su estado triplete pasa al estado singlete (1O_2), el cual es altamente reactivo. Otros agentes reactivos pueden ser producidos, como iones superperóxidos, hidróxido, peróxidos de hidrógeno (O_2 , OH y H_2O_2). El efecto antitumoral de los agentes reactivos de oxígeno deriva en tres mecanismos: el efecto citotóxico directo sobre las células tumorales, daño en los vasos sanguíneos que irrigan al tumor y la inducción de una fuerte reacción inflamatoria con la respectiva respuesta inmunitaria. Los puntos decisivos para una TFD exitosa son: una apropiada oxigenación, buena distribución del FS y suficiente penetración de la luz.

1.1.3. Fotosensibilizadores

Los FS consisten en largos sistemas conjugados de dobles enlaces con un cromóforo al centro y cadenas auxiliares que son las responsables de las futuras delocalizaciones de electrones, alterando así los espectros de absorción de los FS. Estos usualmente son moléculas colorantes, orgánicas y aromáticas. Un FS efectivo típicamente debería ser altamente lipofílico, con mínima o ninguna toxicidad en oscuridad, bajo potencial mutagénico y alta estabilidad química. Deben tener la habilidad de acumularse preferentemente en el tejido o célula blanco y ser rápidamente eliminados para prevenir fotosensibilización prolongada. Usualmente se clasifican en cuatro grupos químicos: porfirinas, fenotiazinas, ftalocianinas y ácido aminolevulínico (Calzavara et al., 2012).

En la actualidad se están evaluando diversos compuestos naturales con propiedades Fotosensibilizadoras, ejemplo de estos son los trabajos de Dovigo *et al.*, (2011) quienes realizaron estudios *in vitro* sobre la suceptibilidad de *Candida* spp. hacia un pigmento denominado curcumin (408 y 430 nm). El pigmento de color amarillo fue extraído de rizomas de *Curcuma longa*, una planta utilizada como especie de cocina y como colorante. Es importante mencionar que aunque hay un número significativo de compuestos que pueden actuar como FSs, solo unos cuantos están aprobados para uso en humanos. Las porfirinas fueron las primeras en obtener la aprobación federal para uso clínico, en Canadá en 1993, seguido por otros países, incluida la FDA en Estados Unidos en 1995. Otros compuestos comerciales aprobados son: Porphyrins Levulan (Dusa Pharmaceuticals, Wilmington, DA, USA), Photophrin y Vysudine (QLT, Vancouver, BC, Canada), el precursor de porfirina ALA representado por Levulan y Metvix (Photocure ASA, Oslo, Norway), las clorinas Foscan (BioLitec Pharma, Jena, Germany) Photochlor (RPCI, Buffalo, NY, USA) y LS11 (Light Sciences, Snoqualmie, WA, USA).

Las consideraciones para la selección del FS adecuado incluyen: la penetración de la luz dentro del tejido biológico (el espectro rojo penetra 3.0 mm, y el espectro azul 1.5 mm) y la producción de pigmentos endógenos que pueden interferir con la absorción de la luz (p. ej. melanina de hongos dematiáceos causantes de cromoblastomicosis).

En la Tabla 1 se presentan los principales FSs del grupo de las porfirinas y sus principales aplicaciones clínicas para el tratamiento de enfermedades cancerosas.

Tabla 1. Principales FS del Grupo de las Porfirinas.

	1		upo de las i offici		
FS	MARCA	λ	VENTAJAS	APLICACIONES CLÍNICAS EN CANCER DE	
Polihematopor phyrin ester	Photofrin ®	630 nm	Alta efectividad, relativamente no tóxico	Cólon, gástrico, cervical, esófago de Barret (Moan and Peng, 2007, Triesscheijn et al., 2006), carcinomatosis peritoneal y sarcomatosis (Hahn et al. 2006)	
Derivados de hematoporfiri na (HpD)	Photoge m®	630 nm	Amplio rango de aplicación	piel, tracto digestive, gastrointestinal, vejiga, cervical y vaginal (Chissov et al., 1995)	
Polihematopor phyrin	Photosan ®	633 nm	Prometedorresulta do cánceres de cabeza	Piel y membranas mucosas, como fase II en tumors intracraniales (Maier et al., 2002)	
γ- Aminolevulinic acid (5-ALA)	Levulan ®	635 nm	Fácil aplicación y con buenos resultados cosméticos	Actinic keratosis (AK); carcinoma basal (Moan and Peng, 2007; Triesscheijn et al., 2006); vejiga, carcinomas cutaneous, afecciones no malignas de piel, próstata (Bayés and Rabasseda 2008)	
Methyl-ester 5- ALA (MAL)	Metvix®	635 nm	Buena penetración	Piel no melanoma, actinokeratosis, carcinoma basal, (Szeimies et al., 2002; Horn et al., 2003; PhotoCure ASA, 2002; Kramer and Plaetzer, 2008)	
Benzoporphyri n derivative (BPD); verteporfin	Visudyne ®	692 nm	-	degeneración macular aguda (AMD), neovascularización coroidea (CNV) (Tano, 2008; VIP report no. 1. Ophthalmology. 2001; Bressler, 2001)	

Fuente: Zawacka-Pankau et al, 2008.

1.1.4. Terapia láser de bajo nivel (LLLT, por sus siglas en inglés)

El resultado de condiciones de baja dosis de luz en la TFD da como resultado una terapia subletal que no llega a erradicar enfermedades. Condiciones que también se presentan en las capas internas o más profundas de los tejidos irradiados, en donde la luz llega en menor proporción que en la superficie. Sin embargo, la luz en dosis bajas sí tiene efectos benéficos importantes, ya que puede inducir reacciones fisiológicas favorables al interaccionar con estructuras y moléculas subcelulares. (Krammer 2014,).

La terapia láser de bajo nivel o LLLT por sus siglas en inglés, es una técnica novedosa que utilza dosis bajas de luz para el mejoramiento de la calidad de vida de las personas. Es especialmente útil para estimular la cicatrización, aliviar el dolor o la inflamación y para restaurar el funcionamiento. Los protones de la luz son absorbidos por los cromóforos de las mitocondrias de las células en la piel. Como consecuencia, se lleva a cabo el transporte de electrones, la liberación de óxido nítrico, trifosfato de adenosina, se incrementan las especies reactivas de oxígeno y se activan diversas vías de señalización internas. En este proceso se pueden activar las células madre permitiendo un aumento en la reparación del tejido y la cicatrización. En dermatología tiene efectos muy favorables para el rejuvenecimiento de la piel, disminuir cicatrices de acné o cicatrices hipertróficas, tratar la psoriasis y para la curación de quemaduras. Además, la LLLT puede reducir el daño ocasionado por la luz UV. En el tratamiento del vitíligo puede incrementar la pigmentación estimulando la proliferación de melanocitos y reducir la despigmentación inhibiendo la autoinmunidad (Avci et al., 2013).

Algunos reportes *in vivo* incluyen el tratamiento de problemas bucales, como la osteonecrosis de mandíbula (Minamisako et al., 2016), el tratamiento de bolsas periodontales. Pribac et al., 2016) y la mejora en la cicatrización después de extraer piezas dentales (Batinjan et al., 2013).

1.2 MECANISMOS DE MUERTE CELULAR INDUCIDOS POR LA TFD

A nivel molecular, la TFD induce mecanismos de muerte que dependen de la localización subcelular del FS en particular, así como de la dosis fotodinámica empleada. La distribución del colorante dentro de la célula es importante ya que dependiendo de la localización intracelular pueden desencadenarse procesos distintos de muerte celular. La carga del compuesto también es importante, ya que los compuestos con carga positiva se acumulan mejor en mitocondrias, a diferencia de los compuestos con carga negativa que prefieren los lisosomas. Algunos compuestos pueden penetrar y localizarse en más de un sitio. Además, los compuestos lipofílicos se unen mejor a las lipoproteínas (preferidas de células cancerosas), en cambio los compuestos hidrofílicos se unen mejor a proteínas como la albumina.

Los dos blancos de TFD mejor estudiados son, lisosomas (lyso-TFD) y mitocondrias (mito-TFD). Dependiendo no solo de la localización del Fotosensibilizador y de la cantidad de especies reactivas generadas, sino también de la respuesta de defensa celular general e inmediata a través de mecanismos antioxidantes. Las proteínas y los lípidos se oxidan, el DNA no parece dañarse, a excepción de que esté muy próximo a la membrana nuclear, muy pocos FSs pueden atravesar la membrana nuclear (Krammer et al., 1993). Esto soporta el poco efecto mutagénico que puede llegar a producir la TFD. La inducción de un daño mínimo es obviamente tolerado por las células o hasta puede presentarse un efecto de estimulación por algunos Fotosensibilizadores.

El efecto de los agentes reactivos de oxígeno deriva de tres mecanismos: el efecto directo sobre las células, el daño a los vasos sanguíneos que están cerca, con la consecuente disminución en el suministro de nutrientes y la inducción de una fuerte reacción inflamatoria con la que se promueve una mejor respuesta inmunitaria del cuerpo contra la células malignas. El fotodaño puede llevar a cualquiera de los métodos naturales de muerte celular: necrosis, autofagia o apoptosis.

La apoptosis o "muerte celular programada" es una forma de suicidio celular genéticamente definida, que puede ser activada por diversos factores, incluyendo el daño a estructuras subcelulares ocasionado por la producción de especies reactivas de oxígeno del proceso de TFD. La necrosis en cambio es un tipo de muerte ocasionado generalmente por lesiones celulares irreversibles. La célula opta por la apoptosis o la necrosis dependiendo del suplemento de energía intracelular disponible, ya que, la apoptosis es un proceso de gran consumo de energía dependiente de ATP o fuentes de alta energía (Berlanda et al., 2006). Si el daño es demasiado grave, la energía celular muy baja o se pierde la membrana citoplasmática, entonces la células optan por la necrosis. (Krammer et al., 2014). La inducción de la necrosis también es promovida por la permeabilidad de la membrana celular, la cual puede ocurrir por la localización del Fotosensibilizador en este sitio.

La autofagia es conocida como un proceso de autoreparación. Puede jugar un papel protectivo promoviendo la supervivencia celular después de una dosis de TFD sub-letal. Sin embargo, también puede promover la muerte celular cuando la apoptosis es inducida pero no se lleva a cabo debido a la ausencia de proteínas proapoptóticas como Bax y Bak (Reiners et al., 2010). O con la presentación de antígenos de respuesta inmune antitumoral (Mroz et al., 2010).

1.3 APLICACIONES DIAGNÓSTICAS Y DE TRATAMIENTO EN MÉXICO Y EN EL MUNDO

1.3.1 TFD Antitumoral

La terapia fotodinámica (TFD) está bien establecida como una modalidad de tratamiento clínico de diversas enfermedades, incluyendo el cáncer y sus lesiones premalignas, así como para la eliminación de infecciones por virus, bacterias y hongos tanto en humanos como en otros mamíferos. Incluso el efecto fotodinámico se ha empezado a utilizar en la industria para la esterilización de fluidos biológicos. Actualmente se usa como herramienta de diagnóstico para delimitar las células transformadas y para mejorar la respuesta de la terapia porque ayuda a realizar cinéticas de acumulación de los fotosensibilizadores.

Los países en los que se utilizan ambas modalidades en la clínica son: Japón, Canadá, Estados Unidos de Norte América, Italia, España, Rusia, Corea del Sur, China y países de latinoamérica como Brasil, Argentina, Chile, México, Venezuela, San José, Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, República Dominicana, El Salvador y Trinidad y Tobago entre otros, para tratar principalmente el cáncer de piel no melanómico y el esófago de Barret, y patologías no cancerosas como la queratosis actínica, degeneración macular y el acné.

En especial en México es utilizada para tratar una patología no cancerosa, la degeneración macular, en el hospital Conde de Valenciana desde el año 2001, el esófago de Barrett en los hospitales Manuel Gea González y el Instituto Nacional de Cancerología de la Secretaria de Salud Pública desde el 2008; y la queratosis actínica, carcinoma basocelular y con fines cosmetológicos en instituciones privadas como en el hospital San José del Tecnológico de Monterrey, Hospital Médica Sur y dermatólogos en sus consultorios en diferentes estados de la república. En el 2015 la cofepris autorizó la TFD para tratar el cáncer de próstata con la Terapia Fotodinámica Focalizada Vascular (VTP) de Tookad Soluble, de Steba Biotech laboratorios en Guadalajara. En la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, en asociación con instituciones de salud, ha implementado la terapia fotodinámica para el tratamiento de lesiones premalignas del carcinoma cervicouterino y/o infección del virus de Papiloma Humano (Auricchio 2007, Praxis 2008, Verdiguel et al., 2010, Franque 2008, Health-Tourism.com. 2013).

1.3.2 TFD Antimicrobiana

Los principales microorganismos blanco para la fotoactivación son las bacterias. No obstante, existe mucha diferencia en la efectividad de la aTFD entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las bacterias Gram positivas son sensibles a la fotoactivación (Koémerik et al., 2014). El efecto antibacterial se consigue por fotoinactivación mediado por substancias fotosensitivas con diferentes estructuras químicas (de carga positiva,

negativa y neutra). De forma contraria las bacterias Gram negativas son usualmente resistentes a la acción de FSs de carga negativa o neutra (Kasimova et al., 2002).

Esta discrepancia puede explicarse por las diferencias en la estructura de la pared celular. Las bacterias Gram positivas tienen una capa de peptidoglicano exterior y ácido lipoteicoico que aportan permeabilidad y permiten la penetración de los FSs a través de la membrana citoplasmática. La pared de las bacterias Gram-negativas es más compleja, hay una membrana externa compuesta de fosfolípidos de doble capa, con lipopolisacáridos por encima de la capa de peptidoglicano más delgada. La pared de las bacterias Gram negativas es solo ligeramente permeable para moléculas grandes e hidrofóbicas. Los compuestos con carga negativa no pueden penetrar la capa de lipopolisacáridos (Hamblin and Hasan 2004, Ryskova et al., 2010).

Algunas bacterias son naturalmente resistentes a las estructuras catiónicas, con lo que disminuye el efecto de inactivación mediada por FSs con carga positiva. Otras en cambio, pueden acumular porfirinas de forma natural, por lo tanto, pueden inactivarse utilizando solamente luz a ciertas longitudes de onda (Hamblin et al., 2005).

Son muchos los estudios que confirman la inactivación bacteriana con diferentes FSs *invitro* Uliana et al., 2014, Gerola et al. 2011, Hakimiha et al., 2014, Alvarenga et al., 2015. Y existen diversos reportes clínicos que ratifican la eficiencia de la aTFD *in vivo*, especialmente con bacterias dentales (Bassetti et al., 2013, Tennert et al., 2014).

Así mismo, la eficiencia de la aTFD se ha confirmado también para hongos patógenos *in vitro* (Spezzia et al., 2016, Baltazar et al., 2013, Nunes et al., 2014, Lyon et al., 2011 Prates et al., 2013) e *in-vivo* (Smijs et al., 2014, Tardivo et al., 2015, Yang et al., 2012). Y se han estudiado las propiedades antivirales de la aTFD en la esterilización de paquetes celulares sanguíneos. Comprobando que es posible inactivar a los virus de la Hepatitis A y B, VIH, parvovirus, virus del Nilo Occidental, Herpes virus, y al Adenovirus (Costa et al., 2012). Por último, aunque en menor medida también existen reportes de la aplicación *in vitro* de la aTFD para protozoos como Plasmodium y Leismania [Aureliano et al., 2014, Santus et al. 1998, Ben-Hur et al, 1995, Pinto et al., 2016, Asilian et al., 2006, Bristow et al., 2006). Y algunos estudios en animales contra protozoos como *Tritrichomonas foetusafter* (Machado et al., 2014) e *Ichthyophthirius multifiliis* (Häder et al, 2016).

1.3.3 Otras investigaciones sobre TFD en México

La investigación en ésta área ha crecido considerablemente en los últimos años en México, a partir de 1999 Eva Ramón en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN realizó estudios para determinar y cuantificar la presencia de delta-ALA en líneas celulares de cáncer cervicouterino. A partir de entonces la Dra. Ramón y su grupo han publicado varios artículos de estudios relacionados con el uso de este Fotosensibilizador en el tratamiento de cáncer cervicouterino a través de la TFD. Para el 2007 reportaron la expresión de genes involucrados en la biosíntesis del heme sobre la TFD, la utilización de nanopartículas de oro con Protoporphyrin IX y su caracterización. También han trabajado en el estudio de la cinética de la incorporación intracelular de nuevas ftalocianinas sintetizadas en México, en la inspección de microtopografia y análisis fractal de neoplasias de piel y en el efecto promotor del butirato sódico para modular la expresión de genes en la TFD. Algunos

caracterizaciones las realizaron en colaboración con el Dr. Suren Stolik y el Dr. Juan Manuel de la Rosa (ESIME-IPN).

Por su parte, el grupo del Dr. Juan Manuel de la Rosa y del Dr. Suren Stolik, han trabajan desde el año 2011 en el diseño y fabricación de diversos equipos ópticos con aplicaciones biomédicas, entre los que se incluyen: Un sistema de fotoirradiación *in vitro* para la aplicación de TFD en cultivos celulares, un sistema de caracterización de tejidos de piel mediante reflectancia difusa resuelta espacialmente, sistemas para obtener patrones de fotoirradiación intersticial, entre otros. (ref)

En 2013 la Dra. Eva Ramón y su grupo empezaron un proyecto multicéntrico (Conacyt 147085) para aplicar la TFD utilizando delta-ALA en un grupo piloto de mujeres con lesiones premalignas del cérvix uterino y/o infectadas con el VPH en los estados de Oaxaca, Veracruz y CDMX, con resultados muy alentadores, ya que en promedio 8 de cada 10 mujeres eliminaron el virus de la VPH.

Recientemente la técnica de TFD se ha comenzado a aplicar en estudios para el control de microorganismos. A partir del 2015 el grupo del Dr. Cerecedo Núñez de la Universidad Veracruzana, han trabajado con la eliminación de hongos patógenos de plantas utilizando luz ultravioleta. Y en cultivos *in vitro* de hongos utilizando luz verde y eosina como Fotosensibilizador. En este mismo período, la Dra. Teresita Spezzia Mazzocco y su grupo, del INAOE-Puebla han trabajado con terapia fotodinámica antimicrobiana aplicada a cultivos *in vitro* de hongos dermatofitos utilizando azul de metileno como Fotosensibilizador. Finalmente, existen varios grupos de investigación que muestran interés por estas técnicas, como el grupo de la Dra. Guadalupe Delgado (CIBIOR-IMSS) quienes están iniciando investigaciones para utilizar la TFD en líneas celulares de cáncer de mama.

1.4. AVANCES TECNOLÓGICOS EN LA TFD

1.4.1 TFD Bifotónica

Un problema de la TFD es la baja penetración de la luz visible en los tejidos, esto debido a la absorción y dispersión de la luz haciendo que esta terapia no pueda aplicarse en tumores muy grandes, sin embargo, la absorción de la luz es mucho más baja en la región infrarroja cercana (NIR) que está entre 700-1300 nm, la cual es llamada la ventana óptica de los tejidos biológicos (Ogawa y Kobuke, 2008). En la década de 1990 la TFD con absorción bifotónica en inglés two-photon excited photodynamic therapy (2PE-TFD) fue propuesta por Bhawalkar et al., (Bhawalkar et al., 1996), se basa en la excitación de una molécula con un primer fotón desde su estado fundamental hasta un estado excitado intermedio virtual, después un segundo fotón, absorbido simultáneamente, promueve la molécula desde el estado intermedio virtual hasta el estado excitado singulete, la probabilidad de este evento es muy pequeña, y es proporcional al cuadrado de la intensidad de la luz, así la absorción de dos fotones sólo se produce en el plano focal de un haz láser estrechamente enfocado. Es importante mencionar que los estados excitados alcanzados de las moléculas por absorción de uno y dos fotones son idénticos. Las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del fotosensibilizador no son afectadas por el modo de excitación (Goyan y Cramb 2000, Samkoe et al., 2006).

Actualmente se están realizando estudios *in vitro* e *in vivo* principalmente con 3 estrategias: 1) fotosensibilizadores dímeros de porfirinas conjugados con grupos piridil catiónicos, 2) derivados de porfirinas acoplados a cromóforos 2PA, y 3) fotosensibilizadores 2PA encapsulados en nanopartículas. Estas tres estragias son prometedoras para la aplicación de la 2PE-TFD en pacientes (Bhawalkar 1996, Goyan Y Cramb 2000, Ogawa y Kobuke 2008, Samkoe et al., 2006).

1.4.2 El uso de nanotecnología en la TFD

La irrupción de la nanotecnología en las ciencias de la salud ha dado lugar a una nueva disciplina denominada Nanomedicina, que quizá sea la rama de la nanotecnología con mayor proyección en el futuro inmediato debido a sus importantes aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas. Nanotecnología se define como el proceso de separación, consolidación y deformación de los materiales por átomos o moléculas (Khurshid et al., 2015). Mientras que la Nanomedicina se define como el monitoreo, reparación, construcción y control de sistemas biológicos humanos en un nivel molecular y que se interconectan a nivel micro para interaccionar en el nivel celular, implementando nanodispositivos y nanoestructuras (Bogunia-Kubik et al., 2002). Considerando que los sistemas vivos están gobernados por comportamientos moleculares a nanoescala donde las piedras angulares de la vida (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, etc.) cuentan con propiedades determinadas por su tamaño, por dar un ejemplo, la hidroxiapatita (el mayor componente inorgánico del hueso) tiene un tamaño entre 2-5 nm de grosor y una longitud de 50 nm, mientras que el colágeno (el principal componente orgánico del hueso) es una triple Hélix de 300 nm de longitud, 0.5 nm de grosor y una periodicidad de 67 nm (Ayad et al., 1994, Kaplan et al., 1994, Park et al, 1992). En comparación con los métodos convencionales, los sistemas creados en nanomedicina pueden ser diseñados mediante ingeniería de los materiales, de tal manera que cuenten con múltiples funciones integradas en un solo sistema. De acuerdo al registro mantenido por clinicaltrials.gov (E.U.A) hasta el 2014 se registraron un total de 1,575 formulaciones en nanomedicina, de las cuales alrededor de 1,381 se reconocieron para terapia contra el cáncer (Liu et al., 2011, Kim et al., 2008, Wicki et al., 2015).

El uso de las nanopartículas (Np) como portadoras de fotosensibilizadores tiene un papel importante como intermediario activo en el proceso de la terapia fotodinámica. Por lo tanto, la Np en la TFD se clasifican por su función en dos clases: como portadoras pasivos y activas para la excitación del FS. Como portadores pasivos pueden ser sub-clasificados por la composición del material con base en polímeros biodegradables y no biodegradables, por ejemplo NP de cerámica y metálicas; y se denominan activas por el mecanismo de activación en la terapia favoreciendo el proceso de excitación del FS como es el caso de su acoplamiento a moléculas antenas para su transferencia de energía (Chatterjee et al., 2008). Nanohíbridos de grafeno como agentes fotosensibilizadores de tercera generación para Terapia Fotodinámica (TFD). Como se conoce, la eficiencia de la TFD depende en gran medida de las propiedades fotoquímicas, fotobiológicas y farmacocinéticas de los agentes Fotosensibilizadores (FS), los cuales a lo largo del tiempo han sido purificados, modificados y catalogados en tres generaciones, cada una en vías de mejorar la eficiencia de la TFD, donde la Nanotecnología surge como una potencial herramienta que abre un campo de grandes oportunidades de mejora.

Los sistemas nanoestructurados en sus diferentes modalidades han llevado a la aparición de la tercer generación de FS, para ser fotoactivados a mayores longitudes de onda, que generen menor fotosensibilidad y aún más importante, que sean más específicos. Esta tercer generación consiste en la modificación de los FS pre- existentes ya sea con conjugados biológicos (péptidos/ anticuerpos) (Hudson et al., 2005), o bien conjugados o encapsulados en sistemas de transporte (Taquet et al., 2013, Sasidharan et al. 1990).

En los últimos años y gracias a sus especiales propiedades ópticas, electrónicas y mecánicas, los nanomateriales de dos dimensiones (2D) han sido estudiados para múltiples aplicaciones biomédicas. Dentro de estos nanomateriales 2D, el Grafeno surge como el material más poderoso para diversas aplicaciones. En el laboratorio de Nanoestructurados Multifuncionales del Instituto de Física, Laboratorio de Termofluídos de la Facultad de Ingeniería y Laboratorio de Bioquímica, Patología y Microbiología de la Facultad de Estomatología de la U.A.S.L.P., se desarrollaron y probaron materiales Nanohíbridos de grafeno (Hernández et al., 2016), que han demostrado una gran capacidad de producción de oxígeno singulete, absorción en toda la región del espectro UV-vis-IR, proyectando el aumento considerable de la penetración de luz hacia los tejidos. Finalmente en estudios in vitro se ha demostrado su eficiencia en la Inactivación Fotodinámica de Candida spp. Esta investigación se llevó a cabo por medio del proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT 166014 y se busca en una siguiente etapa en estrecha colaboración con la empresa Graphenemex, S.A. de C.V., el desarrollo de un prototipo para su validación en ambientes operativos simulados y en ambientes reales para TFD y para el diseño de nanosensores para diagnóstico médico.

1.4.3 Identificación de genes involucrados en el proceso de TFD

La expresión de varios genes y proteínas se encuentran alterados después de la inducción de apoptosis por TFD, dependiendo de la línea celular, el protocolo seguido y el tiempo transcurrido después del tratamiento. Se ha demostrado que en el tratamientos de carcinomas en humanos se pueden presentar activación y desactivación de genes de regulación concernientes a la apoptosis, citoesqueleto, y a la unión celular, al estrés oxidativo, proliferación y ciclo celular, señalización de proteína quinasa activadas por mitógenos, transporte de proteínas, metabolismo energético y otros. (Sanovic et al., 2009, Krammer y Verwanger 2014, Ishikawa et al., 2013, Merchant y Korbelik et al., 2013). Silva et al., estudiaron el efecto de la Photodithazine® en ratas a las que se les provocaron tumores de cáncer de mama y los resultados mostraron una expresión diferente en 20 genes entre los grupos tratados con TFD y los controles (Silva et al. 2014, Silva et al., 2016). Franco et al., (2014) estudiaron la expresión de genes en tratamientos peridontales con TFD y mostraron una sobreexpresión de los genes RANK, OPG y FGF2, éste último tiene un papel importante en el proceso de reparación periodontal. También en microorganismos tratados con TFD se han detectado cambios en la expresión de genes (Rapacka-Zdonczyk et al., 2014, Sharon et al., 2009).

1.5 RESISTENCIA A LA TFD

Es posible que las células desarrollen resistencia basada en las dosis del FS más que en las dosis de luz utilizadas. Sin embargo, aún no se han identificado características celulares que pronostiquen la resistencia a la aTFD. Los mecanismos por los cuales las células tratadas se pueden volver resistentes están principalmente relacionados a la biodisponibilidad del FS y

al mecanismo de desintoxicación de las especies reactivas de oxigeno generadas. Entre las características relacionadas con la resistencia a la TFD se pueden mencionar: la expresión de p-glicoproteína, la anulación de la apoptosis y la autofagia, la inducción de sistemas de defensa antioxidantes, la inducción de cambios en las proteínas de choque térmico en el citoesqueleto y la adhesión, la inducción de ciclo-oxigenasas, la producción de óxido nítrico, la expulsión del colorante de la célula y la hipoxia [Casas et al., 2011; Tegos y Hamblin 2013].

Los mecanismos de resistencia observados que puede desarrollar un tumor a la TFD dependen de varios factores, tales como, el Fotosensibilizador usado, en su estructura y absorción, en la inactivación aumentada de las especies reactivas de oxigeno por enzimas antioxidantes, en la activación de proteínas de choque térmico, inducción de genes de respuesta al estrés después de la TFD, hipoxia celular por daño vascular y aumento en la reparación de lesiones inducidas por la TFD. (Roblero y Ramón 2015)

Algunos genes de choque térmico que pueden sobreexpresarse como respuesta a la TFD en células de cáncer son: HSP27, HSP34, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110. También se sabe que proteínas reguladoras de glucose GRPS (GRP74, GRP78, GRP94 y GRP100) y hemo oxigenasas, están involucradas en la protección celular al fotodaño (Gallagher et al., 2015).Ramón et al., 2015, encontraron que en líneas celulares resistentes a la delta-ALA-TFD el contenido de melanina intracelular era mayor que el de sus respectivas líneas de origen.

Algunos microorganismos emplean mecanismos de expulsión de fármacos. Estos mecanismos incluyen a un facilitador de superfamilias que transporta los químicos utilizando gradientes electroquímicos a través de la membrana plasmática y los expulsan fuera de la célula. Otros utilizan "cassettes" de *unión* al *ATP*, que llevan a la hidrólisis. La capacidad de algunas levaduras y bacterias para formar biopelículas también representa un mecanismo de resistencia al tratamiento. Así como la sobreexpresión de proteínas de choque térmico y la producción de compuestos intracelulares como la melanina (Baltazar 2015).

Por el contrario, algunos estudios han demostrado que ciertas líneas celulares humanas, no cambian sus niveles de sensibilidad al ser sometidas a ciclos repetidos de TFD (Singh et al., 2001). En células bacterianas Tavares y colaboradores (2010) confirmaron que *Vibrio fischeri* y *Escherichia coli* utilizando Tri-Py+-Me-PF como FS, no desarrollaron resistencia a la fotoactivación aún después de 10 generaciones de células parcialmente fotosensitizadas.

Tabla 2. Análisis Foda: Terapia Fotodinámica en México

Tabla 2. Analisis Foda: Terapia Fotodinamica en Mexico					
FORTALEZAS	Método eficiente				
	Relativamente barato				
	Pocos efectos secundarios				
	Método mínimamente invasivo				
	Poco desarrollo de resistencia al tx				
	Fácil aplicación				
DEBILIDADES	• Dificultad para persuadir a los médicos en la				
	experimentación				
	Limitación de aplicación al alcance de la luz				
	Tratamiento localizado				
	Aún no se han realizado grandes ensayos clínicos				
	aleatorizados				
	Se requiere entrenamiento especial para poder mover				
	variables como: tipo y dosis del fotosensibilizador, λ, tiempo				
	"intervalo droga-luz" y concentración de oxígeno				
	Conocimiento incipiente del proceso molecular				
OPORTUNIDADES	• Existe una amplia gama de áreas poco explotadas para				
	investigación científica y/o aplicación médica en TFD (muchos				
	tipos de cáncer aún no se consideran o estudian, al igual que				
	muchas infecciones microbianas, incluyendo bacterias,				
	protozoarios y hongos que afectan humanos, animales y/o				
	plantas, igual que para los virus.				
	Desarrollo de nuevas tecnologías, materiales y/o				
	fotosensibilizadores apoyadas por sistemas nanoestructurados.				
	Buscar la vinculación estratégica entre centros de				
	investigación y la industria para del diseño y desarrollo de				
	aplicaciones.				
AMENAZAS	Falta de conocimiento				
	Perder la oportunidad de desarrollar líneas de investigación				
	en un área que está a la vanguardia a nivel mundial.				
	 Disminución en el presupuesto para la investigación. 				

1.6 CONSIDERACIONES FUTURAS

Desde 1976 que Kelly y Snell aplicaron la TFD en un grupo de pacientes y de 1993 que la FDA aprobó el primer fotosensibilizador, la Terapia Fotodinámica ha pasado de ser una terapia prometedora a una terapia de uso rutinario en algunos países como es en Japón, Alemania e Inglaterra que la han incluido en sus servicios de salud públicos. A pesar de sus ventajas sobre los tratamientos actuales, la TFD está aún por lograr la aceptación clínica general y falta mucho por hacer para que tenga un uso generalizado y citando a Triesscheijin *et al.*, 2006, esto puede deberse a los siguientes factores en los cuales hay un nicho de oportunidades de mejora: 1) Es difícil persuadir a los médicos clínicos a utilizar una nueva terapia cuando los tratamientos tradicionales aún dan respuesta, aunque ésta sea parcial. En esta parte el resultado de los ensayos clínicos a través del tiempo ayudará a que estos se convenzan. 2) el precio de los sistemas láseres encarece la terapia, esto se resolverá mediante la fabricación de sistemas con nueva tecnología que abaraten estos equipos, 3)

Uno de los principales inconvenientes para utilizar la TFD como tratamiento de primera línea es que aún no se han realizado los grandes ensayos clínicos aleatorizados, los cuales deben hacerse en los diferentes países para la aprobación de la terapia por los organismos regulatorios 4) Dar un entrenamiento especial al médico o biomédico para aplicar la TFD y poder mover variables como: tipo y dosis del fotosensibilizador, longitud de onda a irradiar, intervalo de tiempo entre la administración del fotosensibilizador y la irradiación llamado "intervalo droga-luz" y concentración de oxígeno en el tejido a tratar. Esto último no es tan sencillo y sólo se resolverá cuando se conozca la biología molecular de la terapia la cual está aún incipiente. Existen varias propuestas interesantes para resolver las limitaciones de la TFD como por ejemplo: la TFD bifotónica (2PE-TFD), TFD metronómica, TFD con luz de día, generación de fuente de luz endógena para la TFD (Stem-Cell-TFD), combinación de la TFD con otras terapias y uso de la TFD como vacuna, desarrollo de sondas moleculares de fotoactivación (switch), diseño de nuevos fotosensibilizadores con mayor capacidad de generación de estados tripletes mediante bioinformática. Éstas aunque tienen resultados alentadores en condiciones in vitro muestran un gran potencial de mejora de la TFD convencional (Agostinis et al., 2011, Triesscheijin 2006).

Además existen mejoras en diversos campos de acción, incluyendo el uso de nanopartículas como vehículos para químicos terapéuticos o diagnósticos, la selección del blanco, terapia génica, marcaje celular, etc. A la par, el estudio y la utilización de liposomas para incorporar FSs lipofílicos, permiten la solubilidad de los FS y facilitan la penetración a la célula (Nombona, *et al.*, 2012).

1.7 CONCLUSIÓN

La PDT es una terapia con características propias, que está tomando gran relevancia en todo el mundo como tratamiento alternativo a diferentes enfermedades. En México son aún pocos los grupos que estudian los procesos y aplicaciones de esta terapia. Sin embargo, existen ya resultados prometedores. Además, en la actualidad ya se aplica en el país como tratamiento en algunos hospitales públicos para tratar enfermedades premalignas y contra algunos tipos de cáncer. También en varias clínicas privadas para fines cosméticos. La diversidad de usos y aplicaciones y las ventajas inminentes de esta técnica permitirá que en el país se desarrollen y/o crezcan diversas líneas de investigación, desde el estudio del efecto de la interacción de la luz con los tejidos biológicos, el uso de la técnica en una gran variedad de enfermedades tanto humanas como veterinarias y posiblemente también para tratar problemas agronómicos, hasta el uso de nanomateriales y nanopartículas.

1.8 REFERENCIAS

Alvarenga LH, Prates RA, Yoshimura TM, Kato IT, Suzuki LC, Ribeiro MS, Ferreira LR, Pereira SA. Martineza EF, Saba-Chujfi E. 2015. Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm can be inactivated by methylene blue-mediated photodynamic therapy. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy **12:**131-135.

Asilian A, Davami M. 2006. Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. Clinical and Experimental Dermatology **31:**634-637.

Aureliano DP, Ribeiro MS, Lindoso JAL, Pogliani FC, Sellera FP, Song D, Baptista MS. 2014. "Treatment and control of leishmaniasis using photodynamic therapy". In:

Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment. Claborn DM (Ed) 393-412.

Auricchio R. 2007. www.estetica-medicina.com.ar/fotodinamica.htm. Digital, M. (2009 йил 24-05). Diario de la Salud Medicina Digital. Retrieved 31 йил 2012-01 from http://medicinadigital.com/index.php/medicamentos/12572-demuestra-la-terapia-

fotodinamica-su-exito-en-pacientes-con-cancer-de-esofago-y-barrett.html.

Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, Hamblin MR. 2013. Low-Level Laser (Light) Therapy (LLLT) in Skin: Stimulating, Healing, Restoring. Semin Cutan Med Surg 32:41-52 Frontline Medical Communications.

Ayad, L. 1994. The extracellular factsbook (New York Plenum).

Baltazar L, Ray A, Santos D, Cisalpino P, Friedman A, Nosanchuk J. 2015. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. Frontiers in Microbiology **6:**202.

Baltazar L, Soares BM, Carneiro HC, Thiago Vinícius Ávila TV, Ferreira-Gouveia L, Souza DG, Lucas-Ferreira MV, Pinott M, Santos DA, Silva-Cisalpino P. 2013. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum: in vitro* activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **13:**354–361.

Bassetti M, Schär D, Wicki B, Eick S, Ramseier CA, Arweiler NB, Sculean A, Salvi GE. 2013. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: 12-month outcomes of a randomized controlled clinical trial. Clinical Oral Implants Research 25:279–287.

Batinjan G, Zore IF, Rupić I, Jurič IB, Zore Z, Pandurić DG. 2013. Assessing Health-Related Quality of Life with Antimicrobial Photodynamic Therapy (ATFD) and Low Level Laser Therapy (LLLT) after Third Molar Removal. Journal of Lasers in Medical Sciences **4**(3):120-126.

Ben-Hur E, Geacintov NE, Studamire B, Kenney ME, Horowitz B. 1995. The effect of irradiance on virus sterilization and photodynamic damage in red blood cells sensitized by phthalocyanines. Photochemistry and Photobiology **61:**190-5.

Berlanda J, Kiesslich T, Oberdanner CB, Obermair FJ, Krammer B, Plaetzer K. 2006. Characterization of apoptosis induced by photodynamic treatment with hypericin in A431 human epidermoid carcinoma cells. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology **25**(1-2):173–188.

Bhawalkar JH. 1996. Nonlinear multiphoton Processes in Organic and Polymeric Materials. Reports on Progress in Physics **59**:1041-1070.

Bogunia-Kubik K., M. Sugisaka / BioSystems. 2002, 65, 123.

Bristow CA, Hudson R, Paget TA, Boyle RW. 2006. Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy **6:**162-167.

Casas A, Perotti C, Di-Venosa G, Batlle A. 2011. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. Current Medicinal Chemistry **18:**2486–2515.

Calzavara-Pinton P, Rossi MT, Sala R, Venturini M. 2012. Photodynamic Antifungal Chemotherapy. Photochemistry and Photobiology **88:**512–522.

Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. 2008. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. Advanced Drug Delivery Reviews **60**(15):1627-37.

Costa L, Faustino MAF, Neves MGPMS, Cunha A, Almeida A. 2012. Photodynamic Inactivation of Mammalian Viruses and Bacteriophages. Viruses **4:**1034-1074.

Cronin L, Moffitt M, Mawad D, Morton O, Lauto A, Stack C. 2014. An *in vitro* study of the photodynamic effect of rose bengal on *Trichophyton rubrum*. Journal of Biophotonics **7**:410–417.

Dougherty T. J, Kaufman J. E, Goldfarb A, Weishaupt K. R, Boyle D, Mittleman A. 1978. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Research **38**:2628–2635.

Dovigo N, Pavarina A, Ribeiro A, Brunetti I, Costa C, Jacomassi D, Bagnato V, Kurachi C. 2011. Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*. Photochemistry and Photobiology. **87**:895–903.

Franco EJ, Robert, Pogue RE, Henrique L, Sakamoto T, Lemos L, Cavalcante M, de Carvalho DR, Andrade RV. 2014. Increased expression of genes after periodontal treatment with photodynamic therapy. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 11:41-47.

Franque M. 2008. Salvavidas para cáncer a la piel. El Mercurio de Valparaiso, S.A.P. Chile. Crean terapia contra el cáncer de próstata. http://www.excelsior.com.mx/nacional/2015/12/14/1063270.

Gallagher-Colombo SM, Finlay JC, Busch TM. "Tumor Microenvironment as a Determinant of Photodynamic Therapy Resistance". In: Resistance to Targeted Anti-Cancer Therapeutics. Valentina Rapozzi, Giulio Jori (Eds). Editorial Springer, 2015, Los Angeles (USA).

Gerola AP, Santana A, Polyana B. Franc PB, Tayana M. Tsubone TM, de-Oliveira HPM, Caetano W, Kimura E, Hioka N. 2011. Effects of Metal and the Phytyl Chain on Chlorophyll Derivatives: Physicochemical Evaluation for Photodynamic Inactivation of Microorganisms. Photochemistry and Photobiology **87**:884–894.

Goyan RL, Cramb DT. 2000. Near-infrared two-photon excitation of protoporphyrin ix: Photodynamics and photoproduct generation. Photochemistry and Photobiology **72**: 821-827.

Häder DP, Schmidl J, Hibbing R, Oberle M, Wedekind H, Richter PR. 2016. Treatment of ichthyophthiriasis with photodynamically active chlorophyllin. Parasitology Research **115:**1509–1517.

Hamblin MR, Hasan T. 2004. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochemical & Photobiological Sciences **3:**436–450.

Hamblin MR, Viveiros J, Yang CH, Ahmadi A, Ganz RA, Tolkoff MJ. 2005. Helicobacter pylori accumulates photoactive porphyrins and is killed by visible light. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **49**:2822-2827.

Hakimiha N, Khoei F, Bahador A, Fedrazad R. 2014. The susceptibility of Streptococcus mutansto antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources. Journal of Applied Oral Science **22:**80-4.

Health-Tourism.com. (2013). http://www.health-tourism.com. From Health-Tourism.com. Medical tourism guide.

Hernández D, Scardamaglia M, Saucedo S, Bittencourt C, Quintana M. 2016. RSC Adv 6:6663

Hudson R, Carcenac M, Smith K, Madden L, Clarke OJ, Pelegrin A, Greenman J, Boyle RW. 2007. Br. J. Cancer 92:1442.

Ishikawa T, Kajimoto Y, Sun W, Nakagawa H, Inoue Y, Ikegami Y, Miyatake SI, Kuroiwa T. 2013. Role of Nrf2 in Cancer Photodynamic Therapy: Regulation of Human ABC Transporter ABCG2. Journal Of Pharmaceutical Sciences **102**(9):3058-3069.

Kaplan, F.F, Hayes, W.C., Keaveny, T.M., Einhorn, A., Iannotti, J.P. 1994. AAOS Instr cours lec.

Kasimova KR, Sadasivam M, Landi G, Sarna T, Hamblin MR. 2002. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal Photosensitization Journal of Applied Microbiology **92:**618-623.

Khurshid Z, Zafar M, Qasim S, Shahab S, Naseem M, Reqaiba AA, Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. 2015. Journal Control Release **200**:138.

Kim J, Lee JE, Lee SH, Yu JH, Lee JH, Park TG, Hyeon T. 2008. Adv. Mater. 20:478.

Krammer B, Hubmer A, Hermann A. 1993. Photodynamic effects on the nuclear envelope of human skin fibroblasts. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 17(2):109–114.

Krammer B, Verwanger T. 2014. "Molecular Biological Mechanisms in Photodynamic Therapy". In: Photodynamic Therapy. Abdel-Kader MH (Ed), Springer-Verlag Berlin 35-46.

Koémerik N, Wilson M. 2014. Potentiation of photoinactivation of Gram-positive and Gram negative bacteria mediated by six phenothiazinium dyes by addition of azide ion. Photochemical & Photobiological Sciences **13**:1541–1548.

Liu Z, Robinson JT, Tabakman SM, Yang K, Dai H. 2011. Mater. Today 14:316.

Lyon J, Moreira L, Moraes P, dos-Santos F, Resende M. 2011. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. Mycoses **54**:265–271.

Machado SM, Pacheco-Soares C, Marciano FR, Lobo AO, da-Silva NS. 2014. Photodynamic therapy in the cattle protozoan Tritrichomonas foetus cultivated on superhydrophilic carbon nanotube. Materials Science and Engineering C **36:**180–186.

Merchant S. Korbelik M. 2013. Upregulation of genes for C-reactive protein and related pentraxin/complement proteins in photodynamic therapy-treated human tumor cells: enrolment of PI3K/Akt and AP-1. Immunobiology. **218**(6):869-74.

Minamisako CM, Ribeiro GH, Lisboa ML, Cordeiro MMR, Grando LJ. Case Reports in Dentistry. 2016. Medication-Related Osteonecrosis of Jaws: A Low-Level Laser Therapy and Antimicrobial Photodynamic Therapy Case Approach. Volume 2016, Article ID 6267406, http://dx.doi.org/10.1155/2016/6267406.

Mroz P, Szokalska A, Wu MX, Hamblin MR. 2010. Photodynamic therapy of tumors can lead to development of systemic antigen-specific immune response. PLoS One 5:e15194.

Nunes DA, Denardi LB, Brayer DI, Morais J, Hartz S. 2014. *In vitro* photodynamic inactivation of *Sporothrix schenckii* complex species. Medical Mycology **52**:770–773.

Ogawa K, Kobuke Y. 2008. Recent Advances in two-photons Photodynamic Therapy. Anti cancer Agents in medicinal Chemistry **8**: 269-279.

Park J.B. and Lakes, R.S. 1992. Biomaterials- An Introduction (New York: Plenum).169 Pinto JG, Fontana LC, de-Oliveira MA, Kurachi C, Raniero LJ, Ferreira-Strixino J. 2016. *In vitro* evaluation of photodynamic therapy using curcumin on Leishmania majorandLeishmania braziliensis. Lasers in Medical Science **31:**883–890.

Pribac V, Todea C, Duma VF. Low-Level Laser Therapy (LLLT) for periodontal pockets: a review. 2016. Proc. SPIE 9670, Sixth International Conference on Lasers in Medicine, doi:10.1117/12.2192010.

Prates RA, Fuchs BB, Mizuno K, Naqvi Q, Kato IT, Ribeiro MS, Mylonakis E, Tegos EGP, Hamblin MR. 2013. Effect of virulence factors on the photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans*. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054387.

Praxis B. 2008. Buena Praxis, El periodico de la Salud-Argentina. From http://buenapraxisnews.blogspot.mx/2008/06/crece-el-uso-de-la-terapia-fotodinmica.html.

Ramón-Gallegos Eva. 2015. Terapia Fotodinámica: Teoría y Práctica. Instituto Politécnico Nacional, México DF.

Ramón-Gallegos E, Rosas-Flores L, Barrera-Mendoza CC, Herrera-Carrillo Z, González-Agüero G, Estrada-Manrique G, Cruz-Orea A. 2011. Isolation of Cellular Clones of Murine Melanoma Resistants to the Photodynamic Therapy and Characterization of Some Mechanisms Involved in the Radioresistance, Break throughs in Melanoma Research, Dr Yohei Tanaka (Ed), ISBN: 978-953-307-291-3, InTech.

Rapacka-Zdonczyk A, Rhod-Larsen A, Empel J, Patel A, Grinholc M. 2014. Association between susceptibility to photodynamic oxidation and the genetic background of Staphylococcus aureus. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. DOI 10.1007/s10096-013-1987-5.

Reiners JJJ, Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D. 2010. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. Autophagy **6**(1):7–18.

Roblero-Bartolón GV, Ramón-Gallegos E. 2015. Uso de nanopartículas (NP) en la terapia fotodinámica (photodynamic therapy[TFD]) contra el cáncer. Gaceta Médica Mexicana. **151**:85-98.

Ryskova L, Buchta V, Slezak R. 2010. Photodynamic Antimicrobial Therapy. Central European Journal of Biology **5**:400-406.

Samkoe KS, Fecica MS, Goyan RL, Buchholz JL, Campbell C, Kelly NM, Cramb DT. 2006. Photobleaching kinetics of optically trapped multilamellar vesicles containing verteporfin using two-photon excitation. Photochemistry and Photobiology **82**:152-157.

Sanovic R, Barbara Krammer, Grumboeck S, Verwanger T. 2009. Time-resolved gene expression profiling of human squamous cell carcinoma cells during the apoptosis process induced by photodynamic treatment with hypericin. International Journal Of Oncology **35**:921-939.

Santus R, Grellier P, Schrevel J, Maziere JC, Stoltz JF. 1998. Photodecontamination of blood components: advantages and drawbacks. Clinical Hemorheology and Microcirculation **18:**299–308.

Sasidharan S, Soo KC, Zhang Y. 2015. Chem. Rev 115:1990.

Sharon A, Finkelstein A, Shlezinger N, Hatam I. 2009. Fungal apoptosis: function, genes and gene function. FEMS Microbiol Rev **33**:833-854.

Silva LC, Ferreira-Strixino J, Fontana LC, Gonsalvesc AMR, Serra AC, Pineiro M, Canevari RA. 2016. Molecular analysis of apoptosis pathway after photodynamic therapy in breast cancer: Animal model study. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy **14**:152–158.

Silva JC, Ferreira-Strixino J, Fontana LC, Paula LM, Raniero L, Martin AA, Canevari RA 2014. Apoptosis-associated genes related to photodynamic therapy in breast carcinomas. Lasers Med Sci **29**:1429–1436.

Singh G, Espiritu M, Shen XY, Hanlon JG, Rainbow AJ. 2001. In vitro induction of TFD resistance in HT29, HT1376 and SK-N-MC cells by vrious photosensitizers. Photochemistry and Photobiology **73**(6):651-656.

Smijs T, Dame Z, de-Haas EB, Aans J, Pavel S, Sterenborg H. 2014. Photodynamic and nail penetration enhancing effects of novel multifunctional photosensitizers designed for the treatment of onychomycosis. Photochemistry and Photobiology **90**:189–200.

Spezzia-Mazzocco T, Torres-Hurtado SA, Julio Cesar Ramírez-San-Juan JC, Ramos-García R. 2016. *In vitro* effect of antimicrobial photodynamic therapy with methylene blue in two different genera of dermatophyte fungi. Photonics & Lasers in Medicine **5:**203–210. Taquet JP, Frochot C, Manneville V, Barberi-Heyob M. 2007. Current Medicinal Chemistry **14**:1673.

Tardivo JP, Wainwright M, Baptista M. 2015. Small scale trial of photodynamic treatment of onychomycosis in São Paulo. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **5**:66–8.

Tavares A, Carvalho CMB, Faustino MA, Neves MGPMS, Tomé JPC, Tomé AC, Cavaleiro JAS, Cunha A, Gomes NCM, Alves E, Almeida A. 2010. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. Marine Drugs **8:**91-105.

Tegos GP, Hamblin MR. 2013. Disruptive innovations: new anti-infectives in the age of resistance. Current Opinion in Pharmacology **13:**673–677.

Tennert C, Feldmann K, Haamann E, Al-Ahmad A, Follo M, Wrbas KT, Hellwig E, Altenburger MJ. 2014. Effect of photodynamic therapy (TFD) on *Enterococcus faecalis* biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections. BMC Oral Health **14:**13.

Triesscheijin MB. 2006. Photodynamic Therapy in Oncology. Oncologist 11:1034-44.

Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Jörg Huwyler. 2015. J Control Release, **200**:138.

Yang Y, Hu Y, Zhang J, Li X, Lu C, Liang Y, Xi L. 2012. A refractory case of chromoblastomycosis due to Fonsecaea monophorawith improvement by photodynamic therapy. Medical Mycology **50:**649–653.

Zawacka-Pankau J, Krachulec J, Ireneusz Grulkowski, Krzysztof P. Bielawski, Galina Selivanova. 2008. The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: Recent advances. Toxicology and Applied Pharmacology **232**: 487–497.

2. Microscopía Óptica y Espectroscopia

Christopher Wood, Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, UNAM
León Islas Suarez, Facultad de Medicina, UNAM
Raúl Rangel Rojo, Departamento de Óptica, CICESE
Meritxell Riquelme Pérez, Departamento de Microbiología Experimental, CICESE
Gabriel Ramos Ortiz, Centro de Investigaciones en Óptica
Jorge Mauricio Flores Moreno, Centro de Investigaciones en Óptica
Rosario Porras Aguilar, INAOE
Konstantinos Falaggis, Departamento de Óptica, CICESE
Jorge Castro Ramos, INAOE
Alexis Vázquez Villa, IPICYT
Enoch Gutiérrez Herrera, CCADET, UNAM

2.1 Introducción

La microscopía óptica y la espectroscopía son técnicas críticas fundamentales para la investigación en las ciencias de la vida y la medicina. Para observar la gran mayoría de los microorganismos en el planeta se requiere del uso de un microscopio, y para especies macroscópicas, no es factible intentar comprender su biología y fisiología sin emplear microscopios para estudiar la organización de sus estructuras a nivel celular y subcelular. Desde que Antonie van Leeuwenhoek vio las células por primera vez en 1674, la historia de la microscopía ha estado marcada por por mejoras tecnológicas paulatinas con respecto a la calidad de los componentes ópticos que como consecuencia han permitido profundizar cada vez más nuestro conocimiento sobre los procesos que dan vida. Las aplicaciones de la microscopía son tan diversas y los diseños de los microscopios son tan variados que el resumen presentado aquí pretende solamente presentar algunas de las tendencias más destacadas y recientes en la disciplina de la microscopía. Por su contexto, este resumen se restringirá a las aplicaciones biológicas y médicas de la microscopía óptica y la espectroscopía.

2.2. Estado del arte en el mundo

2.2.1 Microscopía confocal: Para la investigación en ciencias de la vida, el avance en microscopía óptica que ha tenido mayor impacto en los últimos 30 años es el uso de los microscopios confocales. La patente para la técnica se concedió a Marvin Minsky en 1961, pero fue hasta mediados de la década de los ochentas que el equipo se comercializó por primera vez en su configuración de escaneo por punto, facilitado por la incorporación de espejos controlados por galvanómetros. El principio de la confocalidad permite la formación de imágenes con una calidad y nitidez mejorada, ya que solamente registra la información en el el plano focal del objetivo de microscopio empleado, y excluye los fotones que provienen de otros planos. El mejoramiento de la calidad de imagen que el microscopio confocal genera, transformó a nuestra comprensión de los procesos biológicos y fisiológicos en todas las áreas de las ciencias de la vida.

El impacto dramático que tuvo el microscopio confocal sobre las ciencias de la vida permanece hasta hoy en día, y sigue siendo la técnica de microscopía óptica más utilizada en la disciplina después de casi tres décadas, sobre todo para estudios de la distribución de moléculas específicas en muestras biológicas. La gran mayoría de los estudios realizados con microscopios confocales o de campo abierto (convencionales), emplean proteínas fluorescentes para marcar las moléculas estudiadas. Aunque la fluorescencia como fenómeno se ha conocido y estudiado durante siglos, su uso en estudios microscópicos despegó cuando se desarrollaron protocolos para marcar con fluorescencia moléculas particulares con alta especificidad; éstos iniciaron con las metodologías inmunofluorescencia en los años cincuenta del siglo pasado, y siguen siendo implementados en gran número de estudios hoy en día. A pesar de su importancia, las técnicas inmunofluorescentes se restringen a marcar blancos en las superficies de muestras biológicas, o a muestras fijadas y permeabilizadas. A pesar de que hubo avances importantes en la síntesis de fluoróforos orgánicos con afinidad intrínseca para componentes celulares durante el último medio siglo, el descubrimiento y clonación de las proteínas fluorescentes (PFs) resultó ser un avance tan impactante como la comercialización de los microscopios confocales para la comunidad científica (y con quienes coincidentemente comparte la misma cronología). No es práctico resumir todas las

aplicaciones de las proteínas fluorescentes en este texto, pero en términos generales las PFs permiten marcar cualquier compartimento de las células, o cualquier subpoblación de células dentro de un tejido de manera permanente a través de la generación de líneas celulares u organismos transgénicos para la PF en cuestión.

Se pueden fusionar las PFs con prácticamente cualquier otra proteína y seguir el comportamiento cuasi-nativo del blanco en tiempo real en células, tejidos y organismos vivos.

Adicionalmente las PFs se han convertido en sensores para reportar la dinámica de un gran número de parámetros biológicos de interés (concentración de segundos mensajeros, iones, temperatura, etc.)¹. En esencia el límite para usar PFs hasta la fecha ocurre en el campo médico, ya que por cuestiones éticas no se permite generar humanos transgénicos (aunque la tecnología ya existe), pero sí se investiga el uso de las PFs en técnicas de marcado y tratamiento de condiciones patogénicas (p.e. el cáncer) entre otras propuestas.

2.2.2 Centros de servicio en microscopía: El gran aporte que los microscopios confocales ofrecieron a la comunidad biocientífica y médica, aliado a la disponibilidad de herramientas como las PFs, desde el inicio generaron una alta demanda de acceso a los equipos. No obstante, los microscopios confocales son equipos sofisticados que requieren ser operados por técnicos e investigadores experimentados en temas de óptica física y biofísica. Otro factor que influye en contra de su libre dispersión es su costo -hoy en día un microscopio confocal tiene un costo que va desde 250 mil hasta un millón de dólares o más, representando un obstáculo considerable para su instalación en laboratorios particulares en el mundo. En respuesta, las instituciones académicas han fundado Centros de Servicio de Microscopía Óptica, en donde se concentran microscopios avanzados (siendo la mayoría microscopios confocales) y los ponen al servicio y disposición de su comunidad científica, atendidos por técnicos e investigadores capacitados para brindar los servicios a los usuarios. Este modelo de centros de servicio, comúnmente llamados "core facilities" en inglés, no es exclusivo al área de microscopía óptica, pero la expansión geográfica del concepto se impulsó en parte por la popularidad de las técnicas de microscopía óptica y su impacto creciente en el área de las biociencias. No existen cifras sobre el número de centros de servicio en microscopía en el mundo, pero son casi ubicuos en las universidades medianas a grandes -como ejemplo, la Universidad de Harvard cuenta con siete "core facilities" diferentes de microscopía óptica para satisfacer la demanda dentro de una sola institución (hms.harvard.edu/research/hms-researcher-resources/hmscore-facilities), y la Sociedad Real de Microscopía del Reino Unido actualmente tiene 51 "core facilities" nacionales enlistados en su sitio web (www.rms.org.uk/networkcollaborate/facilitiesdatabase.html).

2.2.3 Interdisciplinaridad: La obtención de imágenes y su análisis por microscopía óptica aplicada a las biociencias son el fruto de la integración de distintas disciplinas científicas. Todos los microscopios se componen de cuatro elementos básicos: una fuente de iluminación, la muestra, el objetivo, y un sensor. Con base en su simplicidad, este arreglo es altamente flexible y capaz de modificación en cada uno de sus componentes – lámparas, láseres, muestras marcadas o naturales, objetivos de diferentes aumentos, y diversas cámaras y sensores que permiten al microscopio adaptarse a una variedad extensa de

aplicaciones y estudios experimentales. Además de esta flexibilidad de configuración, los microscopios representan solamente una etapa del proceso experimental. Un estudio en microscopio óptico consta de tres etapas: la preparación de la muestra; la observación de la muestra; y el procesamiento de las imágenes y el análisis de los datos. El grado de éxito del estudio experimental depende de la optimización de los parámetros en las tres etapas para que trabajen en harmonía, pero para lograr esta meta, se requiere integrar conocimientos y protocolos de diversos campos científicos. La etapa de preparación de muestras podría involucrar conocimientos biológicos o médicos para aislar la muestra correcta en óptimas condiciones, junto con química orgánica e inorgánica para generación de agentes de contraste (marcadores), y biología molecular y celular para la generación de células u organismos transgénicos para reporteros genéticos. Las muestras en sí pueden ser vivas o fijadas, enteras o en cortes histológicos, o transparentados a través de nuevos protocolos de aclarado de tejidos. La etapa de observación en microscopio podría requerir integrar conocimientos de los campos de física óptica, electrónica y mecatrónica, junto con la biología celular y fisiología para observaciones en muestras vivas. Para la tercera etapa, prácticamente todas las imágenes captadas por los microscopios son digitales. En este aspecto, actualmente una de las áreas de innovación más activas en microscopía óptica es la incorporación de novedosos métodos analíticos computacionales para caracterizar con mayor precisión la naturaleza morfológica o composición molecular de las muestras biológicas, en las cuatro dimensiones. Como ejemplo, algunos avances importantes en esta área en las últimas décadas provienen del traslado de métodos analíticos de astronomía y electrónica al campo de microscopía óptica. Esta última etapa del proceso depende de los conocimientos matemáticos, estadísticos, y de las ciencias de la computación.

En conclusión, los estudios en microscopía óptica comúnmente requieren integrar conocimientos de áreas científicas diversas, y son intrínsecamente multidisciplinarios. Los centros en servicios especializados en microscopía óptica suelen ser elementos importantes de infraestructura alrededor de los cuales los científicos de diversas disciplinas interactúan y colaboran para fomentar nuevos paradigmas conceptuales y experimentales.

2.2.4 Ciencia de transferencias: Una de las áreas en la que la microscopía óptica juega un papel central es la ciencia de transferencias ("translational science" en inglés). Desde hace dos décadas se ha reconocido el problema de la brecha que existe entre la ciencia básica y el desarrollo tecnológico, y la baja tasa de conversión para llevar los avances desde la primera etapa hasta la segunda. Esta disciplina existe para promover los estudios y generar tecnologías cuyo propósito es facilitar el traslado de los descubrimientos de investigación básica a productos, tratamientos y terapias de beneficio social. Una de las metas de la ciencia de transferencias es obtener datos en contextos de mayor relevancia fisiológica, y por su inocuidad relativa y su naturaleza no destructiva, la microscopía óptica es empleada frecuentemente para obtener datos desde tejidos, órganos y organismos enteros que preservan mejor el contexto fisiológico. Específicamente, las metodologías más relevantes para esos estudios incluyen la microscopía no-lineal, el análisis espectroscópico de estados fisiológicos in situ, el uso de animales transgénicos, protocolos de aclarado de tejidos, microscopía sobre marcadores endógenos, estudios macroscópicos de bioluminiscencia, microscopía de plano selectivo ("selective plane" o "lightsheet" microscopy en inglés), microscopía de fase cuantitativa, entre otras²⁻⁴. Cabe destacar que para los modelos biológicos canónicos y fáciles de modificar por transgénesis (pez cebra, ratón, A. thaliana, etc.) el uso de agentes de contraste para fluorescencia, luminiscencia y espectroscopía es rutinario, pero para estudios clínicos en humanos la transgénesis o marcaje con agentes orgánicos o inorgánicos está prohibido o es muy difícil de implementar, por lo que para estudios clínicos las técnicas de visualización de parámetros endógenos y/o la marcación dirigida ("targetted labelling" en inglés) son algunas de las pocas opciones que existen para experimentar en seres humanos. Dada la escasez de blancos apropiados, y la frecuente necesidad de combinar la medición de varios parámetros de manera simultánea, la microscopía multimodal, en la cual diferentes modalidades de observación biofotónica se combinan en el mismo experimento, es un fuerte polo de desarrollo para la ciencia de transferencias, sobre todo en la microscopía nolineal.

De nuevo, cabe destacar que la ciencia de transferencias que involucra investigación en microscopía óptica y espectroscopía es una labor obligatoriamente interdisciplinaria, que requiere conjuntar los esfuerzos de microscopistas, físicos ópticos, biólogos moleculares, investigadores clínicos, biotecnólogos, químicos orgánicos e inorgánicos, matemáticos, investigadores en computación, entre otros.

2.2.5 Optogenética: Las consideraciones hasta este punto han tratado del uso de la microscopía óptica para observar eventos biológicos en diferentes contextos, que es una actividad pasiva por parte de los investigadores durante su ejecución. No obstante, existen un gran número de aplicaciones en la microscopía óptica con las cuales los fotones son agentes que permiten manipular los sistemas bajo estudio, y que permiten al investigador perturbar sus modelos experimentales. Las modalidades para lograr la manipulación de los sistemas biológicos con fotones son extensas, varias de las cuales se encuentran en otras secciones del documento, pero una de las implementaciones que destacamos es la optogenética, que se basa en la utilización de canales iónicos cuya actividad (apertura) es regulada a través de la incidencia de fotones⁵. Experimentalmente, los canales fotoregulables se introducen mediante transgénesis en los organismos modelos (típicamente ratón, pez cebra, C. elegans) en los que su transcripción es controlada por secuencias reguladoras que dirigen su expresión a neuronas o conjuntos de neuronas específicas. Así, con la aplicación de luz al sitio de expresión del canal, las neuronas se activan o se inhiben (según el tipo de canal iónico expresado) y la función de las neuronas se delimita en su contexto fisiológico, que incluso pueden llegar a ser animales conscientes y en movimiento. Este tipo de experimentos permite estudiar la interconectividad de circuitos neuronales en explantes. Por su combinación de precisión y control temporal, la optogenética está transformando las neurociencias.

2.2.6 Microscopía espectroscópica para estudios moleculares: En adición a los avances en la visualización de eventos en contextos fisiológicos más relevantes, otra tendencia en la biofotónica a nivel mundial es la visualización y caracterización de procesos a nivel de molécula única en los sistemas biológicos⁶. La mayoría de estas técnicas están basadas en el registro de la fluorescencia intrínseca o extrínseca con detectores suficientemente sensibles para discriminar los fotones emitidos por fluoróforos individuales. Los protocolos usados permiten rastrear partículas individuales in vivo (single particle tracking) o determinar características moleculares (tales como concentración, coeficiente de difusión, estequiometría de oligomerización, confinamiento en compartimientos celulares, entre otras) mediante análisis de fluctuaciones en la fluorescencia de una población de moléculas

en un volumen determinado (con técnicas como fluorescence correlation spectroscopy, raster image correlation microscopy, mean square displacement determination etc). Existen también técnicas modernas de microscopía óptica basadas en efectos ópticos no lineales capaces de extraer información de contraste y estructura supramolecular de una forma no destructiva y no invasiva; esto es, sin la necesidad de fijar, teñir o marcar con proteínas fluorescentes. Tales técnicas inducen el fenómeno de esparcimiento Raman de una manera coherente pudiendo con ello indagar las frecuencias de vibración molecular que conforman el espécimen dentro de la fusión de punto extendido (el foco) y, mediante un barrido láser, crear un mapa de contraste molecular. Sin embargo, estás técnicas requieren de sistemas láseres de pulsos ultracortos capaces de generar dichos procesos ópticos no lineales y, generalmente, son instrumentos caros y pueden encontrase en laboratorios especializados en óptica de láseres. De aquí que su desarrollo mantiene un auge experimental interdisciplinario y no han llegado a ser en su totalidad prototipos comerciales. No obstante, es un hecho que su desarrollo es fundamental e incluso indispensable en aquellos institutos de investigación que realizan investigación de frontera en óptica y microbiología en particular. El conocimiento generado en este tema durante estas últimas décadas sigue en continuo aumento, y hoy en día son implementados mediante su construcción total, o bien parcial, al adaptarlos a sistemas comerciales.

Los datos que se obtienen a través de estos métodos espectroscópicos son, por lo general, cuantitativos, y por ende han generado mucho interés para su aplicación a la biología sintética y de sistemas, en las cuales los datos cuantitativos son esenciales para la validación de modelos y formulación de predicciones basadas en los mismos.

- **2.2.7** Nanoscopía: En los últimos 15 años se ha popularizado la nanoscopía, en la cual la iluminación estructurada y/o la aplicación de métodos estadísticos para analizar la variación temporal de la emisión de fluoróforos, permiten mejorar la resolución espacial máxima que la microscopía óptica puede alcanzar hasta unas 10 a 20 veces, acercándose al límite teórico (que corresponde a la dimensión del fluoróforo)⁷. El inicio de la época de la nanoscopía ha extendido la utilidad y alcance de la microscopía óptica dramáticamente. Anteriormente, estábamos limitados a resolver estructuras de organelos celulares con dimensiones entre 200 a 300 nanómetros (p.e. mitocondrias, vesículas grandes, cisternas de Golgi) o células bacterianas. La nanoscopía permite visualizar estructuras con dimensiones de estructuras macromoleculares como el centrosoma, vesículas sinápticas, el citoesqueleto etc., y caracterizar la ultra-estructura de las mitocondrias y bacterias, por ejemplo. La nanoscopía está revolucionando la microscopía óptica y se considera uno de los avances más significativos en la historia del campo, y en reconocimiento de su importancia, sus inventores fueron galardonados con el Premio Nobel de Química en 2014. Además, representa otro ejemplo de la importancia de la investigación multidisciplinaría en la microscopía -el desarrollo e implementación de los métodos nanoscópicos requieren unir esfuerzos de físicos ópticos, investigadores en biociencias, matemáticos y programadores.
- **2.2.8 Microscopía de alto rendimiento**: Avances en la automatización de los microscopios, su integración con unidades robotizadas para la manipulación de las muestras, y la disponibilidad de técnicas híbridas como la citometría de imágenes han abierto la posibilidad de recolectar cientos de miles y hasta millones de imágenes microscópicas en una sesión experimental⁸.

Otras técnicas nuevas como la microscopía de plano selectivo, a su vez, son capaces de generar terabytes de datos en cuestión de horas. La mejor posibilidad de ensamblar y analizar tal cantidad de datos es a través de algoritmos automáticos o semi-autónomos ejecutados en computadora, utilizando metodologías como el aprendizaje neuronal *in sílico* y creando nuevos paradigmas para la visualización de los datos explorados.

2.2.9 Microscopía Holográfica Digital y Cuantitativa de Fases: La mayoría de las técnicas ya presentadas detectan los fotones producidos por la fluorescencia, pero no todos los fenómenos biológicos y clínicos pueden estudiarse utilizando marcadores fluorescentes. Actualmente existe un interés creciente en técnicas mínimamente invasivas que permiten observar células sin marcaje, mediante el registro del patrón de interferencia (holograma) para generar imágenes cuantitativas de variación espacial de fase de la muestra ^{9,10}. La técnica permite recuperar la información sobre la muestra en diferentes planos focales a partir de una sola exposición, y generar imágenes tomográficas. El uso de moduladores espaciales de luz ha extendido la utilidad de esta metodología hasta aplicarse en fluorescencia ¹¹.

2.3. Estado del arte en México

De las técnicas mencionadas en la sección anterior (Estado del arte en el mundo) la microscopía confocal es la más prevalente entre la comunidad científica en México. Si consultamos la base de datos Scopus, de un total de 20,950,654 artículos publicados en ciencias de la vida y medicina entre 1960 y 2016, aproximadamente 94,139 utilizaron microscopía confocal en sus estudios: 0.45% del total. Si consideramos el mismo periodo para artículos publicados de origen en México, para un total de 113,709 artículos publicados en las mismas disciplinas, 562 utilizaron microscopios confocales en su diseño experimental: 0.49% del total. Analizando estas cifras, se podría concluir que la tasa de uso de microscopios confocales en México está alineada con la misma cifra al nivel global; no obstante, un factor que difiere entre la situación mundial y la nacional es la organización y disponibilidad de los equipos e infraestructura. Una pregunta clave no es necesariamente cuántos sistemas microscópicos avanzados existen, ni cuántos artículos se publican con estos recursos, sino que tipo de acceso a estos recursos tienen la mayoría de los investigadores mexicanos. Cómo expusimos en la sección anterior, desde hace más de dos décadas el modelo prevalente para organizar los recursos de microscopía óptica avanzada ha sido a través de laboratorios de servicio. En México el concepto de la concentración y centralización de recursos en laboratorios de servicio es menos establecido, aunque notamos que con la creación del programa de Laboratorios Nacionales, y el crecimiento en el número de laboratorios de servicios institucionales en los últimos cinco a diez años, esta situación está mejorando paulatinamente. Aun así, estamos lejos de competir con países más desarrollados en los cuales la gran mayoría de las instituciones de nivel superior cuentan con uno o más centros de servicio en microscopía, y por ende se puede concluir que el acceso al microscopio confocal para investigadores en esos países es esencialmente universal.

La microscopía confocal tiene más de 30 años desde su comercialización. Más recientemente, avances en tecnología y metodología ha disparado una expansión en protocolos avanzados para visualizar moléculas individuales, aumentar la resolución máxima posible, automatizar la microscopía, y otros que mencionamos en la sección

anterior. En México existen centros Conacyt (CICESE, CIO e INAOE) e instituciones educativas públicas y privadas (UNAM, ITESM) con gran potencial para incursionar en el tema del desarrollo de técnicas de microscopía avanzada. En particular en el CIO y CICESE recién implementan microscopios de generación de segundo armónico ^{12, 13} y en CICESE se trabaja en la implementación de microscopía Raman lineal y no lineal ¹⁴ utilizando microscopía de hoja de luz láser ¹⁵.

Para impulsar este desarrollo es pertinente e indispensable que en los próximos 5-10 años se destinen más apoyos para adquirir infraestructura y equipo, así como para la construcción de laboratorios nacionales especializados en esta rama y poder fortalecer la instrumentación óptica necesaria para desarrollar investigación aplicada y multidisciplinaria en microscopía avanzada.

Ahora examinaremos el número de publicaciones con origen en México para temas en microscopía de frontera — en la siguiente tabla, en cada línea se indica la frase buscada, seguida del número de publicaciones encontrados en Scopus para el periodo 1960 a 2016:

Frase de búsqueda	Número de artículos a nivel internacional	Número de artículos con origen en México**
Multiphoton microscopy/two photon microscopy	4371	4
Nonlinear microscopy (SHG, CARS, SRS)	8972	3 (12-14)
Fluorescence correlation spectroscopy	2300	0
Bioluminescence imaging	2016	0
Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy	1018	9 (16-19)
Light sheet imaging/selective plane microscopy	501	1 (15)
Optogenetics	2630	4
Superresolution microscopy/nanoscopy	2471	1
Single molecule microscopy/imaging	871	1
Quantitative phase imaging/holographic microscopy	734	1
TOTAL	15,894*	24*
Microscopy (control positivo)	858,497	3,919
Porcentaje	1.85%	0.61%

^{*} En las búsquedas se emplearon variaciones típicas de las frases buscadas (p.e. superresolution y super-resolution; single molecule y single-molecule, etc). Es probable que el número total de artículos encontrados para cada categoría sea inferior al número real a causa de que los autores no incluyeran la frase en el título, en el resumen o en las palabras claves, aún si su publicación incluyó alguna de las técnicas. Sin embargo, se buscaron las mismas frases en ambas columnas, y se consideró razonable asumir que la tasa de falsos negativos en cada categoría haya sido la misma.

** Se incluyen los artículos publicados del autor o autora responsable (primer autor, o autor de correspondencia) adscritos a una institución mexicana. Se excluyen artículos con autores responsables de instituciones fuera de México, aunque uno o más de sus autores no principales fueran mexicanos.

Las cifras muestran que la frecuencia de incorporación de una selección arbitraria de técnicas avanzadas en microscopía óptica a las líneas de investigación en biociencias y medicina, es siete veces menor en México que a nivel internacional: un contraste notable si comparamos la frecuencia de uso de técnicas más establecidas como la microscopía confocal. Inevitablemente este hecho tiene repercusiones negativas para la competitividad del sector de las ciencias de la vida e investigación clínica a nivel nacional, comparado con el mismo sector a nivel global, afectando nuestra habilidad de innovar y dificultando la retención de los jóvenes científicos interesados en aplicar las técnicas de frontera en microscopía óptica.

¿Cuáles son los factores que nos han llevado a experimentar este déficit en competitividad en el campo de microscopía óptica aplicada a las biociencias y medicina? Como examinamos ampliamente en la sección anterior, las metodologías avanzadas de la microscopía óptica hoy en día dependen de la integración de avances en diversas disciplinas, tanto para innovar con el desarrollo de nuevas modalidades como a nivel de su implementación en nuevas aplicaciones.

Las disciplinas importantes para la integración de estudios microscópicos avanzados incluyen la óptica física, la química orgánica e inorgánica, la biología molecular y tecnologías de transgénesis y cultivo organotípico, la matemática aplicada, la estadística, las ciencias computacionales, entre otras. La capacidad científica en México en cada una de estas disciplinas y tecnologías está presente con buena calidad, pero de manera dispersa. Si examinamos nada más el caso de la óptica física, existen varios institutos con fuerte capacidad para la investigación e innovación. Se cuenta con tres centros Conacyt (CIO, INAOE y CICESE) con grupos y líneas de investigación consolidadas, con programas de posgrado de Excelencia en óptica y optoelectrónica reconocidos como Nivel Internacional. Donde el enfoque en el diseño y uso de dispositivos optoelectrónicos, con aplicación en instrumentación, comunicaciones ópticas y sensores ópticos, ha sido una tradición científica muy marcada en los últimos 20 años. Es solo en los 5 años recientes que las técnicas avanzadas de microscopía láser están siendo ahora exploradas en México. Asimismo, existen diversos grupos de óptica en institutos de la UNAM, entre otras universidades nacionales. Si los elementos fundamentales necesarios sí están presentes en México, ¿por qué experimentamos una competitividad reducida en la incorporación de metodologías aplicadas avanzadas comparada con la comunidad científica a nivel global? Esta pregunta se examinó durante la primera reunión de la Red Temática en Biofotónica en septiembre de 2016 y, entre los investigadores presentes, se postularon distintas causas. Uno de los factores importantes que limita la incorporación de metodologías avanzadas es la disponibilidad de los equipos, y la infraestructura que se requiere para su operación y mantenimiento. Si consideramos los elevados costos de los microscopios avanzados (entre 5 y 20 millones de pesos), y los requerimientos técnicos para su buena operación, es aparente que el modelo que incorpora y concentra los equipos y el recurso humano necesario para su operación en centros de servicio es lo más sensato y comprobado por su

utilidad durante décadas en prácticamente todas las grandes instituciones académicas en otros países. Existen centros de servicio para microscopía óptica en la República Mexicana, pero solamente cinco o seis de ellos manejan algunas las técnicas avanzadas mencionadas en la sección anterior y presente, y están ubicados en la zona central del país, y no todos tienen una política operativa de acceso sin restricciones a cualquier investigador científico mexicano de los sectores académicos y comerciales. En este sentido, debe ser una prioridad establecer más centros de servicios en microscopía óptica con mayor distribución geográfica, equipados con microscopios avanzados para asegurar la mayor competitividad para la comunidad científica en México. Cabe mencionar que los microscopios son equipos en los cuales los investigadores usuarios deben estar físicamente presentes para dirigir sus experimentos al momento de su captura; en este sentido, no es factible enviar por servicios de mensajería una botella con células en cultivo, o un animal transgénico, y menos esperar a que si llegan vivos, el operador del microscopio tome las imágenes exactas de las zonas precisas de interés para el investigador o la investigadora. A pesar de las restricciones mencionadas, es pertinente mencionar que, en menos de cuatro años de operación, los Laboratorios Nacionales de Microscopía Avanzada han registrado más de 400 usuarios provenientes de 14 estados de la República, una cifra que demuestra la alta demanda que existe para acceder a los servicios en microscopía óptica y la amplia distribución de esta demanda en el país.

Además de catalizar una expansión de la infraestructura física y equipamiento, es importante tomar en cuenta la disponibilidad y distribución de los recursos humanos necesarios que aseguren que los equipos y la infraestructura operen a su máximo rendimiento. En esta reunión hubo consenso sobre la existencia de un notable déficit de técnicos académicos e investigadores con experiencia y capacitados para el manejo de microscopios avanzados, y del desarrollo e implementación de protocolos novedosos en esta plataforma flexible. La carencia de recurso humano capacitado también fue citada como un factor que, en algunos casos, podría disminuir el rendimiento y aprovechamiento de los microscopios avanzados ya en existencia en México. Para solucionar el problema en ambos ámbitos (infraestructura en microscopía actual y futura), es necesario aumentar el número de cursos, talleres, seminarios y congresos en el tema de la microscopía óptica, y crear nuevos programas académicos que incorporen elementos de la microscopía óptica aplicada en sus currículos. Idealmente para promover la interdisciplinaridad necesaria para impulsar la innovación en microscopía óptica aplicada, se promovería el establecimiento de programas académicas inter-institucionales.

Hemos examinado la situación de la infraestructura y recursos humanos como elemento importante para impulsar el desarrollo de la microscopía óptica aplicada a las biociencias en México. Otro elemento que pesa en contra del avance en la disciplina en México es la carencia de interacción entre los investigadores e institutos en las diferentes áreas científicas.

Actualmente no existen los mecanismos o andamios para integrar expertos en física óptica, biología, medicina, química, matemática y tecnología; tenemos que construir nuevas culturas de cooperatividad y nuevas formas de interactuar para agilizar el flujo de conocimiento entre diferentes áreas científicas y crear esquemas de financiamiento que apoyen la investigación multi-disciplinaria, que promueven iniciativas que integren a los

expertos y sus conocimientos en diversas disciplinas. Se requiere fundar una o más sociedades académicas dedicadas al apoyo de la microscopía óptica, apoyar congresos en temas multidisciplinarias e impulsar la fusión de culturas científicas diversas. Notamos que la Red Temática de Biofotónica es un excelente punto de partida que impulsa la interacción inter-disciplinaria, a través de reuniones, intercambios académicos, estancias de investigación; no obstante, los mecanismos se tienen que reforzar.

Así con el establecimiento de más centros de excelencia en microscopía, el impulso a la formación de los recursos humanos, y el fortalecimiento de lazos interdisciplinarios e intersectoriales, aumentaremos la competitividad de la comunidad científica en temas de microscopía óptica, una técnica tan fundamental para prácticamente todas las áreas de investigación y desarrollo de las ciencias de la vida y la investigación clínica.

2.4 Espectroscopía

La espectroscopia es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Esta puede darse a través de reflexión, transmisión, absorción, emisión, o esparcimiento (lineal o no lineal) de la energía radiante. Cada uno de estos fenómenos lleva información del medio y mediante un análisis espectral se puede inferir propiedades del medio.

La luz blanca, como Newton lo demostró hace mas de 400 años, se puede descomponer en colores al hacerla pasar a través de un prisma. Posteriormente, en 1802 Wollaston observó cualitativamente las líneas espectrales del sol y en 1814 Faunhofer describe e introduce una notación para las líneas de emisión y absorción del sol. En 1860 Bunsen y Kirchhoff emplearon un prisma y una flama con lo que introdujeron el espectroscopio de prisma y pudieron observar espectros de absorción y emisión de algunos elementos químicos. Asi, la espectroscopia permite obtener información de la composición química de gases, moléculas y hasta cierto punto de líquidos y sólidos.

2.4.1 Estado del arte en el mundo y en México

La búsqueda en Web of Science de Thompson sobre trabajos en espectroscopia en combinación con varias palabras claves son mostrados en la tabla 1. Estos resultados incluyen el número de artículos publicados a nivel nacional e internacional durante el periodo de los años 1980 a 2016.

Area de la espectroscop ia	Frase de búsqueda	Artículos internacion ales	Artículos en México
fluorescence	fluorescence spectroscopy biological	5782	21
spectroscopy	fluorescence spectroscopy tissue	4793	24
	fluorescence spectroscopy cancer	4097	11
	fluorescence spectroscopy biomedical	1144	5
	fluorescence spectroscopy biophotonics	80	0
Total		15896	<mark>61</mark>

atomic	atomic absorption spectroscopy biologic	cal 710	14
absorption	atomic absorption spectroscopy tissue	590	117
spectroscopy	atomic absorption spectroscopy cancer	248	1 2
1 17	atomic absorption spectroscopy biophot	_	
	atomic absorption spectroscopy biomed		
	atomic absorption spectroscopy blomes.		
Total		1548	13
X - ray	x ray spectroscopy biological	6036	54
spectroscopy	x ray spectroscopy tissue	3422	41
эрссиовсору	x ray spectroscopy cáncer	2232	26
	x ray spectroscopy biomedical	2794	24
	x ray spectroscopy biophotonics	4	$\frac{24}{0}$
	x ray spectroscopy biophotomes		
Total		14488	145
Molecular	Molecular spectroscopy biological	7841	36
spectroscopy	Molecular spectroscopy tissue	3511	18
эрсси овсору	1 1	3246	22
	Molecular spectroscopy cancer Molecular spectroscopy biomedical		
	Molecular spectroscopy biomedical	1265	10
			10
Total	Molecular spectroscopy biomedical	1265	10
Total	Molecular spectroscopy biomedical	1265 32	10 0
	Molecular spectroscopy biomedical Molecular spectroscopy biophotonics	1265 32 15 895	10 0 86
Infrared	Molecular spectroscopy biomedical Molecular spectroscopy biophotonics Infrared spectroscopy biological	1265 32 15 895	10 0 86
Infrared	Molecular spectroscopy biomedical Molecular spectroscopy biophotonics Infrared spectroscopy biological Infrared spectroscopy tissue	1265 32 15 895 6146 9248	86 37 32
Infrared	Molecular spectroscopy biomedical Molecular spectroscopy biophotonics Infrared spectroscopy biological Infrared spectroscopy tissue Infrared spectroscopy cancer	1265 32 15 895 6146 9248 3519	86 37 32 20
Infrared	Molecular spectroscopy biomedical Molecular spectroscopy biophotonics Infrared spectroscopy biological Infrared spectroscopy tissue	1265 32 15 895 6146 9248	86 37 32
Infrared spectroscopy	Molecular spectroscopy biomedical Molecular spectroscopy biophotonics Infrared spectroscopy biological Infrared spectroscopy tissue Infrared spectroscopy cancer Infrared spectroscopy biomedical	1265 32 15 895 6146 9248 3519 2987 43	10 0 86 37 32 20 21 0
Infrared spectroscopy	Molecular spectroscopy biomedical Molecular spectroscopy biophotonics Infrared spectroscopy biological Infrared spectroscopy tissue Infrared spectroscopy cancer Infrared spectroscopy biomedical	1265 32 15 895 6146 9248 3519 2987	86 37 32 20 21
Infrared spectroscopy Total	Molecular spectroscopy biomedical Molecular spectroscopy biophotonics Infrared spectroscopy biological Infrared spectroscopy tissue Infrared spectroscopy cancer Infrared spectroscopy biomedical Infrared spectroscopy biophotonics	1265 32 15 895 6146 9248 3519 2987 43 21 943	10
Infrared spectroscopy Total UV-Vis	Molecular spectroscopy biomedical Molecular spectroscopy biophotonics Infrared spectroscopy biological Infrared spectroscopy tissue Infrared spectroscopy cancer Infrared spectroscopy biomedical Infrared spectroscopy biophotonics UV-Vis spectroscopy biological	1265 32 15 895 6146 9248 3519 2987 43 21 943	10
Infrared spectroscopy Total UV-Vis spectroscopy	Molecular spectroscopy biomedical Molecular spectroscopy biophotonics Infrared spectroscopy biological Infrared spectroscopy tissue Infrared spectroscopy cancer Infrared spectroscopy biomedical Infrared spectroscopy biophotonics UV-Vis spectroscopy biological UV-Vis spectroscopy tissue	1265 32 15 895 6146 9248 3519 2987 43 21 943	10 86 86 20 21 0 110 26 6
Infrared spectroscopy Total UV-Vis spectroscopy	Molecular spectroscopy biomedical Molecular spectroscopy biophotonics Infrared spectroscopy biological Infrared spectroscopy tissue Infrared spectroscopy cancer Infrared spectroscopy biomedical Infrared spectroscopy biophotonics UV-Vis spectroscopy biological UV-Vis spectroscopy tissue UV-Vis spectroscopy cancer	1265 32 15 895 6146 9248 3519 2987 43 21 943 1911 288 1090	10 0 86 37 32 20 21 0 110 26 6 19
Infrared spectroscopy Total UV-Vis spectroscopy	Infrared spectroscopy biological Infrared spectroscopy biological Infrared spectroscopy tissue Infrared spectroscopy cancer Infrared spectroscopy biomedical Infrared spectroscopy biomedical Infrared spectroscopy biophotonics UV-Vis spectroscopy tissue UV-Vis spectroscopy tissue UV-Vis spectroscopy cancer UV-Vis spectroscopy biomedical	1265 32 15 895 6146 9248 3519 2987 43 21 943 1911 288 1090 579	10 86 86 37 32 20 21 0 110 26 6 19 8
Infrared spectroscopy Total UV-Vis spectroscopy	Molecular spectroscopy biomedical Molecular spectroscopy biophotonics Infrared spectroscopy biological Infrared spectroscopy tissue Infrared spectroscopy cancer Infrared spectroscopy biomedical Infrared spectroscopy biophotonics UV-Vis spectroscopy biological UV-Vis spectroscopy tissue UV-Vis spectroscopy cancer	1265 32 15 895 6146 9248 3519 2987 43 21 943 1911 288 1090	10 0 86 37 32 20 21 0 110 126 6 19
Total Infrared spectroscopy Total UV-Vis spectroscopy biological	Infrared spectroscopy biological Infrared spectroscopy biological Infrared spectroscopy tissue Infrared spectroscopy cancer Infrared spectroscopy biomedical Infrared spectroscopy biomedical Infrared spectroscopy biophotonics UV-Vis spectroscopy tissue UV-Vis spectroscopy tissue UV-Vis spectroscopy cancer UV-Vis spectroscopy biomedical	1265 32 15 895 6146 9248 3519 2987 43 21 943 1911 288 1090 579	10 86 86 37 32 20 21 0 110 26 6 19 8

0 0 0 0 0
0
0
0
Ŭ ├ ───
· · · /
U
0
0
1
0
0
0
<mark>1</mark>
35
26
27
16
0
104
6
2
5
3
0
<mark>16</mark>
0
0
0
0
H
0

Total		<mark>14</mark>	0
Vibrational	VIBRATIONAL SPECTI	ROSC508Y	6
Spectroscop	biological	688	2
y	VIBRATIONAL SPECTROSCOPY		3
	VIBRATIONAL SPECTROSCOPY		2
		ROS (2 OPY	0
	biomedical		
		ROSCOPY	
	biophotonics		
Total		2933	13
D'ee	Thing of A	410	
Diffuse	Diffuse reflectance spectroscopy biol		3
reflectance	Diffuse reflectance spectroscopy tiss		11
spectroscopy	Diffuse reflectance spectroscopy can		0
	Diffuse reflectance spectroscopy bion Diffuse reflectance spectroscopy bion		1 0
	Diffuse reflectance spectroscopy bio	protozares	U
Total		2272	15
Chemometri	CHEMOMETRICS biological	427	3
cs	CHEMOMETRICS tissue	264	2
	CHEMOMETRICS cancer	211	1
	CHEMOMETRICS biomedical	49	0
	CHEMOMETRICS biophotonics	1	0
Total		<mark>952</mark>	<mark>6</mark>
espectroscopi	NMR spectroscopy biological	3059	9
a de	NMR spectroscopy tissue	2283	6
resonancia	NMR spectroscopy cáncer	1440	3
magnética	NMR spectroscopy biomedical	378	3
nuclear	NMR spectroscopy biophotonics	0	0
(NMR)			
Total		<mark>7160</mark>	21

Tabla 1.- Número de artículos nacionales e internacionales en las diversas áreas de la espectroscopia.

De la tabla 1, podemos inferir, que en espectroscopia, y comparándonos con el resto del mundo, en fluorescencia se publica el 0.4 % del total; en espectroscopia atómica de

absorción el 0.8 %; en espectroscopia de rayos X el 1%; en espectroscopia molecular el 0.5%; en espectroscopia de IR, el 0.5%; en espectroscopia UV.Vis el 1.5%; en espectroscopia AFM el 0%; en LIBS el 0.1%; en espectroscopia Raman el 0.9%; en SERS el 0.6%; en SESORS el 0 %; en espectroscopia vibracional el 0.4 %; en espectroscopia de reflectancia difusa el 0.6%; en quemometria el 0.6% y en NMRS el 0.2 %. De aquí que uno puede concluir que en torno a la espectroscopia y la biofotonica aplicada al área de la salud, no llegamos a producir en la mayoría de los casos ni el 1% de la publicación de artículos, del total que se publican en el mundo, por lo que se hace necesario un desarrollo científico y tecnológica en esta área, para evitar mayores atrasos.

2.4.2 Estado del arte en México.

A nivel internacional existe una gran cantidad de Institutos y Universidades en los que se realiza espectroscopia, en México solo en las universidades de algunos estados se realiza investigación en espectroscopia y biofotónica principalmente en:

- 1. En el CIO se desarrolla espectroscopia de superficie mejorada SERS por los Drs. Claudio Frausto Reyes y Elder de la Rosa. Además, el Centros de Servicio en Espectroscopia dirigido por la Dra. Tzarara López Luke realizan investigación con SERS.
- 2. En el Instituto de Micro y Nano tecnología perteneciente a la Universidad Veracruzana también se desarrollan técnicas de espectroscopia Raman de superficie mejorada, en especifico por la Dra. Claudia Oliva Mendoza Barrera.
- 3. La Dra. Silvia Salas Márquez y el Dr. Aaron Flores del laboratorio de espectroscopia óptica y térmica de la Universidad Autónoma de Yucatán, y Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV Unidad Mérida), realizan espectroscopia Raman.
- 4. El equipo de la Dra. Beatriz Paredes en la Universidad de San Luis Potosí, realizan investigación de espectroscopia de reflectancia difusa mediante esferas integradoras.
- 5. En los Laboratorios del Instituto de Química de la UNAM ofrecen análisis fisicoquímicos para la identificación de materiales por técnicas como espectroscopia de infrarrojo y ultravioleta, resonancia magnética nuclear, y espectrometría de masas, el encargado es el M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez y la Dra. Beatriz Quiroz García,
- 6. En el Instituto de Biotecnología de la UNAM, realizan espectro fluorimetria, el líder es el Dr. Roberto Pablo Stock Silberman.
- 7. En la *Universidad* de Guadalajara, desarrollan *espectroscopía de transformada de Fourier* FTIR de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).
- 8. En la Universidad de Guadalajara, Dr. Francisco Trujillo realiza espectroscopia ATR.
- 9. En el Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías-Biomateriales de la Universidad de Guadalajara emplea la espectroscopia de infrarrojo (FTIR) es empleada para la caracterización de materiales sólidos y líquidos, orgánicos e inorgánicos el Dr. Héctor Jesús Contreras Quiñones es el encargado.
- 10. Héctor Cerecedo, Universidad veracruzana, realiza detección de glucosa y espectroscopia Raman.

- 11. En el Instituto Mexicano del Petróleo, el M en C. Héctor del Río Moreno, desarrolla espectrometría de masas,
- 12. El Laboratorio Analógico y Numérico de Procesos Geológicos, del Instituto de Geología de la UNAM, es un Laboratorio Certificado en espectroscopia de Resonancia Magnética.
- 13. En el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica se realizan investigaciones sobre espectroscopia Raman y espectroscopia de reflectancia difusa en el grupo de óptica biomédica a cargo del Dr. Jorge Castro Ramos.

2.5 Referencias

- 1. Germond, A., Fujita, H., Ichimura, T. & Watanabe, T. M. Design and development of genetically encoded fluorescent sensors to monitor intracellular chemical and physical parameters. Biophys. Rev. 8, 121–138 (2016).
- 2. Levenson, R., Beechem, J. & McNamara, G. Spectral imaging in preclinical research and clinical pathology. Anal. Cell. Pathol. (Amst). 35, 339–61 (2012).
- 3. Perry, S. W., Burke, R. M. & Brown, E. B. Two-Photon and Second Harmonic Microscopy
- in Clinical and Translational Cancer Research. Ann. Biomed. Eng. 40, 277–291 (2012).
- 4. Xu, T. et al. The Expanding Toolbox of In Vivo Bioluminescent Imaging. Front. Oncol. 6.

150 (2016).

- 5. Lin, M. Z. & Schnitzer, M. J. Genetically encoded indicators of neuronal activity. Nat. Neurosci. 19, 1142–1153 (2016).
- 6. Liu, Z., Lavis, L. D. & Betzig, E. Imaging Live-Cell Dynamics and Structure at the SingleMolecule

Level. Mol. Cell 58, 644–659 (2015).

- 7. Nienhaus, K. & Nienhaus, G. U. Where Do We Stand with Super-Resolution Optical Microscopy? J. Mol. Biol. 428, 308–322 (2016).
- 8. Mattiazzi Usaj, M. et al. High-Content Screening for Quantitative Cell Biology. Trends Cell Biol. 26, 598–611 (2016).
- 9. Majeed, H. et al. Quantitative phase imaging for medical diagnosis. J. Biophotonics (2016). doi:10.1002/jbio.201600113
- 10. Nehmetallah, G. & Banerjee, P. P. Applications of digital and analog holography in three-dimensional imaging. Adv. Opt. Photonics 4, 472 (2012).
- 11. Field, J. J., Winters, D. G. & Bartels, R. A. Single-pixel fluorescent imaging with temporally labeled illumination patterns. Optica 3, 971 (2016).
- 12. Licea-Rodríguez, J., et. Al. Femtosecond laser writing over silver nanoparticles system embedded in silica using nonlinear microscopy(2014) Optical Materials, 36 (3), pp. 682-686.
- 13. Carriles, R., et. al. Invited Review Article: Imaging techniques for harmonic and multiphoton absorption fluorescence microscopy(2009) Review of Scientific Instruments, 80 (8), art. no. 081101.
- 14. Rocha-Mendoza, I., Borri, P., Langbein, W. Quadruplex CARS micro-spectroscopy (2013) Journal of Raman Spectroscopy, 44 (2), pp. 255-261.
- 15. Rocha-Mendoza, I., et. al. Rapid spontaneous raman light sheet microscopy using cwlasers and tunable filters (2015) Biomedical Optics Express, 6 (9), art. no. A023, pp. 3449-3461.

- 16 Verdín, J., Bartnicki-Garcia, S., & Riquelme, M. (2009). Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 74(5), 1044-1053.
- 17. Sánchez-León, et. al. (2011). Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryotic Cell*, 10(5), 683-695.
- 18. Riquelme, M., Bredeweg, et. al. (2014). The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. *Molecular Biology of the Cell*, 25(8), 1312-1326.
- 19. Sánchez-León, E., et. al. (2015). The Rab GTPase YPT-1 associates with Golgi cisternae and Spitzenkörper microvesicles in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 95(3), 472-490.

3.- Pinzas Ópticas y Micromanipulación

Braulio Gutiérrez Medina (IPICYT)
José Luis Hernández Pozos (UAM-I)
Héctor Hugo Cerecedo Núñez (UV)
Ulises Ruiz Corona (INAOE)
Rubén Ramos García (INAOE)
Víctor Ruiz Cortés (CICESE)
Remy Avila Foucat (CFATA-UNAM)
Elisa Tamaríz Domínguez (UASLP)
Karen Volke Sepúlveda (IF-UNAM)
Iván Santamaría Holek
Paulina Segovia Olvera (CICESE)

3.1 Introducción. Dr. Braulio Gutiérrez Medina

Una de las herramientas de la fotónica desarrollada y aplicada con mayor éxito al estudio de los sistemas biológicos es la pinza (o trampa) óptica, la cual es capaz de manipular materiales dieléctricos, células y macromoléculas a escala micro y nanométrica utilizando luz. En su geometría más sencilla, una pinza óptica está formada por un haz de láser enfocado por medio de un objetivo de microscopio de alta apertura numérica, hasta alcanzar el tamaño mínimo establecido por la difracción (~200 nm) [1]. Al interaccionar con el haz enfocado, partículas dieléctricas (que incluyen a las células), son atraídas hacia el punto focal del láser y confinadas en las tres dimensiones espaciales, resultando efectivamente atrapadas (Figura 1A). La capacidad de la luz para ejercer efectos mecánicos sobre objetos materiales es conocida desde finales del siglo XIX. Sin embargo, la invención del láser permitió la posibilidad de observar tales efectos, y es en la década de 1970-1980 cuando Arthur Ashkin realizó los primeros experimentos de manipulación de esferas micrométricas de látex en agua [1].

Las pinzas ópticas funcionan debido a la interacción entre el campo eléctrico de la luz (E) con el dipolo eléctrico oscilante (P) inducido por la luz misma en las partículas dieléctricas $(\mathbf{P} = \alpha \mathbf{E}, \text{ en donde } \alpha \text{ es la susceptibilidad eléctrica del material})$. Al considerar valores temporales promedio, se encuentra que la fuerza ejercida por la luz sobre la partícula es igual a: $\mathbf{F} = (1/2) \alpha$, $\mathbf{E}_0^2 \nabla \varphi + (1/4) \alpha$, $\nabla \mathbf{E}_0^2$, en donde \mathbf{E}_0 y φ son la amplitud y la fase del campo eléctrico asociado a la luz, respectivamente, y α ', α '' son las componentes real e imaginaria de α, respectivamente [2]. Al primer término, $\mathbf{F}_{rad} = (1/2) \alpha$ $\mathbf{E}_0^2 \nabla \varphi$, se conoce como fuerza de radiación y es proporcional la intensidad luminosa. El segundo término de la fuerza total, $\mathbf{F}_{\text{dip}} = (1/4) \alpha' \nabla E_0^2$, se conoce como fuerza dipolar y es proporcional al gradiente de la intensidad. Por tanto, cualquier objeto dieléctrico experimentará dos fuerzas en presencia de un haz luminoso: una (F_{rad}) que lo empuja en la dirección de propagación del haz y otra (F_{dip}) que lo empuja hacia regiones de intensidad alta, es decir, en dirección del gradiente luminoso. En la práctica, se utilizan objetivos de microscopio de gran apertura numérica (AN \geq 1.2) por lo que el gradiente ∇ I creado con el haz enfocado es tan grande que la componente F_{rad} resulta despreciable. Entonces, al pasar el haz de láser por el objetivo de microscopio, se crea un gradiente en tres dimensiones que confina a una partícula micrométrica en el punto focal del haz [3], y al trasladar el haz en el plano focal, la partícula sigue estos movimientos. Se tienen, pues, unas pinzas hechas de luz.

Una pinza óptica no sólo es capaz de manipular micropartículas, sino que además puede determinar los desplazamientos y las fuerzas experimentadas por estas mismas micropartículas. La detección de estos movimientos se logra haciendo un seguimiento de la posición del láser después de interaccionar con la partícula coloidal, de una forma similar a la utilizada en un microscopio de fuerza atómica [3]. Cuando la partícula se mueve respecto al centro del láser, la trayectoria del haz cambia ligeramente, lo cual puede ser registrado por un fotodetector de posición (Figura 1B). A través de una calibración, se relaciona el voltaje producido por el fotodetector con el desplazamiento de la partícula relativo al centro del láser. Mediante esta técnica se logra obtener una gran sensibilidad en la detección de distancias (<1 nm) y en la aplicación de fuerzas (1-100 pN). Esta característica hace de las

pinzas ópticas una técnica ideal para estudiar, de manera directa, problemas fundamentales en biología.

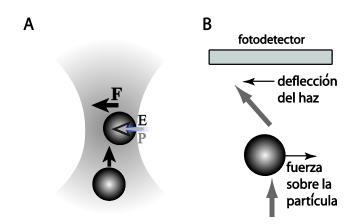


Figura 1. Principios de operación de las pinzas ópticas. (A) Un haz enfocado (gris claro) crea un gradiente de intensidad óptica, cuyo campo eléctrico (E) induce un dipolo eléctrico (P) en una partícula coloidal (esferas). La interacción de P con E resulta en fuerzas que empujan a la partícula hacia el centro del haz desde cualquier dirección. (B) Al desplazarse fuera del centro del haz, la partícula desvía el láser de forma proporcional a su desplazamiento, lo cual puede ser medido con un fotodetector de posición del haz láser.

3.1.1 Las pinzas ópticas aplicadas a la biología molecular

Las pinzas ópticas son una de las herramientas básicas en el arsenal del campo conocido como *Biofísica de moléculas individuales*, en donde se estudian las propiedades fisicoquímicas, las interacciones y la dinámica de macromoléculas biológicas, una a una. En general, las macromoléculas biológicas mismas no pueden ser manipuladas por la pinza óptica de manera directa (debido a que son demasiado pequeñas), por lo que se une la molécula de interés a una micropartícula que sí pueda ser manipulada por el láser. Así, el medio bajo el cual funciona una pinza óptica es coloidal, en donde partículas de vidrio o plástico con tamaños comprendidos entre 50 nm y 10 µm se encuentran dispersas en medios acuosos cuyas condiciones de pH, salinidad y concentraciones de moléculas pequeñas (como ATP) se asemejan a las condiciones intracelulares.

Para manipular macromoléculas en un experimento típico de molécula única, la proteína o el ácido nucleico bajo estudio es marcado en uno o más sitios en la superficie de su estructura tridimensional con moléculas pequeñas (marcadores) que puedan ser reconocidas por un ligando o anticuerpo, por ejemplo cadenas de histidinas (reconocidas por el anticuerpo anti-histidina), biotinas (reconocidas por la proteína estreptavidina), y otras. Luego, partículas coloidales recubiertas con los anticuerpos o ligandos correspondientes se incuban con las macromoléculas de interés, utilizando concentraciones tales que la mayoría de las partículas unan sobre su superficie una sola macromolécula. Finalmente, ya bajo el microscopio, se usan pinzas ópticas para sujetar una partícula coloidal y colocarla cerca de la superficie del portaobjetos, misma que está recubierta con un sustrato o con un segundo anticuerpo. De esta forma, la molécula bajo estudio queda bajo tensión, unida por un extremo a la superficie del portaobjetos y por el otro unida a la partícula coloidal. En otra geometría, se utilizan dos esferas dieléctricas para sujetar a la molécula biológica de

interés. Finalmente, interacciones con otras proteínas o moléculas presentes en la solución, promueven cambios conformacionales o de posición en la molécula bajo estudio, mismos que son transmitidos a la partícula coloidal y que finalmente son registrados con la pinza óptica

Debido a su versatilidad y a ser una técnica mínimamente invasiva [4], las pinzas ópticas han tenido un gran impacto en las ciencias biológicas [5-7]: con ellas ha sido posible avanzar en el conocimiento del mecanismo de motores moleculares, estructura del citoesqueleto y propiedades de ácidos nucleicos. Ejemplos de proteínas motoras estudiadas con pinzas ópticas, *in vitro*, son la polimerasa de ARN [8], el ribosoma [9], la miosina [10], la cinesina [11], el rotor flagelar bacteriano [12] y el motor que empaca ADN en cápsides virales [13], entre otras. Por parte de los ácidos nucleicos, las propiedades poliméricas tanto del ADN [14] como del ARN [15] han sido estudiadas, así como las propiedades enzimáticas de ribointerruptores [16]. Cabe mencionar que, en el caso de la polimerasa de ARN (ARNP), las pinzas ópticas han permitido observar en tiempo real el proceso fundamental de transcripción, en donde la proteína se desplaza por el templado de ADN y crea una nueva molécula de ARN. En un experimento clásico llevado a cabo en 2005 [8], se observó a la molécula de ARNP avanzar sobre el templado en pasos cuyo tamaño corresponde a la distancia entre bases individuales del ADN, es decir, 3.4 Å.

3.1.2. Las pinzas ópticas: Estado del arte en México

El uso de las pinzas ópticas en México es creciente aunque aún limitado. Actualmente existen grupos experimentales que cuentan con un sistema de pinzas ópticas funcional en el IF-UNAM, el INAOE, el CICESE, el CFATA-UNAM, la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, en la UASLP (Instituto de Física y Facultad de Ingeniería), el IPICYT y la UAM-I. En todos estos grupos se cuenta con al menos un sistema de pinzas ópticas que es capaz de manipular micropartículas colodiales así como células vivas. Sin embargo, la calibración de las pinzas y su uso para estudiar desplazamientos y fuerzas en sistemas biológicos sólo se ha reportado en los grupos del IF-UASLP y del IPICYT [17]. En particular, en el grupo del IPICYT se han logrado realizar dos ensayos a nivel de molécula única: (i) seguir los desplazamientos y las fuerzas de la proteína motora cinesina avanzando sobre microtúbulos, y (ii) medir la longitud de persistencia en moléculas individuales de ADN de doble cadena.

- [1] Ashkin, A. (1997) Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 4853-4860.
- [2] Gutiérrez-Medina, B. (2004) in Physics Department, The University of Texas at Austin, Austin, TX.
- [3] Neuman, K. C., and Block, S. M. (2004) Optical trapping. Review of Scientific Instruments 75, 2787-2809.
- [4] Neuman, K. C., Chadd, E. H., Liou, G. F., Bergman, K., and Block, S. M. (1999) Characterization of Photodamage to Escherichia coli in Optical Traps. 77, 2856-2863.

- [5] Svoboda, K., and Block, S. M. (1994) Biological Applications of Optical Forces. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 23, 247-285.
- [6] Gallagher, R., and Perkel, J. (2005) Seven Cheers for Technology. The Scientist 19, 6.
- [7] Gross, S. P. (2003) Application of optical traps in vivo. Methods in Enzymology 361, 162-174.
- [8] Abbondanzieri, E. A., Greenleaf, W. J., Shaevitz, J. W., Landick, R., and Block, S. M. (2005) Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. Nature 438, 460-465.
- [9] Wen, J.-D., Lancaster, L., Hodges, C., Zeri, A.-C., Yoshimura, S. H., Noller, H. F., Bustamante, C., and Tinoco, I. (2008) Following translation by single ribosomes one codon at a time. Nature 452, 598-603.
- [10] Finer, J. T., Simmons, R. M., and Spudich, J. A. (1994) Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. Nature 368, 113-119.
- [11] Svoboda, K., Schmidt, C. F., Schnapp, B. J., and Block, S. M. (1993) Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. Nature 365, 721-727.
- [12] Berg, H. C. (2003) The Rotary Motor Of Bacterial Flagella. Annual Review of Biochemistry 72, 19-54.
- [13] Chemla, Y. R., Aathavan, K., Michaelis, J., Grimes, S., Jardine, P. J., Anderson, D. L., and Bustamante, C. (2005) Mechanism of Force Generation of a Viral DNA Packaging Motor. Cell 122, 683-692.
- [14] Bustamante, C., Smith, S. B., Liphardt, J., and Smith, D. (2000) Single-molecule studies of DNA mechanics. Current Opinion in Structural Biology 10, 279-285.
- [15] Liphardt, J., Onoa, B., Smith, S. B., Tinoco, I., Jr., and Bustamante, C. (2001) Reversible Unfolding of Single RNA Molecules by Mechanical Force. Science 292, 733-737.
- [16] Greenleaf, W. J., Frieda, K. L., Foster, D. A. N., Woodside, M. T., and Block, S. M. (2008) Direct Observation of Hierarchical Folding in Single Riboswitch Aptamers. Science 319, 630-633.
- [17] C.N. Hernández Candia, S. Tafoya Martínez, B. Gutiérrez-Medina. "A minimal optical trapping and imaging microscopy system," PLoS ONE 8(2), e57383 (2013).

3.2. Manipulación celular con pinzas ópticas. Dr. José Luis Hernández Pozos

Estado del arte en el mundo

En 1969, Arthur Ashkin desarrolló las ideas básicas para atrapar objetos pequeños usando la fuerza de presión de radiación electromagnética [1]. Años más tarde, mostró que esta técnica, alimentada por una fuente láser adecuada, era capaz de manipular partículas biológicas como virus, bacterias y células. Para ello utilizó láseres en el infrarrojo que ayudaron a reducir el daño causado por absorción de la materia orgánica [2].

Las pinzas ópticas es un instrumento derivado de estas ideas de confinamiento usando luz láser, y desde su invención en 1986 [3] y, a partir de la comprensión teórica de esta técnica y la multitud de aplicaciones que esto ha propiciado, ha permitido medir propiedades ópticas y mecánicas tanto de objetos individuales, así como la manipulación y

ordenamiento colectivo de varios objetos a la vez, tanto si éstos son orgánicos o inorgánicos, que se encuentran en la escala de tamaño nano y micrométrico [4,5].

Entre las ventajas principales de esta técnica sobresalen el que no es necesario algún contacto físico, lo que la hace ser un método ad hoc en la manipulación no invasiva. La resolución espacial y de medida de la fuerza son otros factores importantes, ya que sistemas de este tipo permiten posicionar objetos con precisión de ~1 nm y medir fuerzas de interacción que van desde unidades hasta centenas de piconewtons (10⁻¹² N) que encajan con las fuerzas desarrolladas por sistemas biológicos [6].

Lo anterior, la ha llevado a convertirse en una herramienta pionera en manipular células in vivo [7], y realizar cirugías y manipulación simultáneas de una sola célula in vitro [8,9]. El desarrollo de esta novedosa tecnología ha sido de gran ayuda al estudiar enfermedades y desórdenes metabólicos con fines de diagnóstico incluyendo la manipulación de glóbulos rojos individuales [10,11,12], así como en el monitoreo de los cambios de células durante la progresión de algún tipo de cáncer [13].

Un atractivo que le da mayor utilidad a ésta herramienta sobre otras técnicas de micromanipulación radica principalmente en su simplicidad, robustez y compatibilidad con técnicas modernas de espectroscopia y microscopia óptica [14,15].

Estado del arte en México

La investigación con pinzas ópticas es relativamente joven en el mundo, y aún más nueva en México. La manipulación de objetos celulares con esta técnica, desafortunadamente no ha sido tratada sino hasta muy recientemente y debido a que esta temática es muy joven se refleja en la casi inexistencia de laboratorios especializados acompañada de la escasa infraestructura de estos y la incipiente formación de recursos humanos. Respecto a la manipulación de células con pinzas ópticas, la actividad en México se reduce a la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa (UAM-I) y en el Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (IF-UASLP).

UAM-I

La línea en la cual se está dirigiendo la investigación en esta casa de estudios es hacia la medida de la deformación de glóbulos rojos, cuya pérdida o alteración de esa capacidad de respuesta a esfuerzos mecánicos, a menudo se relaciona con la aparición o desarrollo de alguna enfermedad.

UASLP

En este instituto se tiene por interés estudiar las propiedades mecánicas de células cancerígenas.

- [1] A. Ashkin, "Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure", Phys. Rev. Lett. (1970), 24, 156--159.
- [2] A. Ashkin and J. M. Dziedzic and T. Yamane, "Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams", Nature (1987), 330, 769 771.
- [3] A. Ashkin and J. M. Dziedzic and J. E. Bjorkholm and S. Chu, "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles", Opt. Lett. (1986), 11, 288--290.

- [4] K. Svoboda and S. M Block., "Biological applications of optical forces", Annual review of biophysics and biomolecular structure (1994), 23, 247--285.
- [5] F. Dawood and S. Qin and L. Li and E. Y. Lin and J. T. Fourkas, "Simultaneous microscale optical manipulation, fabrication and immobilisation in aqueous media", Chem. Sci. (2012), 3, 2449-2456.
- [6] A. Yu Maklygin and A. V. Priezzhev and A. Karmenian and Sergei Yu Nikitin and I. S. Obolenskii and Andrei E. Lugovtsov and Kisun Li, "Measurement of interaction forces between red blood cells in aggregates by optical tweezers", Quantum Electronics (2012), 6, 42, 500.
- [7] Z. Min-Cheng and W. Xun-Bin and Z. Jin-Hua and W. Zi-Qiang and L. Yin-Mei, "Trapping red blood cells in living animals using optical tweezers", Nature Communications (2013), 4.
- [8] Y. Wu and D. Sun and W. Huang, "Mechanical force characterization in manipulating live cells with optical tweezers", Journal of Biomechanics (2011), 44, 741 746.
- [9] J. Ando and G. Bautista and N. Smith and K. Fujita and V. R. Daria, "Optical trapping and surgery of living yeast cells using a single laser", Review of Scientific Instruments (2008), 79, 103705.
- [10] S. Suresh and J. Spatz and J. P. Mills and A. Micoulet and M. Dao and C. T. Lim and M. Beil and T. Sefferlein, "Conections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria", Acta Biomaterialia (2005), 1, 15-30.
- [11] J. Crick and M. Theron and T. Tiffert and V. L. Lew and P. Cicuta and J. C. Rayner, "Quantitation of Malaria Parasite-Erythrocyte Cell-Cell Interactions Using Optical Tweezers", Biophysical Journal (2014), 107, 846 853.
- [12] G. Tomaiuolo, "Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics", Biomicrofluidics (2014), 8, 054114.
- [13] J. Guck and S. Schinkinger and Bryan Lincoln and Falk Wottawah and Susanne Ebert and Maren Romeyke and Dominik Lenz and Harol..., "Optical Deformability as an Inherent Cell Marker for Testing Malignant Transformation and Metastatic Competence", Biophysical Journal (2005), 88, 3689 3698.
- [14] W. M. Lee and P. J. Reece and R. F. Marchington and N. K. Metzger and K. Dholakia, "Construction and calibration of an optical trap on a fluorescence optical microscope", Nature Protocols (2007), 2, 3226 -- 3238.
- [15] G. Rusciano and A. C. De Luca and G. Pesce and A. Sasso, "Raman Tweezers as a Diagnostic Tool of Hemoglobin-Related Blood Disorders", Sensors (2008), 8, 7818-7832.

3.3. Atrapamiento de Micropartículas con Fibra Óptica. Dr. Héctor Hugo Cerecedo Núñez

Estado del arte en el mundo

El atrapamiento con fibra óptica es un tipo de atrapamiento que se ha desarrollado recientemente y ha presentado ciertas ventajas con respecto a otro tipo de técnicas para la manipulación óptica [1]. Existen muchas variantes de este método así como un gran número de aplicaciones. Las trampas de fibra óptica utilizan el mismo principio físico que las trampas ópticas convencionales solo que aquí no se utiliza un haz focalizado sino un par de haces divergentes contrapropagándose a la salida de un par de fibras puestas una delante

de otra. Recientemente se ha demostrado que también puede emplearse una sola fibra, solo que debe modificarse su punta [2-4].

El atrapamiento con fibra óptica fue reportado por vez primera en 1993 por A. Constable y colaboradores, ellos desarrollaron una trampa con fibra óptica en la cual atraparon micropartículas de poliestireno con diámetros entre 0.1 y 10 μm, y células de levadura. Desde entonces se han desarrollado diversas modificaciones y aplicaciones.

Es indudable que el atrapamiento con fibra óptica es muy útil en los estudios de biofotónica, esto, dado las ventajas de direccionalidad, accesibilidad y características únicas que las fibras poseen.

Estado del arte en México

Respecto al ámbito nacional y en el tema específico de atrapamiento óptico, empleando fibra óptica, apenas existen los primeros reportes y productos al respecto, ello en el Laboratorio de Óptica Aplicada, de la Facultad de Física en la Universidad Veracruzana [5-8].

- [1] A. Ashkin. Optical Trapping and Manipulation of Neutral Particles Using Laser. (World Scientific, Singapur, 2006), p.p. 5-11.
- [2] A. Constable, Jinha Kim, J. Mervis, F. Zarinetchi, M. Prentiss. "Demonstration of a-fiber-optical light-force trap", Optics Letters, Vol. 18, No. 21, (1993), 1867-1869.
- [3] E. R. Lyons, G. J. Sonek, "Confinement and bistability in a tapered hemispherically lensed optical fiber trap". Appl. Phys. Lett., Vol. 66, No. 13, (1995), 1584-1586.
- [4] H.H. Cerecedo-Núñez, et. al., "Optical Fiber Trap: Radiation pressure effect on inorganic and organic micro-particles". Proc. of SPIE Vol. 8785, 878566, (2013). doi: 10.1117/12.2026435.
- [5] "Numeric modeling approximation of the fluid dynamics in an optical fiber trap"
- J. E. Hernández Zavala; H. H. Cerecedo Nuñez; M. O. Vigueras Zuñiga; P. Padilla Sosa. Proc. SPIE 9164, Optical Trapping and Optical Micromanipulation XI, 91642U (September 16, 2014); doi:10.1117/12.2061147. Optical Trapping and Optical Micromanipulation XI. Editor(s): Kishan Dholakia; Gabriel C. Spalding Volume Number: 9164. Date Published: 9 October 2014. Softcover: 69 papers (530) pages. ISBN: 9781628411911
- [6] "Optical fiber trap: radiation pressure effect on inorganic and organic micro-particles" H. H. Cerecedo-Núñez, J. C. Alvarado-Zacarías, P. Padilla-Sosa, M. A. Basurto-Pensado, M. May-Alarcón, R. Ramos-García, L. Beltrán-Parrazal. Proc. SPIE 8785, 8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Applications, 878566 (November 18, 2013); doi: 10.1117/12.2026435.
- [7] Tesis de Licenciatura "Atrapamiento óptico utilizando un modelo de trampa con fibras ópticas" Juan Carlos Alvarado Zacarías Asesor, Héctor Hugo Cerecedo Núñez Co-asesor, Dra. Patricia Padilla Sosa Facultad de Física e Inteligencia Artificial, UV. 19 de Abril de 2013
- [8] Tesis de Licenciatura "Cálculo numérico del efecto de la presión de radiación en micro partículas aplicado al caso de una fibra óptica" Laura Carrasco Fadanelli Asesor, Héctor

Hugo Cerecedo Núñez Co-asesor, Dra. Patricia Padilla Sosa Facultad de Física e Inteligencia Artificial, UV. 14 de Marzo de 2014

3.4. Haces estructurados. Dr Ulises Ruiz Corona y Rubén Ramos García

Estado del arte en el mundo

El estudio de las propiedades de la luz ha llevado a la caracterización de las componentes que la conforman, es decir, amplitud, fase y polarización. Para esto se recurre a las ecuaciones de Maxwell que describen teóricamente dichas componentes, así como su propagación en diferentes medios. La forma más simple de una onda electromagnética es la onda plana, la cual es solución a la ecuación de onda en coordenadas cartesianas; sin embargo expresando la ecuación de onda en diferentes sistemas coordenados se han encontrado otro tipo de haces con modulación tanto en amplitud como en fase, tales como: Laguerre- Gauss [1-3], Bessel [4-7], Weber[8], Mathieu [9, 10], Pearcey [11], Ince [28,29], entre otros. Debido a las interesantes cualidades que poseen dichos haces (como la capacidad de transferir momento angular orbital)se han desarrollado diferentes técnicas para generarlos experimentalmente. Uno de los métodos más empleados han sido los hologramas generados por computadora. Estos permiten codificar cualquier haz a partir de la expresión matemática que lo describe. Inicialmente se emplearon los hologramas de amplitud [12, 13]; sin embargo debido principalmente a las limitaciones de eficiencia en intensidad (lo cual es de suma importancia en ciertas aplicaciones) fueron desarrollados los hologramas de fase [14, 15] y más recientemente se han reportado los hologramas de polarización [16]. Todos los tipos de hologramas presentan una buena calidad en los haces generados por lo que para crear físicamente dichos hologramas se han empleado técnicas como impresión en películas fotográficas, litografía, escritura laser directa sobre materiales fotosensibles, interferencia de múltiples haces. Una desventaja de este tipo de métodos es que una vez que son grabados los hologramas no pueden ser modificados, por lo que en la actualidad están siendo explotados ampliamente los moduladores espaciales de luz, los cuales permiten un control dinámico en la generación de haces estructurados [17-19]. En general, mediante moduladores espaciales de luz se han podido generar haces con distribuciones de intensidad y fase. Estos haces no necesariamente son soluciones a la ecuación de onda paraxial. Estas distribuciones de luz son creadas por métodos interactivos como el algoritmo Gerber-Saxon y sus variantes mejoradas.

Entre la gran cantidad de aplicaciones que tienen los haces estructurados una de las más importantes en el campo de la biología y medicina, son las pinzas ópticas holográficas, debido a que estas permiten la manipulación múltiple de microorganismos de una forma controlada para de esta forma poder caracterizar sus propiedades principales [20-22].

Estado del Arte en México

El estudio tanto teórico como experimental de haces estructurados en México ha sido muy importante desde la década de los 90's. Uno de los precursores de este campo ha sido el Dr. Sabino Chávez, quien inicialmente en colaboración con grupos internacionales, reportó teóricamente el análisis de haces adifraccionales a partir de la ecuación no paraxial de onda en coordenadas cilíndricas, la cual tiene como solución a las funciones Bessel [23, 24].

Posteriormente se comenzaron a estudiar otros tipos de haces adifraccionales tales como: Weber [25], Mathieu [26, 27], Ince[28, 29], Circulares [30]. Además de la condición de adifraccionalidad existen otros que poseen aceleración, debido a que la dirección de su propagación no es recta si no describe una forma parabólica, dichos haces son denominados Airy [31]. Por lo que presentan efectos interesantes en la interacción con la materia, esto ha llevado al interés de poder obtenerlos experimentalmente. En este sentido, se han generado varios haces estructurados, principalmente con hologramas generados por computadora, y estudiado sus principales características. Algunos haces estructurados que han sido reportados son: Laguerre- Gauss [32], Hermite [33], Bessel [34, 35], Mathieu [36, 37], Parabólicos [38], Ince [39], Airy [40].

En el INAOE hemos usado los haces estructurados para manipular cientos de microparticulas con unos cuantos mW de potencia usando vortices cuya radio es independiente de la carga carga topológica del mismo (conocidos en la literatura como vortices perfectos). Esto es posible porque fuerzas termoforeticas son mas mayores que las fuerzas gradiente.

En cuanto a aplicaciones biológicas estamos estudiando el efecto de la terapia fotodinámica en las propiedades viscoelasticas de esporas de hongos dermatofitos. Esto es con el fin de evaluar en tiempo real la efectividad de la terapia y no esperar dos o tres dias a que crezcan al final de 2-3 dias. En un futuro inmediato, evaluaremos la efectividad en lineas celulares de cancer de mama.

- [1] E. Abramochkin, V. Volostnikov, "Beam transformation and nontransformed beams," Opt. Comm. 83, 123-125 (1991).
- [2] S. R. Seshadri, "Virtual source for a Laguerre-Gauss beam," Opt. Lett. 27, 1872-1874 (2002)
- [3] N. Passilly, G. Martel, and K. Aït-Ameur, "Beam propagation factor of truncated laguerre-gauss beams," J. Mod. Opt. 51, 2279-2286 (2004).
- [4] L. C. Laycock and S. C. Webster, "Bessel beams: their generation and application," GEC J. Res. 10, 36–51 1992.
- [5] Zhiping Jiang, Qisheng Lu, and Zejin Liu, "Propagation of apertured Bessel beams," Appl. Opt. 34, 7183-7185 (1995)
- [6] S. Ruschin, "Modified Bessel nondiffracting beams," J. Opt. Soc. Am. A 11, 3224-3228 (1994)
- [7] L. Vicari, "Truncation of non diffracting beams," Opt. Comm. 70, 263-266 (1989).
- [8] Peng Zhang, Yi Hu, Tongcang Li, Drake Cannan, Xiaobo Yin, Roberto Morandotti, Zhigang Chen, and Xiang Zhang, "Nonparaxial Mathieu and Weber Accelerating Beams," Phys. Rev. Lett. 109, 193901 (2012).
- [9] C. A. Dartora, M. Zamboni-Rached, K. Z. Nóbrega, E. Recambi, and H. E. Hernández-Figueroa, "General formulation for the analysis of scalar diffraction-free beams using angular modulation: Mathieu and Bessel beams," Opt Comm. 22, 75-80 (2003).
- [10] A. Chafiq, Z. Hricha, A. Belafhal, "A detailed study of Mathieu-Gauss beams propagation through an apertured ABCD optical system," Opt. Comm. 265, 594-602 (2006).

- [11] J. D. Ring, J. Lindberg, A. Mourka, M. Mazilu, K. Dholakia, and M. R. Dennis, "Auto-focusing and self-healing of Pearcey beams," Opt. Express 20, 18955-18966 (2012)
- [12] J. Salo, J. Meltaus, E. Noponen, J. Westerholm, M.M. Salomaa, A. Lönnqvist, J. Säily, J. Häkli, J. Ala-Laurinaho and A.V. Räisänen, "Millimetre-wave Bessel beams using computer holograms," Electronics Letters 37, 13 (2001)
- [13] A. Vasara, J. Turunen, and A. T. Friberg, "Realization of general nondiffracting beams with computer-generated holograms," J. Opt. Soc. Am. A6, 1748-1754 (1989).
- [14] N. R. Heckenberg, R. McDuff, C. P. Smith, and A. G. White, "Generation of optical phase singularities by computer-generated holograms," Opt. Lett. 17, 221-223 (1992)
- [15] V. V. Kotlyar, H. Elfstrom, J. Turunen, A. A. Almazov, S. N. Khonina, and V. A. Soifer, "Generation of phase singularity through diffracting a plane or Gaussian beam by a spiral phase plate," J. Opt. Soc. Am. A 22, 849-861 (2005).
- [16] U. Ruiz, P. Pagliusi, C. Provenzano, K. Volke-Sepúlveda, and Gabriella Cipparrone, "Polarization holograms allow highly efficient generation of complex light beams," Opt. Express 21, 7505-7510 (2013)
- [17] N. Chattrapiban, E. A. Rogers, D. Cofield, W. T. Hill, and R. Roy, "Generation of nondiffracting Bessel beams by use of a spatial light modulator," Opt. Lett. 28, 2183-2185 (2003)
- [18] M. T. Gruneisen, W. A. Miller, R. C. Dymale, and A. M. Sweiti, "Holographic generation of complex fields with spatial light modulators: application to quantum key distribution," Appl. Opt. 47, A32-A42 (2008).
- [19] A. McGloin, G.C. Spalding, H. Melville, W. Sibbett, and K. Dholakia, "Applications of spatial light modulators in atom optics," Opt. Express 11, 158-166 (2003).
- [20] Y. Wu, D. Sun, and W. Huang, "Mechanical force characterization in manipulating live cells with optical tweezers," J. Biomechanics 44, 741-746 (2011).
- [21] X. Li, C. C. Cheaha, S. Hub, D. Sun, "Dinamic trapping and manipulation of biological cells with optical tweezers," Automatica 49, 1614-1625 (2013).
- [22] D. J. Carnegie, T. Cizmar, J. Baumgartl, F. J. Gunn-Moore, and K. Dholakia, "Automated laser guidance of neuronal growth cones using a spatial light modulator," J. Biophoton. 2, 682-692 (2009).
- [23] S. Chavez-Cerda, G.S. McDonald, and G.H.C. New, "Nondiffracting beams: travelling, standing, rotating and spiral waves," Opt. Comm. 123, 225-233 (1996).
- [24] S. Chávez-cerda, "A new approach to bessel beams," Journal of Modern Optics 46, 923-930 (1999).
- [25] M. A. Bandres and B. M. Rodríguez-Lara, "Nondiffracting accelerating waves: Weber waves and parabolic momentum," New Journal of Physics 15, (2013).
- [26] J. C. Gutiérrez-Vega, M. D. Iturbe-Castillo, and S. Chávez-Cerda, "Alternative formulation for invariant optical fields: Mathieu beams," Opt. Lett. 25, 1493-1495 (2000).
- [27] Julio C Gutiérrez-Vega, RM Rodriguez-Dagnino, MA Meneses-Nava, S Chávez-Cerda, "Mathieu functions, a visual approach," American Journal of Physics 71, 233-242 (2003).
- [28] Miguel A. Bandres and Julio C. Gutiérrez-Vega, "Ince-Gaussian beams," Opt. Lett. 29, 144-146 (2004)
- [29] Miguel A. Bandres and Julio C. Gutiérrez-Vega, "Ince—Gaussian series representation of the two-dimensional fractional Fourier transform," Opt. Lett.30, 540-542 (2005)
- [30] Miguel A. Bandres and Julio C. Gutiérrez-Vega, "Circular beams," Opt. Lett. 33, 177-179 (2008)

- [31] Miguel A. Bandres and Julio C. Gutiérrez-Vega, "Airy-Gauss beams and their transformation by paraxial optical systems," Opt. Express15, 16719-16728 (2007)
- [32] Victor Arrizón, Ulises Ruiz, RosibelCarrada, and Luis A. González, "Pixelated phase computer holograms for the accurate encoding of scalar complex fields," J. Opt. Soc. Am. A 24, 3500-3507 (2007)
- [33] Dilia Aguirre-Olivas, Gabriel Mellado-Villaseñor, David Sánchez-de-la-Llave, and Victor Arrizón, "Efficient generation of Hermite-Gauss and Ince-Gauss beams through kinoform phase elements," Appl. Opt. 54, 8444-8452 (2015)
- [34] Victor Arrizón, Guadalupe Méndez, and David Sánchez-de-La-Llave, "Accurate encoding of arbitrary complex fields with amplitude-only liquid crystal spatial light modulators," Opt. Express 13, 7913-7927 (2005)
- [35] VíctorArrizón, David Sánchez-de-la-Llave, Ulises Ruiz, and Guadalupe Méndez, "Efficient generation of an arbitrary nondiffracting Bessel beam employing its phase modulation," Opt. Lett. 34, 1456-1458 (2009)

3.5. Microfluídica. Dr. Víctor Ruiz Cortés

Estado del arte en el mundo

Microfluídica es la parte de la ciencia y tecnología que estudia la manipulación y el control de fluidos en la escalas de submililitros en redes de canales cuya sección transversal tiene dimensiones que van de decenas a centenas de micrómetros, aunque recientemente se han reportado dimensiones nanométricas[1]. Ésta es una disciplina reciente que inició en los 90s y ha tenido un rápido crecimiento lo que ha permitido desarrollo de dispositivos microfluídicos tales como los micro-laboratorios ("Lab on a Chip"), que realizan procesos convencionales en el área de la bioingeniería, biomedicina, entre otros, con ventajas atractivas como la reducción de tiempo de análisis, menor cantidad de muestra y reactivos, portabilidad, mayor sensibilidad y bajo costo[2].

Uno de los primeros objetivos para la comunidad en microfluídica ha sido el desarrollar tecnologías que incrementen el potencial de los investigadores en biología e investigación médica[3]. Muchos de los estudios en microfluídica describen métodos que pueden reemplazar aquellos utilizados a macroescala y se presentan como experimentos de prueba de concepto que intenta demostrar la eficiencia de esta nueva tecnología[4]. El número de artículos publicados en microfluídica ha aumentado exponencialmente desde el año 2000 [3], siendo revistas de ingeniería con aplicaciones para la microfluídica donde ha crecido principalmente. Para un futuro cercano, es necesario incrementar el uso de tecnologías de microfluídos en el área de investigación biomédica para la detección temprana de enfermedades, detección de una sola molécula, biología celular [5], clasificación de células[6], etc.

Estado del Arte en México

En México, el uso de la tecnología de microfluídica se utiliza en varias ramas de la ciencia y en diversas instituciones como la Facultad de Ingeniería y de Química de la Universidad Autónoma de México (UNAM) [7], en el CINVESTAV –Monterrey [8], en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) [9,10], ITESM

[11], Centro de Investigaciones en Óptica [12], Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP)

En la Facultad de Ingeniería de la UNAM, se desarrollan sistemas BioMEMS para construir, a largo plazo, microlaboratorios en los que se puedan efectuar análisis como los que se hacen en uno común para estudiar sangre y orina, descomponer ADN o identificar virus o células cancerígenas. En el CINVESTAV—Monterrey se tienen líneas de investigación en aplicaciones de la microfluídica para el diagnóstico de enfermedades, estudio del sistema inmunológico y biología de sistemas. En el CICESE se diseñan y fabrican dispositivos microfluídicos para la clasificación de partículas ("cell sorting") incluyendo técnicas ópticas como pinzas óptica con posibles aplicaciones en la detección temprana de enfermedades. En el ITESM se utilizan en la búsqueda para acelerar los procesos de detección de microorganismos en alimentos empleando métodos electrocinéticos; para ello se investigan las fases de separación y concentración de biopartículas a niveles microscópicos. En el CIO, se diseñan y construyen dispositivos microfluídicos con el fin de integrar dentro de éstos dispositivos de fibra óptica y construir en el futuro sensores optofluídicos. En la UASLP para la generación de burbujas de cavitación en una región controlada.

Existen varios grupos que trabajan con sistemas microfluídicos, pero son pocos los que cuentan con un laboratorio dedicado a la fabricación de estos.

- [1] Shaurya Prakash and Junghoon Yeom, Nanofluidics and Microfluidics (2012) Elsevier Inc.
- [2] Lisa R. Volpatti, Ali K. Yetisen, "Commercialization of microfluidic devices", Trends in Biotechnology, **32**, 7, 347-350, (2014).
- [3] E.K. Sackmann, A.L. Fulton, and D.J. Beebe, "The present and future role of microfluidics in biomedical research" Nature **507**, 181-189, (2014).
- [4] Streets, A. M., & Huang, Y. (2013). "Chip in a lab: Microfluidics for next generation life science research". *Biomicrofluidics*, 7(1), 011302. http://doi.org/10.1063/1.4789751
- [5] Velve-Casquillas, G., Le Berre, M., Piel, M., & Tran, P. T. (2010). "Microfluidic tools for cell biological research". *Nano Today*, *5*(1), 28–47. http://doi.org/10.1016/j.nantod.2009.12.001
- [6] Shields, C. W., Reyes, C. D., & López, G. P. (2015). "Microfluidic Cell Sorting: A Review of the Advances in the Separation of Cells from Debulking to Rare Cell Isolation". *Lab on a Chip*, *15*(5), 1230–1249. http://doi.org/10.1039/c4lc01246a
- [7] Hautefeuille M, Cabriales L, Pimentel-Domínguez R, Velázquez V, Hernández-Cordero J, Oropeza-Ramos L, Rivera M, Carreón-Castro MP, Grether M, López-Moreno E. "New perspectives for direct PDMS microfabrication using a CD-DVD laser" Lab Chip (2013),13, 24:4848-54 doi: 10.1039/c3lc51041g.
- [8] R.E. Sósol-Fernández, V.M. Marín-Lizárraga, E. Rosales-Crualey, and B.H. Lapizco-Encinas, "Análisis de células en dispositivos microfluídicos", Rev. Mex. Ing. Quim (2012) 11,2,227-248.
- [9] Ayala Cruz H. C., (2013). Diseño de un sistema optofluídico para la manipulación de partículas. Tesis de Maestría en Ciencias. CICESE.

- [10] Martínez Manuel P. (2015). Diseño de un sistema optofluídico generador de gradiente Tesis de Maestría en Ciencias. CICESE.
- [11] Lynn NS Jr, Martínez-López JI, Bocková M, Adam P, Coello V, Siller HR, Homola J Bienes Bioelectron "Biosensing enhancement using passive mixing structures for microarray-based sensors," **54**:506-14 (2014). doi: 10.1016/j.bios.2013.11.027
- [12] S. Calixto, M. Rosete-Aguilar, D. Monzon-Hernandez, and V. Minkovich, "Capillary refractometer integrated in a microfluidic configuration," Appl. Opt. 47, 843-848 (2008).

3.6. Guiado óptico de proyecciones neuronales. Remy Avila Foucat y Elisa Tamaríz Domínguez

Estado del arte en el mundo

El proceso de proyección neuronal es fundamental en el desarrollo embrionario para la formación de conexiones en el sistema nervioso, y se da mediante proteínas secretadas y/o de la matriz extracelular que dirigen a las neuritas hacia blancos específicos [1]. Durante la neuroregeneración del tejido adulto, las neuronas deben re-establecer sus conexiones; sin embargo algunas de las señales que guiaron su proyección en estadíos embrionarios están ausentes o en menor cantidad. Además, en la lesión existen inhibidores de la proyección, lo que hace que este proceso sea ineficiente y parcial [2].

El aumento en la incidencia de enfermedades neurodegenerativas en la población cada vez más longeva, y la alta tasa de accidentes que provocan lesiones a nivel del sistema nervioso central, han resaltado la importancia de buscar alternativas de regeneración eficiente de este tejido; por lo que hay una gran cantidad de esfuerzos para comprender los mecanismos moleculares que favorecen la proyección y guía neuronal, y la búsqueda de proteínas y sustratos que ayuden a la regeneración del tejido nervioso [3]. En este contexto el guiado óptico puede ser una alternativa poco invasiva que permitiría dirigir las proyecciones neuronales haciendo más eficiente el proceso de neuroregeneración. Por lo anterior es necesario estudiar y comprender, para su posible desarrollo tecnológico y su aplicación biomédica a futuro, cuáles son los mecanismos biológicos que subyacen al fenómeno de guiado óptico de neuronas, de qué manera se puede optimizar, y cómo se puede escalar a un contexto tisular y del organismo completo.

Existen diversos mecanismos moleculares implicados en la proyección de neuritas (axones y dendritas), entre ellos la modulación del citoesqueleto y los mecanismos de adhesión al sustrato. El citoesqueleto, formado principalmente por microtubulos y filamentos de actina, se polimeriza y despolimeriza modulando el avance y retracción de estructuras celulares como los conos de crecimiento localizados al final de las neuritas [4]. Las proteínas de adhesión, presentes en la membrana celular regulan la unión de las células al sustrato y el acoplamiento del citoesqueleto a motores moleculares intracelulares, que a su vez genera la fuerza de tracción favoreciendo la proyección hacia delante de los conos de crecimiento [5]. Estos mecanismos se conocen para la respuesta a proteínas que estimulan y dirigen la proyección neuronal, y se ha sugerido que podrían estar implicados en la proyección mediada por pinzas ópticas [6,7], aunque no existen reportes de evidencias experimentales que lo demuestren. Se ha observado también que las pinzas ópticas inducen la formación de nuevas ramificaciones neuronales o colaterales [6], pero no se han reportado evidencias

sobre los mecanismos moleculares de formación, ni sobre cuáles son las condiciones óptimas de estimulación como por ejemplo el sitio ideal de enfoque del láser o el tipo de sustrato más adecuado, y menos aún sobre las condiciones para la estimulación a nivel del tejido en regeneración. El guiado óptico de neuronas es un tema de frontera que requiere un equipo de investigación multidiscipliario y de alto nivel académico en los campos de la óptica, las neurociencias y la biología celular.

Estado del arte en México

El estudio del guiado óptico de proyecciones neuronales en México ha sido desarrollado por un grupo interinstitucional encabezado por los Dres. Elisa Tamaríz (Universidad Veracruzana) y Remy Avila (CFATA-UNAM). Este grupo ha trabajado en la estimulación de la proyección celular por pinzas ópticas utilizando fibroblastos, estableciendo las condiciones de manejo y estimulación de células. Se mostró que los fibroblastos estimulados presentaron cambios más tempranos en su membrana cuando el láser incide en la zona más apical de las células [8]. Un trabajo similar ha sido emprendido trabajando con la línea celular PC12 de morfología neuronal. Los resultados previos permitieron concluir que es necesario aumentar la definición de las imágenes los contornos celulares y buscar la posibilidad de hacer marcajes moleculares de manera simultánea que permitan estudiar algunos mecanismos biológicos, lo que ha llevado a proponer el acoplamiento de las pinzas ópticas a un microscopio confocal con sistema diferencial de interferencia, que se encuentra parcialmente funcionando en CFATA-UNAM. Este trabajo formó parte de la tesis de licenciatura del Físico Joaquín Ascencio Rodríguez, como parte de la colaboración entre el laboratorio de óptica aplicada de la Universidad Veracruzana, a cargo del Dr. Hector Cerecedo Nuñez, el Laboratorio de Proyección Axonal y Neuroregeneración del Instituto de Ciencias de la Salud – Universidad Veracruzana, a cargo de la Dra. Tamariz y el grupo de pinzas ópticas del Dr. Avila que forma parte del laboratorio de Nanobio-Optica en CFATA-UNAM a cargo de la Dra. López. Adicionalmente y de manera muy reciente se ha comenzado a colabora con el Dr. Pablo loza Álvarez del Instituto de Ciencias Fotónicas en Barcelona, con quien se trabaja actualmente en la detección de proteínas fluorescentes del citoesqueleto y de adhesión celular, acopladas a variantes de la proteína verde fluorescente durante la estimulación con pinzas ópticas.

- [1] CS Goodman, CJ Shatz: Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 1993, 72 Suppl:77-98.
- [2] RJ Giger, ER Hollis, 2nd, MH Tuszynski: Guidance molecules in axon regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, 2:a001867.
- [3] K Krick, M Tammia, R Martin, A Hoke, HQ Mao: Signaling cue presentation and cell delivery to promote nerve regeneration. *Curr Opin Biotechnol* 2011, 22:741-6.
- [4] EW Dent, FB Gertler: Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 2003, 40:209-27.

- [5] DM Suter, P Forscher: Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol* 2000, 44:97-113.
- [6] A Ehrlicher, T Betz, B Stuhrmann, D Koch, V Milner, MG Raizen, J Kas: Guiding neuronal growth with light. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:16024-8.
- [7] DJ Carnegie, DJ Stevenson, M Mazilu, F Gunn-Moore, K Dholakia: Guided neuronal growth using optical line traps. *Opt Express* 2008, 16:10507-17.
- [8] NL Medina-Villalobos: Estudio de la estimulación en lamelipodios en la línea celular de fibroblastos NIH3T3 por la influencia de un laser altamente enfocado de 1064nm. Universidad de Guadalajara; 2014.

3.7. Estudio de sistemas dinámicos microscópicos. Karen Volke Sepúlveda & Iván Santamaría Holek

Estado del arte en el mundo

Desde finales del siglo XX inició una revolución científica en materia de biología celular y molecular, motivada por los grandes avances en técnicas de microscopía y espectroscopía (detección), así como en los mecanismos de manipulación (control) a escalas micro y nanométricas. Esto ha abierto las posibilidades de estudiar con detalle no sólo el aspecto estructural de los componentes celulares, sino su aspecto funcional, es decir, la comprensión de los mecanismos que tienen lugar dentro de la célula y que mantienen el delicado equilibrio de procesos vitales.

Más aún, el tener acceso al funcionamiento de los motores biológicos, ha inspirado también el desarrollo de micro y nanodispositivos artificiales que funcionen con base en principios similares, lo cual se conoce como biomimética [1, 2]. Sin embargo, hay muchos retos asociados al micro- y nano-escalamiento, algunos de los cuales fueron señalados desde 1960 por Richard Feynmann [3], quien evocó un divertimento sobre la posibilidad de tragarse al cirujano, es decir, un sistema médico de control remoto que pudiera tratar una enfermedad desde el interior del paciente, y se preguntó por los problemas de construir máquinas en miniatura. Mientras los efectos físicos de gran escala, como la inercia y el peso, pueden resultar insignificantes, los efectos de superficie dominan sobre los efectos de volumen a pequeña escala, como la tensión superficial y la cohesión. Por otra parte, el papel del ruido, como por ejemplo el movimiento Browniano inherente a cualquier sistema microscópico, resulta determinante en el funcionamiento de un dispositivo miniaturizado, al punto de que puede ser incluso aprovechado como un mecanismo de activación [1]. De hecho, se ha mostrado que las leves de la termodinámica fuera de equilibrio a escala microscópica no pueden ser derivadas como una simple extensión de las leyes macroscópicas [4]. Así mismo, se ha reconocido que al trabajar con unos pocos átomos, como es el caso a escalas nanométricas, los efectos cuánticos serán predominantes, por lo que habrá que aplicar las leyes cuánticas en lugar de las clásicas [5]. De ahí la importancia de desarrollar modelos experimentales y teóricos que permitan entender los principios físicos que operan a estas escalas, para eventualmente utilizarlos en la generación de nuevas tecnologías biofotónicas, incluyendo por ejemplo, métodos de diagnóstico y tratamiento en el terreno de las ciencias biomédicas.

Una herramienta que ha resultado particularmente útil en este contexto es la manipulación óptica de micro y nanopartículas [6]. Con ella se han podido investigar, por ejemplo, mecanismos tan enigmáticos como el surgimiento de transporte dirigido en presencia de fuerzas externas de promedio cero debido al rompimiento de simetrías espaciales y/o temporales [7]. Hay evidencias de que este proceso puede explicar el funcionamiento de algunos sistemas observados en la naturaleza, tales como los motores moleculares que realizan tareas de transporte intracelulares [8] o en los procesos de translocación de proteinas [9]. Mecanismos similares se han utilizado como esquema para separar y ordenar biomoléculas [10], células de distinto tipo [11] y otros tipos de partículas microscópicas [12-15].

Por otro lado, los estudios teóricos basados en termodinámica irreversible de sistemas pequeños (TISP) pueden ser de gran utilidad en la descripción de procesos o fenómenos controlados por luz. Ejemplos de estos procesos son los experimentos de moléculas individuales, donde el control óptico es de gran utilidad ya que minimiza la intrusión. En particular, se ha mostrado como la TISP ha ofrecido una visión consistente de los experimentos de estiramiento de moléculas de RNA o DNA, en los que los cambios conformacionales de las moléculas, inducidos por la aplicación de tensiones a través de pinzas ópticas, están asociados a procesos irreversibles [16-17]. Así, la fenomenología observada, los tiempos de permanencia y salto entre estados pueden reproducirse de manera consistente con aproximaciones tipo TISP [18]. Otro ejemplo de interés biológico está asociado con la activación de la dinámica de poros transitorios en vesículas modelo, en los que la membrana de la vesícula es iluminada con la longitud de onda adecuada, lo que induce un proceso de tensión de la misma y su ruptura inicial [19]. Este tipo de sistemas modelos resultan atractivos pues las vesículas son fuertes candidatos como microreactores y portadores de fármacos. El control fotónico de su acción en el cuerpo puede ser de gran relevancia en el campo de la nanomedicina.

Estado del arte en México

El estudio de sistemas dinámicos y termodinámica fuera de equilibrio a escala microscópica en México se ha cultivado ampliamente desde el punto de vista teórico. Entre los investigadores teóricos que han hecho contribuciones importantes en estos temas se pueden mencionar, de la UNAM, a Iván Santamaría (Facultad de Ciencias, Unidad Querétaro), Maximino Aldana y Francois Leyvraz (Instituto de Ciencias Físicas) y José Luis Mateos (Instituto de Física). También está Ramón Castañeda en la Universidad Autónoma de Guanajuato, Adrián Huerta en la Universidad Veracruzana, José Luis Arauz y Magdaleno Medina en el Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), varios investigadores de las áreas de Sistemas Complejos, Física de Líquidos y Mecánica Estadística de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, entre otros.

En cuanto a estudios experimentales, y concretamente haciendo uso de herramientas fotónicas como la micromanipulación óptica, esta área es relativamente nueva. Entre los investigadores que han hecho contribuciones en este terreno se pueden contar a Alejandro Vásquez y Karen Volke (Instituto de Física, UNAM), Rubén Ramos (INAOE), Ibis Ricárdez (Universidad Juárez Autónoma de Tabasco), y más recientemente, Pedro Quinto y Roberto León (Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM). Aunque cabe mencionar que en la

mayoría de los casos, dichas contribuciones comprenden no sólo investigación experimental, sino también modelos teóricos complementarios.

Es importante señalar, para concluir, que en el estudio de sistemas biológicos a nivel celular y molecular, así como en el desarrollo de sistemas físicos operando a escalas micro y nanométricas, es necesario contar con personas capaces de entender diferentes lenguajes científicos y técnicos, que puedan no sólo jugar el papel de intérpretes entre especialistas de distintas áreas, sino también aportar un conocimiento más integral para identificar problemas relevantes que se pueden abordar desde una perspectiva multidisciplinaria. Mientras en otros países hace ya varias décadas que se incluyen carreras con un perfil multidisciplinario, México ha dado los primeros pasos en esa dirección hace relativamente poco tiempo, y esta es una situación que se debe atender desde la política científica. Algunos ejemplos de esto son licenciaturas de reciente apertura como Ciencias de la Tierra, Física Biomédica y Licenciatura en Tecnología de la UNAM, así como el Posgrado de Ciencias Biomédicas Básicas de la UASLP, entre otros.

- 1. Peter Hänggi and Fabio Marchesoni, "Artificial Brownian motors: Controlling transport on the nanoscale," Rev. Mod. Phys. 81: 387-442 (2009).
- 2. K. E. Drexler, Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing and Computation Wiley, New York (1992).
- 3. Richard P. Feynman, "There's Plenty of Room at the Bottom," Caltech's Engineering & Science Magazine, Pasadena, (1960).
- 4. Bustamante, C., J. Liphardt, and F. Ritort, "The non-equilibrium thermodynamics of small systems," Phys. Today 58: 43–48 (2005).
- 5. Donald W. Noid, Robert E. Tuzun and Bobby G. Sumpter, "On the importance of quantum mechanics for nanotechnology," Nanotechnology 8: 119–125 (1997).
- 6. A. Ashkin, Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers: a reprint volume with commentaries. World Scientific (2006).
- 7. Peter M Hoffmann, "How molecular motors extract order from chaos (a key issues review)," Rep. Prog. Phys. 79: 032601 (2016).
- 8. Anthony G. Vecchiarelli, Keir C. Neuman, and Kiyoshi Mizuuchi, "A propagating ATPase gradient drives trans- port of surface-confined cellular cargo," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111: 4880–4885 (2014).
- 9. Meigang Gu and Charles M. Rice, "Three conformational snapshots of the hepatitis C virus NS3 helicase reveal a ratchet translocation mechanism," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 521–528 (2010).
- 10. Joel S. Bader, Richard W. Hammond, Steven A. Henck, Michael W. Deem, Gregory A. McDermott, James M. Bustillo, John W. Simpson, Gregory T. Mulhern, and Jonathan M. Rothberg, "DNA transport by a microma-chined Brownian ratchet device," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 13165–13169 (1999).
- 11. John A. Davis, David W. Inglis, Keith J. Morton, David A. Lawrence, Lotien R. Huang, Stephen Y. Chou, James C. Sturm, and Robert H. Austin. Deterministic hydrodynamics: Taking blood apart. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 14779–14784 (2006).
- 12. A. Jonás and P. Zemánek, "Light at work: the use of optical forces for particle mani- pulation, sorting, and analysis," Electrophoresis 29: 4813–4851 (2009).

- 13. I. Ricárdez-Vargas, P. Rodríguez-Montero, R. Ramos-García, K. Volke-Sepúlveda, "A modulated optical sieve for sorting of polydisperse microparticles," Appl. Phys. Lett. 88: 121116 (2006).
- 14. Alejandro V. Arzola, Karen Volke-Sepúlveda, and José L. Mateos, "Experimental control of transport and current reversals in a deterministic optical rocking ratchet," Phys. Rev. Lett. 106: 168104 (2011).
- 15. Alejandro V. Arzola, Karen Volke-Sepu'lveda, and Jos'e L. Mateos. Dynamical analysis of an optical rocking ratchet: Theory and experiment. Phys. Rev. E, 87:062910, 2013.
- 16. C. Bustamante, Z. Bryant, S. Smith et al., "Ten years of tension: single-molecule dna mechanics," Nature 421: 423–426 (2003).
- 17. I. Santamaría-Holek, N. J. López-Alamilla, M. Hidalgo-Soria, and A. Pérez-Madrid, "Nonlinear irreversible thermodynamics of single-molecule experiments," Phys. Rev. E 91: 062714 (2015).
- 18. M. Hidalgo-Soria, A. Pérez-Madrid, and I. Santamaría-Holek, "Effect of elastic colored noise in the hopping dynamics of single molecules in stretching experiments," Phys. Rev. E 92: 062708 (2015).
- 19. L. Martínez-Balbuena, E. Hernández-Zapata, I. Santamaría-Holek, "Onsager's irreversible thermodynamics of the dynamics of transient pores in spherical lipid vesicles," Eur. Biophys. J. 44: 473–481 (2015).

3.8. Pinzas plasmónicas. Paulina Segovia Olvera

Estado del arte en el mundo

Las pinzas ópticas se han convertido en una herramienta muy poderosa, principalmente en ciencias de la vida y medicina donde materiales biológicos, como células vivas, bacterias y ADN son manipulados ópticamente. Con los progresos rápidos en este campo de investigación, ha surgido la necesidad urgente de manipular biopartículas relativamente más pequeñas, tales como ADN fragmentado, enzimas, oligopéptidos, etc. Sin embargo, para las pinzas ópticas convencionales es difícil realizar una captura óptica estable de partículas que tienen tamaños del orden de nanómetros (menos de varias decenas de nanómetros) debido a que la presión de radiación disminuye a medida que el tamaño de la partícula se reduce. Para superar esta limitación, recientemente se ha propuesto y desarrollado un tipo nuevo de pinzas ópticas. Este método de captura se llama pinzas plasmónicas y utiliza plasmones de superficie localizados para aumentar la fuerza de radiación. Pueden, potencialmente, superar los límites y las desventajas de las pinzas ópticas convencionales. Por ejemplo, la densidad de potencia necesaria para conseguir un atrapado óptico estable se reduce debido al efecto plasmónico de reforzamiento del campo. Además, ya que el potencial óptico de la trampa plasmónica no está restringido por el límite de difracción, las partículas pueden ser atrapadas de forma más localizada permitiendo realizar una manipulación con súper resolución. Diferentes estructuras han sido exploradas para diseñar pinzas plasmónicas: nano-pilares [1,2], nano-agujeros [3], nano-pirámides[4], nano-antenas [5], etc. Particularmente, en el campo de la biología diferentes trabajos se han desarrollado, el grupo de Quidant reportó el atrapado de E. coli utilizando una antena plasmónica fuera de la región de fotodaño [6], el grupo de Gordon demostró el atrapado de una única molécula de proteína de albúmina de suero bovino (BSA) en una nanoestructura de doble agujero [7], el grupo de Tsuboi ha reportado la captura de moléculas de λ-ADN teñidas con colorante fluorescente YOYO-1 [8]. La capacidad de atrapar y controlar el movimiento mecánico a nano-escala utilizando estructuras plasmónicas abre el camino para la investigación de diversos fenómenos interdisciplinarios, como el desarrollo de innovadores dispositivos opto-mecánicos para micro y nano fluídica, biofísica y más.

Estado del arte en México

En al ámbito nacional, el método de pinzas plasmónicas no ha sido desarrollado. Y hasta donde sabemos, somos los únicos iniciando colaboraciones internacionales para implementar esta técnica en el país.

- [1] Grigorenko, A. N.; Roberts, N. W.; Dickinson, M. R.; Zhang, Y. Nanometric Optical Tweezers Based on Nanostructured Substrates. Nat. Photonics 2008, 2, 365–370.
- [2] Wang, K.; Schonbrun, E.; Steinvurzel, P.; Crozier, K. B. Trapping and Rotating Nanoparticles Using a Plasmonic Nano- Tweezer with an Integrated Heat Sink. Nat. Commun. 2011, 2, 469.
- [3] Juan, M. L.; Gordon, R.; Pang, Y.; Eftekhari, F.; Quidant, R. Self-Induced Back-Action Optical Trapping of Dielectric Nanoparticles. Nat. Phys. 2009, 5, 915–919.
- [4] Tsuboi, Y.; Shoji, T.; Kitamura, N.; Takase, M.; Murakoshi, K.; Mizumoto, Y.; Ishihara, H. Optical Trapping of Quantum Dots Based on Gap-Mode-Excitation of Localized Surface Plasmon. J. Phys. Chem. Lett. 2010, 1, 2327–2333.
- [5] Righini, M.; Ghenuche, P.; Cherukulappurath, S.; Myroshnychenko, U.; Garcia de Abajo, F.J.; Quidant, R. Nano-optical trapping of Rayleigh particles and Escherichia bacteria with resonant optical antennas. Nano Lett. 2009, 9, 3387–3391.
- [6] Righini, M.; Ghenuche, P.; Cherukulappurath, S.; Myroshnychenko, U.; Garcia de Abajo, F.J.; Quidant, R. Nano-optical trapping of Rayleigh particles and Escherichia bacteria with resonant optical antennas. Nano Lett. 2009, 9, 3387–3391.
- [7] Pang, Y.; Gordon, R. Optical trapping of single protein. Nano Lett. 2012, 12, 402–406.
- [8] Shoji, T.; Saitoh, J.; Kitamura, N.; Nagasawa, F.; Murakoshi, K.; Yamauchi, H.; Ito, S.; Miyasaka, H.; Ishihara, H.; Tsuboi, Y. Permanent fixing or reversible trapping and release of DNA micropatterns on a gold nanostructure using continuous-wave or femtosecond pulsed near-infrared laser light. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 6643–6648.

4. PROPAGACION DE LUZ EN MEDIOS ALTAMENTE ESPARCIDORES Y SPECKLE LASER IMAGING

Julio Cesar Ramirez San Juan (INAOE)
Beatriz Morales Cruzado (UASLP)
Rosario Porras Aguilar (INAOE)
Eugenio Méndez (CICESE)
Konstantinos Falaggis, (CICESE)
Sergio Vázquez y Montiel ()
Roger Chiu Zarate (INAOE)
Felipe Orihuela Espina (INAOE)
Erick Sarmiento Gómez (IF-UASLP)
Rubén Ramos García (INAOE)
Dr. Alexis Vásquez Villa (IPICYT)
Dra. Hayde Peregrina Barreto (INAOE)

4.1 INTRODUCCION

La comunidad científica internacional se ha esforzado por ofrecer técnicas no invasivas para el diagnóstico de enfermedades, las cuales basan su funcionamiento en la interacción de luz con los tejidos biológicos. Este tipo de técnicas usualmente requieren de un modelo físico de propagación de luz en medios turbios (medios que interactúan fuertemente con la luz) que sea capaz de proveer información acerca de propiedades físicas cuantificables del tejido.

Al iluminar material biológico, inhomogeneidades a escala microscópica provocan que la luz sea esparcida siguiendo trayectorias aleatorias, en lugar de trayectorias balísticas como podría suceder en un medio no esparcidor. Esta característica limita, por un lado, la profundidad de penetración de la luz, la cual es necesaria para la aplicación exitosa de algunas terapias ópticas tales como la terapia fotodinámica, y por otro lado, limita y en general obstaculiza la visualización de (i) estructuras internas del material biológico, tales como las diferentes estructuras del tejido biológico, vasos sanguíneos y lesiones, y (ii) la función metabólica, por ejemplo reduciendo la relación señal-ruido en la estimación de concentraciones de hemoglobina correspondientes a la actividad hemodinámica directamente, e indirectamente proxy de la actividad neural.

Para comprender mejor el proceso de esparcimiento de luz en tejidos biológicos y poder resolver algunas de las limitantes mencionadas anteriormente, se han desarrollado modelos estadísticos que buscan explicar el proceso de propagación de luz en medios biológicos; herramientas computacionales (como el método de Montecarlo) y diferentes técnicas experimentales, tales como conjugación de fase y herramientas de caracterización de las propiedades ópticas de tejido biológico, por mencionar algunas.

4.2 Técnicas de recuperación de propiedades ópticas

La determinación de las propiedades de esparcimiento y absorción de los tejidos humanos son de gran importancia en la implementación de técnicas ópticas, tanto de diagnóstico como de tratamiento de enfermedades, dado que describen la propagación de luz en dicho medio, y por lo tanto permiten predecir la densidad y el flujo de energía dentro del medio de interés. Por este motivo, en los últimos decenios, ha habido un gran auge en el desarrollo de modelos útiles para la caracterización de la propagación de luz en medios turbios, y en la implementación de metodologías para la recuperación de parámetros ópticos.

La mayoría de los modelos de propagación de luz adolecen de un intervalo amplio de validez, lo que limita el tipo de aplicaciones en las que se pueden usar dichos modelos. Uno de los modelos de propagación de luz más usados es la aproximación de difusión, que describe el proceso de propagación de luz como un proceso de caminata aleatoria, y que sólo es válida para sistemas altamente esparcidores y no muy absorbentes, como por ejemplo la mayoría de los tejidos biológicos. A pesar de que las soluciones de la aproximación de difusión no son analíticas, y a que tiene una gran dependencia con la geometría y las condiciones iniciales, en los últimos años ha habido un gran auge en el uso de la aproximación de difusión para la recuperación de parámetros ópticos de tejidos biológicos, siendo uno de las más conocidas la tomografía óptica difusa. Esta metodología permite recuperar los parámetros ópticos de tejidos biológicos inhomogenéneos a partir de

la medición de la distribución espacial de intensidad de luz. Esta técnica ha permitido por ejemplo medir la función cerebral, o realizar mamografías ópticas que tienen el potencial de servir como técnicas de diagnóstico de enfermedades. A pesar de estos avances, todavía se realiza mucha investigación con el objetivo de mejorar la precisión, resolución espacial y tiempo de cómputo de estas técnicas.

Si bien la aproximación de difusión es muy útil para diversas aplicaciones, su limitado intervalo de validez prohíbe su uso en otro tipo de aplicaciones, como es la recuperación de productos industriales, fluidos biológicos o suspensiones coloidales. Este tipo de aplicaciones serían de importancia no solo en ciencia básica (en particular en materia condensada blanda) sino en la industria o en el sector salud. La mayoría de las metodologías de recuperación de parámetros ópticos son basadas en métodos inversos, es decir que requieren la resolución del problema directo usando algún modelo de propagación de luz o alguna aproximación de la ecuación de transferencia radiativa. En estas metodologías los parámetros ópticos son determinados al comparar mediciones experimentales del sistema de interés (como la reflectancia o transmitancia) con las predicciones de dicho modelo o aproximación, y usando algoritmos de búsqueda especializados. Una de las metodologías más usadas para la recuperación de parámetros ópticos de medios turbios homogéneos es Inverse Adding Doubling, que tiene la ventaja de ser un método con un amplio intervalo de validez, computacionalmente de bajo costo y que se ha convertido en el standard de oro de los algoritmos de recuperación de parámetros ópticos de medios turbios homogéneos.

A pesar de que IAD ofrece muchas ventajas, también tiene limitantes severas, como son el hecho de que no es flexible en la geometría de medio turbio, y de que no implementa correcciones experimentales como son pérdidas de luz por los bordes del sistema. Por esta razón sería de importancia el desarrollo de otro tipo de algoritmos, que puedan solventar las limitantes de IAD. Una posible alternativa al método de solución de la RTE que usa IAD, sería el uso de metodologías Monte Carlo para la propagación de luz en medios turbios. Este tipo de metodologías tienen la ventaja de que son suficientemente flexibles en geometría y permiten correcciones experimentales fácilmente implementables, pero requieren un poder de cómputo superior. A pesar de esto, con el advenimiento de tecnologías de cómputo paralelo, como el uso de tarjetas gráficas, esta limitante se podría reducir considerablemente, y así impactar en el tipo de aplicaciones que se describieron anteriormente, es decir, en la caracterización de suspensiones coloidales, productos industriales, y fluidos biológicos para aplicaciones en diagnóstico y en ciencia básica.

- Lihong V. Wang, Hsin-i Wu, Biomedical Optics, John Wiley & Sons (2007).
- Maria Angela Franceschini, et. al., Frequency-domain techniques enhance optical mammography: Initial clinical results, PNAS Vol. 94(12), 6468-6473, 1997.
- Maria Angela Franceschini, David A. Boas, Noninvasive measurement of neuronal activity with near-infrared optical imaging, NeuroImage, Vol. 21(1), 372-386, 2004.
- S. A. Prahl, M. J. C. van Gemert and A. J. Ashley, Determining the optical properties

- of turbid media by using the adding-doubling method, Applied Optics, 32 559-
- 568(1993).
- S.A. Prahl, M. Keijzer, S.L. Jacques and A.J. Welch, A Monte Carlo model of light
- propagation in tissue, SPIE Institute Series Vol. IS 5 102-111(1989).
- Erik Alerstam, Tomas Svensson, and Stefan Andersson-Engels, Parallel computing with graphics processing units for high-speed Monte Carlo simulation of photon migration, JBO Letters, Vol. 13(6), 060504, 2008.

4.3. Óptica adaptiva en biofotónica

Dra. Rosario Porras Aguilar

4.3.1 Estado del arte en el mundo

La óptica adaptiva (OA) consiste en el uso de componentes ópticas que son monitoreadas y controladas para compensar aberraciones ópticas y perturbaciones estáticas o dinámicas a sistemas de formación de imagen. Estas distorsiones pueden darse debido a cambios térmicos, mecánicos, acústicos, entre otros [1]. Como su nombre lo dice, los sistemas de OA se adaptan a las condiciones cambiantes de observación.

Originalmente la OA fue desarrollada con el propósito de compensar aberraciones en imágenes estelares inducidas por la atmósfera. Los sistemas de OA están compuestos por:

1) un elemento de corrección adaptiva, que puede ser un espejo deformable o un modulador espacial de luz (SLM, por sus siglas en inglés), 2) sensor de frente de onda, los más populares son los piramidales y el de Shack-Hartmann [2] y, 3) sistema de retroalimentación y control. El principio de funcionamiento de la OA se basa en la obtención y monitoreo de las deformaciones inducidas al frente de onda (mediante el sensor de frente de onda), el cálculo de las modificaciones requeridas para su compensación, y el uso del elemento corrector para finalmente obtener una imagen libre de aberraciones en la cámara.

Actualmente, la OA ha encontrado aplicaciones en la biofotónica, por ejemplo: en microscopía adaptiva, donde contribuye a corregir las distorsiones en las imágenes obtenidas; en la observación a través de piel o cerebro [3] y en óptica de la visión, para la medición y corrección de aberraciones oculares, además de investigación y estudio de enfermedades de la visión.

4.3.2. Microscopía de óptica adaptiva

La necesidad de observar cada vez con mayor resolución especímenes biológicos bajo el microscopio ha encaminado el desarrollo de tecnologías novedosas diseñadas para ir más allá del límite de difracción. Sin embargo, el desempeño de sistemas de microscopía de alta o súper resolución (incluso fabricado con componentes ópticas perfectas) se ve truncado al encontrarse con variaciones espaciales del índice de refracción del espécimen bajo observación. Este problema es aún más grave cuando se busca obtener una imagen en tejido biológico profundo (decenas a cientos de micras).

La OA se ha implementado ya en microscopía multifotónica [3,4], microscopía confocal [5], de campo amplio [6–8], de iluminación estructurada [9], 'light sheet' [10,11], microendoscopía [12], e incluso en microscopía de superresolución como: STED (en inglés: *Stimulated emission depletion*) [13,14].

La implementación de OA en microscopía en general, debe afrontar varios retos que lo diferencían de la OA utilizada en astronomía. Por ejemplo, 1) el **elemento de corrección adaptiva** generalmente empleado en microscopía es un **espejo deformable micro-estructurado**. A diferencia de los espejos deformables de membrana, los micro-estructurados ofrecen una acción más localizada que no se traslapa. Por su parte, los SLMs son dependientes de la longitud de onda y de la polarización. Por lo que no son comúnmente utilizados en la corrección de aberraciones en microscopía. Sin embargo, son usados para controlar el haz de iluminación, en particular, en microscopía multifotónica. Otra desventaja importante de los SLMs, es su frecuencia de actualización: ~100Hz, en comparación con la velocidad de la mayoría de espejos deformables micro-estructurados que alcanzan varios KHz.

En cuanto al sistema de **sensado de frente de onda** se han explorado métodos de sensado directo e indirecto. El método directo utiliza sensores de frente de onda como el de Shack-Hartmann. En astronomía, el frente de onda queda definido al utilizar una fuente puntual como referencia (estrella conocida o artificial). Sin embargo, en microscopía se tiene una complicación adicional: la luz emana de múltiples puntos del espécimen simultáneamente ya sea por esparcimiento o por múltiples fluoróforos en microscopía de fluorescencia. Esto puede resolverse utilizando un *pinhole* de diámetro apropiado para filtrar la luz que esté enfocada [15]. Otra solución es el uso de micro-esferas fluorescentes [16,17] aunque, desafortunadamente, no son compatibles con muestras biológicas.

Los métodos indirectos para sensar el frente de onda se basan en la obtención de una secuencia de imágenes que son posteriormente analizadas. Un método indirecto para la medición del frente de onda es conocido como: "Sensado de frente de onda modal" o "Frente de onda sin sensor", donde el frente de onda aberrado se expresa como una suma de modos ortogonales. La ventaja de este método es que se puede definir el frente aberrado en función de los modos de deformación del elemento de corrección. Otro método indirecto para obtener el frente de onda, y que ya ha sido implementado con éxito en microscopía de dos fotones, se basa en la segmentación de la pupila. En este método la descomposición del frente de onda no se hace de manera modal, sino que se descompone en pequeños segmentos.

Un gran reto es el que representa la visualización a través de tejido como piel y cerebro debido al alto esparcimiento de la luz. Sin embargo, algunos grupos de investigación han reportado avances importantes en este campo de investigación. En particular puede mencionarse los trabajos desarrollados para redireccionar haces a través de medios altamente dispersores(ver por ejemplo: [18–20]), además de otros grupos que ya han logrado la visualización de calcio funcional en el interior de la corteza cerebral de un ratón *in vivo* [21]. Para esto han implementado OA en un microscopio de dos fotones con iluminación infrarroja y utilizando un método directo de sensor de frente de onda.

Alcanzando la observación de calcio a profundidades de hasta 600µm y la mejora de la resolución de ~660nm a ~430nm al utilizar el sistema de OA.

4.3.3. Óptica adaptiva en visión

Las técnicas que se usan hoy en día para llevar a cabo exámenes visuales de ojos *in vivo* son: retinografía (similar a un microscopio de reflexión de campo brillante), oftalmoscopio (similar a un microscopio confocal) y tomografía de óptica coherente (OCT, por sus siglas en inglés) [22]. En un ojo con óptica perfecta, el oftalmoscopio alcanza una resolución de 1.4µm limitada por difracción. Esta resolución es suficiente para resolver los fotoreceptores más pequeños en la retina. Sin embargo, esta resolución se ve afectada por las aberraciones internas, de manera tal que es imposible resolver los conos y bastones de un ojo *in vivo*. Adicionalmente, la pupila solo permite observar una ventana pequeña y nublada, de tal manera que la retina refleja de vuelta a la pupila solamente 0.1 a 0.001% de la iluminación [23].Tomando todo esto en consideración la resolución se ve tan limitada que en algunos casos se requiere incluso remover la retina para poder llevar a cabo estudios visuales.

Las tres técnicas antes mencionadas para exámenes visuales tienen alta resolución axial pero están limitadas en la resolución lateral. Sin embargo, la OA compensa las aberraciones internas del ojo mejorando precisamente esta resolución. La inclusión de la OA en estos exámenes hace posible que al día de hoy puedan obtenerse diagnósticos más precisos y que se haya logrado un avance en la investigación fundamental del área de visión.

Originalmente, la utilización de OA en visión fue propuesta en 1989 [24], y probaba experimentalmente en 1997 en la Universidad de Rochester [25]. El principio de funcionamiento de OA, es muy similar al que se usa en astronomía. Consiste en un sistema cerrado (retroalimentado) que observa la luz reflejada por la retina de una fuente externa. Esta radiación es enviada a un sensor de frente de onda (para medir las aberraciones) y usa esta información para ajustar la forma del elemento corrector de manera que las aberraciones sean compensadas. El sistema se adapta continuamente para compensar las aberraciones de manera dinámica.

Los sistemas de OA han permitido que se corrijan aberraciones en el ojo para alcanzar una mejora de factor de 10. Esto se traduce en una resolución lateral para conos de ~5μm y para bastones ~2μm [26]. Con esta resolución es posible llevar a cabo de estudio de enfermedades degenerativas como diabetes, degeneración macular asociada a la edad (AMD, por sus siglas en inglés) [27], telangiectasia macular tipo 2 [28], entre otras.

A finales de los 90's se propuso la idea controversial de utilizar OA para medir y corregir aberraciones de alto orden con el objetivo de alcanzar lo que entonces se llamó: súper visión. Un poco más tarde se reportó [29] que alcanzar una visión 20/20 (perfecta) es imposible ya que, incluso en un ojo libre de aberraciones, la visión queda limitada debido a que a niveles altos de luz (por ejemplo: durante el día, visión fotópica), el tamaño de la pupila es pequeña y las aberraciones de alto orden son pequeñas en la mayoría de personas. Mientras que a niveles bajos de luz (por ejemplo: durante la noche, visión escotópica), la pupila se dilata de forma natural y la resolución tiende a estar limitado por la integración espacial de respuestas fotorreceptoras en la retina.

Una aplicación futurista de la OA en visión es la construcción de lentes de contacto que puedan corregir de manera activa y ajustar su distancia focal a medida que se requiera. Actualmente, un grupo de investigación en la Universidad Tecnológica de Delft en Holanda, ha logrado construir un corrector de frente de onda empleando cristales líquidos con una abertura de 5mm., y que es capaz de corregir entre 0 a +3 dioptrías [30].

4.3.4. Estado del arte en México

Algunos de los institutos que investigan actualmente la óptica adaptiva en ciencias de la vida son el Centro de Investigaciones en Óptica (CIO), Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico (CCADET, UNAM), Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE).

De hecho, el Laboratorio Nacional de Óptica de la Visión (LaNOV), con sede en el CIO y fundado en 2016. Tiene como objetivo realizar investigación básica y aplicada que permita el desarrollo de instrumentación de última generación en materia de visión [31]. El LaNOV está asociado con el INAOE, además de la participación del CCADET y UAM para alcanzar estos objetivos. El LaNOV contempla a la óptica adaptiva como una de las disciplinas que requieren ser atendidas para la evaluación y corrección de algunos problemas visuales.

Adicionalmente, el INAOE ha reportado sus avances en materia de redireccionamiento de luz a través de medios altamente esparcidores [32]. Hasta el día de hoy, se ha logrado el enfocamiento y redireccionamiento de la luz. Además de su implementación, se ha trabajado en la optimización de tiempo de procesamiento del sistema.

- 1. photonics.com, "Adaptive Optics," http://www.photonics.com/EDU/Term.aspx?TermID=2195.
- 2. T. Y. Chew, R. M. Clare, and R. G. Lane, "A comparison of the Shack–Hartmann and pyramid wavefront sensors," Opt. Commun. **268**, 189–195 (2006).
- 3. M. J. Booth, "Adaptive optical microscopy: the ongoing quest for a perfect image," Light Sci. Appl. 3, e165 (2014).
- 4. N. Ji, T. R. Sato, and E. Betzig, "Characterization and adaptive optical correction of aberrations during in vivo imaging in the mouse cortex.," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **109**, 22–7 (2012).
- 5. X. Tao, B. Fernandez, O. Azucena, M. Fu, D. Garcia, Y. Zuo, D. C. Chen, and J. Kubby, "Adaptive optics confocal microscopy using direct wavefront sensing," Opt. Lett. **36**, 1062 (2011).
- 6. O. Azucena, J. Crest, S. Kotadia, W. Sullivan, X. Tao, M. Reinig, D. Gavel, S. Olivier, and J. Kubby, "Adaptive optics wide-field microscopy using direct wavefront sensing," Opt. Lett. **36**, 825 (2011).
- 7. P. Vermeulen, E. Muro, T. Pons, V. Loriette, and A. Fragola, "Adaptive optics for fluorescence wide-field microscopy using spectrally independent guide star and markers," J. Biomed. Opt. **16**, 76019 (2011).
- 8. M. Warber, S. Maier, T. Haist, and W. Osten, "Combination of scene-based and

- stochastic measurement for wide-field aberration correction in microscopic imaging," Appl. Opt. **49**, 5474 (2010).
- 9. D. Débarre, E. J. Botcherby, M. J. Booth, and T. Wilson, "Adaptive optics for structured illumination microscopy," Opt. Express **16**, 9290 (2008).
- 10. C. Bourgenot, C. D. Saunter, J. M. Taylor, J. M. Girkin, and G. D. Love, "3D adaptive optics in a light sheet microscope," Opt. Express **20**, 13252 (2012).
- 11. R. Jorand, G. Le Corre, J. Andilla, A. Maandhui, C. Frongia, V. Lobjois, B. Ducommun, and C. Lorenzo, "Deep and clear optical imaging of thick inhomogeneous samples.," PLoS One 7, e35795 (2012).
- 12. F. Bortoletto, C. Bonoli, P. Panizzolo, C. D. Ciubotaru, and F. Mammano, "Multiphoton fluorescence microscopy with GRIN objective aberration correction by low order adaptive optics.," PLoS One **6**, e22321 (2011).
- 13. S. W. Hell, "Microscopy and its focal switch," Nat. Methods **6**, 24–32 (2009).
- 14. C. Eggeling, K. I. Willig, and F. J. Barrantes, "STED microscopy of living cellsnew frontiers in membrane and neurobiology.," J. Neurochem. **126**, 203–12 (2013).
- 15. J. W. Cha, J. Ballesta, and P. T. C. So, "Shack-Hartmann wavefront-sensor-based adaptive optics system for multiphoton microscopy," J. Biomed. Opt. **15**, 46022 (2010).
- 16. X. Tao, A. Norton, M. Kissel, O. Azucena, and J. Kubby, "Adaptive optical two-photon microscopy using autofluorescent guide stars," Opt. Lett. **38**, 5075 (2013).
- 17. R. Aviles-Espinosa, J. Andilla, R. Porcar-Guezenec, O. E. Olarte, M. Nieto, X. Levecq, D. Artigas, and P. Loza-Alvarez, "Measurement and correction of in vivo sample aberrations employing a nonlinear guide-star in two-photon excited fluorescence microscopy," Biomed. Opt. Express **2**, 3135 (2011).
- 18. I. M. Vellekoop and A. P. Mosk, "Phase control algorithms for focusing light through turbid media," **281**, 3071–3080 (2008).
- 19. O. Katz, E. Small, and Y. Silberberg, "Looking through walls and around corners with incoherent light: Wide-field real-time imaging through scattering media," 1–10 (n.d.).
- 20. O. Katz, E. Small, Y. Guan, and Y. Silberberg, "Noninvasive nonlinear focusing and imaging through strongly scattering turbid layers," Optica **1**, 170 (2014).
- 21. K. Wang, W. Sun, C. T. Richie, B. K. Harvey, E. Betzig, and N. Ji, "Direct wavefront sensing for high-resolution in vivo imaging in scattering tissue.," Nat. Commun. 6, 7276 (2015).
- 22. C. Dainty, "Adaptive Optics in Vision Science," Imaging Appl. Opt. 2016 **2892**, AOM3C.1 (2016).
- 23. J. Hecht, "PHOTONIC FRONTIERS: BIOPHOTONICS: Adaptive optics examines the eye," http://www.laserfocusworld.com/articles/print/volume-49/issue-01/features/photonic-frontiers--biophotonics--adaptive-optics-examines-the-e.html.
- 24. A. W. Dreher, J. F. Bille, and R. N. Weinreb, "Active optical depth resolution improvement of the laser tomographicscanner," Appl. Opt. 28, 804–808 (1989).
- 25. J. Liang, D. R. Williams, and D. T. b Miller, "Supernormal vision and high-resolution retinal imaging through adaptive optics," J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis. **14**, 2884–2892 (1997).
- 26. D. R. Williams, "Imaging Single Cells in the Living Retina," in *Frontiers in Optics* 2012/Laser Science XXVIII (OSA, 2012), p. JM1A.1.
- 27. C. L. M Kakigi, K. Singh, S. Y. Wang, W. T. Enanoria, and S. C. Lin, "Self-reported

- Calcium Supplementation and Age-Related Macular Degeneration," **133**, 746–754 (2015).
- 28. P. Charbel Issa, M. C. Gillies, E. Y. Chew, A. C. Bird, T. F. C. Heeren, T. Peto, F. G. Holz, and H. P. N. Scholl, "Macular telangiectasia type 2," Prog. Retin. Eye Res. **34**, 49–77 (2013).
- 29. E. Dalimier, C. Dainty, and J. L. Barbur, "Effects of higher-order aberrations on contrast acuity as a function of light level," J. Mod. Opt. **55**, 791–803 (2008).
- 30. G. Vdovin, M. Loktev, and A. Naumov, "On the possibility of intraocular adaptive optics," Opt. Express **11**, 810 (2003).
- 31. CIO, "Laboratorio Nacional de Óptica de la Visión," http://www.cio.mx/laboratorios/laboratorio_nacional_de_optica_de_la_vision/index. php.
- 32. B. Coyotl-Ocelotl, R. Porras-Aguilar, R. Ramos-Garcia, and J. C. Ramirez-San-Juan, "Implementation of focusing and redirecting light through highly scattering media," in *SPECKLE 2015: VI International Conference on Speckle Metrology*, F. Mendoza Santoyo and E. R. Mendez, eds. (2015), p. 96601X.

4.4. Métodos de Monte Carlo

Los métodos de Monte Carlo (MC) [19, 16] son una familia de métodos que permiten aproximar por medios estocásticos, y con precisión arbitraria, procesos, que a menudo, su resolución por medios analíticos hubiese sido extremadamente laboriosa o computacionalmente duros. En su forma más simplista, estos métodos asumen una determinada distribución estadística para una parte (o todo) el sistema físico, y mediante el muestreo sucesivo de dicha distribución obtienen a su vez una distribución de soluciones concretas al sistema. A medida que se repite este proceso, la distribución de salida -si la distribución de entrada era una buena aproximación de la parte del sistema que le corresponde modelar- converge a la solución del problema. El grado de exactitud de la solución está directamente relacionado con el número de eventos singulares simulados, en otras palabras con el número de muestras [9]. En el caso particular de la simulación de transporte de la radiación en tejidos biológicos, estos eventos singulares son la irradiación de fotones individuales con una energía finita que se va perdiendo (o depositando en el tejido) a medida que ocurren fenómenos de absorción y dispersión, y en específico la ruleta de MC toma decisiones aleatorias sobre tamaño del paso entre eventos dispersivos así como sobre la dirección de salida del paquete fotónico no absorbido en la colisión [14, 21].

Si bien, los métodos de MC deshacen el nudo analítico, estos procesos suelen ser computacionalmente muy demandantes. Rara vez pueden resolverse "a mano", por lo que ya existe una variedad de software que incorporan diferentes variantes de los métodos MC. Aunque hay simuladores de transporte de la radiación basados en MC y que no necesariamente son específicos como GEANT [1] y su subproyecto GATE [20], en particular, para el caso de la simulación de la transferencia de la radiación en tejidos biológicos ya actualmente existen algunos de ellos como mcml –quizás el estándar de oro-[21], penMesh [3], MCX [11], CUDAMCML [2], O³MC [10], o MOCARTS [4] este último desarrollado en México en el INAOE. Cada uno de estos tiene diferentes ventajas y limitaciones; algunos trabajan sobre modelos planos, y otros sobre modelos tridimensionales, unos expresan el modelo anatómico-óptico en formato de rejilla y otros

en formato voxelizado, unos trabajan en precisión simple (más rápidos pero menos exactos) y otros en precisión doble, unos facilitan simulaciones con geometrías de sensado complejas, mientras otros delegan esa tarea en algoritmos colaterales, algunos están optimizados para aprovechar la paralelización ofrecida por las nuevas GPUs, e incluso los hay que aprovechan la web, etc.

4.4.1 Situación actual en México; problemas abiertos

Prueba del éxito que han tenido las técnicas de MC en el modelado directo de la óptica (difusa) en tejidos humanos tales como piel [8], colon [13], retina [6], cabeza y cerebro [11, 4, 7], entre otros así como modelos animales [17]. Junto a esta popularidad en óptica difusa, los usos de los métodos de MC en biofótonica se extienden más allá de dicha óptica difusa, como por ejemplo a la fluorescencia de dos fotones [5], en tomografía coherente (OCT) [15, 12], Single-photon emission computed tomography (SPECT) [17] o la emergente photobiomodulation [18]. A pesar de la riqueza literaria en el uso de los métodos de Monte Carlo en biofótónica, desconocemos que actualmente exista una revisión literaria a la vez profunda y completa sobre el estado del arte en este tema.

En México, varios grupos aprovechan la potencia de simulación de los métodos de Monte Carlo;

• En el INAOE, hemos desarrollado el simulador MOCARTS, un simulador ligero con capacidad de modelado 3D para geometrías de sensado complejo y flexibilidad de definición y reutilización de los modelos anatómico-ópticos; el cual está siendo aprovechado para explorar la reconstrucción de la neuroimágen funcional, en aspectos como la eliminación del ruido originado por el flujo sanguíneo en el cuero cabelludo, o la exploración de la reconstrucción de la cytochromo-c-oxydasa, el último enzima en la cadena de la respiración metabólica, el cuál es un marcador altamente específico de la actividad neuronal.

Referencias

- [1] S. Agostinelli and J. et al Allison. Geant4- a simulation toolkit. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 506(3):250–303, JUL 2003.
- [2] Erik Alerstam, William Chun Yip Lo, Tianyi David Han, Jonathan Rose, Stefan Andersson-Engels, and Lothar Lilge. Next-generation acceleration and code optimization for light transport in turbid media using gpus. *Biomedical Optics Express*, 1(2):658–675, SEP 2010.
- [3] Andreu Badal, Iacovos Kyprianou, Diem Phuc Banh, Aldo Badano, and Josep Sempau. penmeshâ€"monte carlo radiation transport simulation in a triangle mesh geometry. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 28(12):1894–1901, DEC 2009.
- [4] J. Alfonso del C. Garcés-Báez Carlos Treviño-Palacios Felipe Orihuela-Espina Bibiana Cuervo-Soto, Javier Herrera-Vega. Mocarts: A lightweight radiation transport simulator for easy handling of complex sensing geometries. In *13th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI'16)*, pages 377–380, 2016.
- [5] Carlo Mar Blanca and Caesar Saloma. Monte carlo analysis of two-photon fluorescence imaging through a scattering medium. *Applied Optics*, 37:8092–8102, 1998.

- [6] Antonio Calcagni, Jonathan M. Gibson, Iain B. Styles, Ela Claridge, and Felipe Orihuela-Espina. Multispectral retinal image analysis: a novel non-invasive tool for retinal imaging. *Eye*, 25(12):1562–1569, DEC 2011.
- [7] C.C. Chuang, C.M. Chen, Y.S. Hsieh, T.C. Liu, and C.W. Sun. Brain structure and spatial sensitivity profile assessing by near-infrared spectroscopy modeling based on 3d mri data. *Journal of Biophotonics*, 6(3):267–274, MAR 2013.
- [8] Ela Claridge, Symon Cotton, Per Hall, and Marc Moncrieff. From colour to tissue histology: Physics-based interpretation of images of pigmented skin lesions. *Medical Image Analysis*, 7:489–502, 2003.
- [9] Bibiana Cuervo-Soto. Monte carlo simulation of radiation transport in multilayered tissue with multichannel detection. Bsc thesis, School of Computer Science, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), 2016.
- [10] Alexander Doronin and Igor Meglinski. Online object oriented monte carlo computational tool for the needs of biomedical optics. *Biomedical Optics Express*, 2(9):2461–2469, SEP 2011.
- [11] Qianqian Fang and David A. Boas. Monte carlo simulation of photon migration in 3d turbid media accelerated by graphics processing units. *Optics Expr*, 17(22):20178–20190, 2009.
- [12] Alzbeta E. Hartinger, Isabel Nam, Ahhyun S.and Chico-Calero, and Benjamin J. Vakoc. Monte carlo modeling of angiographic optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 5(12):4338–4349, 2014.
- [13] Dzena Hidovic-Rowe and Ela Claridge. Modelling and validation of spectral reflectance for the colon. *Physics in Medicine and Biology*, 50(6):1071–1093, 2005.
- [14] Steven L. Jacques and Brian W. Pogue. Tutorial on diffuse light transport. *Journal of Biomedical Optics*, 13(4):041302, 2008.
- [15] M. Kirillin, I. Meglinski, V. Kuzmin, E. Sergeeva, and R. Myllylä. Simulation of optical coherence tomography images by monte carlo modeling based on polarization vector approach. *Optics Express*, 18(21):21714–21724, OCT 2010.
- [16] D. J. C. Mackay. Introduction to monte carlo methods, 1998.
- [17] Arman Rahmim Saeed Sarkar Navid Zeraatkar, Mohammad Hossein Farahani and Mohammad Reza Ay. Design and assessment of a novel spect system for desktop opengantry imaging of small animals: A simulation study. *Medical Physics*, 43:2581–2597, 2016.
- [18] A. Pitzschke, B. Lovisa, O. Seydoux, M. Zellweger, M. Pfleiderer, Y. Tardy, and G. Wagniéres. Red and NIR light dosimetry in the human deep brain. *Physics in Medicine and Biology*, 60:2921–2937, 2015.
- [19] Reuven Y. Rubinstein and Dirk P. Kroese. *Simulation and the Monte Carlo method*. Wiley-Interscience, 2nd ed. edition, 2008.
- [20] D. Sarrut, M. Bardiés, N. Boussion, N. Freud, S. Jan, J. M. Létang, G. Loudos, L. Maigne, S. Marcatili, T. Mauxion, P. Papadimitroulas, Y. Perrot, U. Pietrzyk, C. Robert, D. Schaart, D. Visvikis, and I. Buvat. A review of the use and potential of the gate monte carlo code for radiation therapy and dosimetry applications. *Medical Physics*, 41(6):064301, 2014.
- [21] Lihong Wang, Steven L. Jacques, and Liqiong Zheng. Mcml monte carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 47:131–146, 1995.

4.5. Estado del arte de la tomografía de coherencia óptica

La tomografía de coherencia óptica (OCT por sus siglas en inglés) es una técnica de diagnóstico, que obtiene imágenes tomográficas de tejidos biológicos con una elevada resolución. Se caracteriza por realizar cortes transversales micrométricos que se obtienen al medir el esparcimiento de la luz incidente en una muestra biológica.

Existen dos principales técnicas para medir el esparcimiento de la muestra bajo estudio, la primera de ellas es la tomografía de coherencia óptica del dominio temporal (TDOCT), la cual fue reportada en 1991 en la revista Science, por David Huang y colaboradores [1] donde publicaron una técnica para obtener imágenes de sistemas biológicos a la cual llamaron tomografía de coherencia óptica. El funcionamiento de esta modalidad es similar al funcionamiento de un ultrasonido donde la información del tejido bajo estudio se obtiene midiendo la amplitud y tiempo de vuelo de la luz que se retroesparse por la muestra, para poder medir estas cantidades se utiliza un interferómetro de Michelson o Mach Zender donde uno de los caminos ópticos del interferómetro se dirige a la muestra bajo estudio y el otro camino se envía a un espejo de referencia el cual al moverse escanea a la muestra en profundidad. Al utilizar de fuentes de iluminación de baja coherencia se aumenta la resolución axial de la medición.

La segunda técnica para medir el esparcimiento de la luz en tejidos biológicos surge debido a la necesidad de obtener con mayor velocidad las imágenes tomográficas, de modo que puedan realizarse mediciones in-vivo de tejidos biológicos como el ojo. Esta técnica reportada por Fercher y Colaboradores [2] y Huasler [3] a mediados de los años 90s está basada en la detección del dominio de Fourier. En este caso el espectro de la luz retroesparcido se obtiene al medir el espectro de interferencia con un espectrómetro y una cámara lineal de alta velocidad (OCT del dominio espectral SDOCT), o mediante una fuente de iluminación de barrido de múltiples longitudes de onda y detector (OCT de fuente de barrido SSOCT). Para ambos casos se utiliza al igual que en TDOCT un interferómetro, con la diferencia de que ahora el espejo de referencia se mantiene fijo. La información de la luz retroesparcida se obtiene bajo el principio de medir los cambios de fases provocadas por el potencial de esparcimiento de la muestra. Esta información esta codificada en el espectro de interferencia y puede extraerse de la intensidad medida, mediante una transformada de Fourier de esta. Al tener una cantidad mayor de longitudes de onda también se aumenta la resolución por lo que fuentes con una baja coherencia temporal también son necesarias. Gracias a que ahora la información del potencial de esparcimiento se obtiene sin tener que mover el espejo de referencia la velocidad de obtener las imágenes aumento entre 50 y 100 veces para el caso SDOCT en comparación a TDOCT y 100 veces más rápido para SSOCT en comparación a SDOCT.

Esta tecnología ha encontrado su mayor nicho de aplicación en el área de la oftalmología siendo el actual estándar de oro para el diagnóstico de enfermedades retínales, así como para obtener imágenes de la cámara anterior del ojo. Sin embargo también se cuenta con equipos comerciales que pueden utilizarse en cardiología, dermatología, gastroenterología y patología digital [4].

Actualmente la tendencia es utilizar las propiedades de velocidad y sensibilidad de imagen que es posible obtener con la OCT información funcional de los tejidos bajo estudio, como

por ejemplo en el caso de la microangiografía óptica [5] o la tomografía de coherencia optica Doppler [6] técnicas mediante las cuales se pueden obtener imágenes de los vasos sanguíneos así como los flujos en estos, mediante una correlación de las imágenes obtenidas. Además de lo anterior existen técnicas como la elastografía óptica [7] la cual permite medir la frecuencia de una onda mecánica generada sobre la muestra bajo estudio y mediante la cual es posible obtener las propiedades elásticas de esta.

Publicaciones sobre OCT en el mundo

Fujimoto y Swanson [4] reportan que bajo una investigación en la base de datos de PubMed donde en el titulo o el resumen se contuviera las palabras OCT, (optical coherence tomography) de 1991 a 1998 el número de publicaciones creció de 1 a 123 y en 2015 creció a más de 21,000 artículos, con participación mundial de aproximadamente 500 organizaciones.

Investigadores que trabajan sobre OCT en México

Realizando una búsqueda en los principales centros de investigación del país de personas que tienen como línea de investigación la OCT en México se encontró lo siguiente:

- CIO
 - Davila Alvarez Abundio.
 - o De La Torre Ibarra Manuel Humberto.
 - o Pichardo Molina Juan Luis.
- INAOE
 - o Jorge Castro Ramos
- UNAM CCADET
 - o Oleg V. Kolokoltsev

Sin embargo una búsqueda más exhaustiva debe ser realizada.

Referencias

- 1. D. Huang, E. Swanson, C. Lin, J. Schuman, W. Stinson, W. Chang, M. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. Puliafito y et al, "Optical coherence tomography" Science, vol. 254, n° 5035, pp. 1178-1181, 1991.
- 2. Fercher AF, Hitzenberger CK, Kamp G, Elzaiat SY. Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry. Opt. Comm. 1995;117;43–48.
- 3. Hausler G, Linduer MW. Coherence radar and "spectral radar"-new tools for dermatological diagnosis. J Biomed Opt. 1998;3:21–31.
- 4. J. Fujimoto, E Swason, "The Development, Commercialization, and Impact of Optical Coherence Tomography" Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016;57:OCT1–OCT13. DOI:10.1167/iovs.16-19963.
- 5. Ruikang K. Wang, Lin An, Peter Francis, and David J. Wilson, "Depth-resolved imaging of capillary networks in retina and choroid using ultrahigh sensitive optical microangiography," Opt. Lett. 35, 1467-1469 (2010).
- 6. Gangjun Liu, Alexander J. Lin, Bruce J. Tromberg, and Zhongping Chen, "A comparison of Doppler optical coherence tomography methods," Biomed. Opt. Express 3, 2669-2680 (2012).

7. Chunhui Li, Guangying Guan, Xi Cheng, Zhihong Huang, and Ruikang K. Wang, "Quantitative elastography provided by surface acoustic waves measured by phase-sensitive optical coherence tomography," Opt. Lett. 37, 722-724 (2012).

4.6. LASER SPECKLE IMAGING

El monitoreo no-invasivo de flujo sanguíneo durante un tratamiento quirúrgico es deseable para proporcionar al cirujano o al investigador información sobre la eficacia del tratamiento, así como también es necesario conocer el efecto en el flujo sanguíneo que tiene la administración de algún fármaco, o bien el efecto de algún estimulo externo (por ejemplo eléctrico, o térmico por radiación láser), mas aun, algunas enfermedades se han asociado directamente con cambios locales en flujo sanguíneo, tales como Parkinson, o el incremento de flujo sanguíneo alrededor de un tumor, etc.

Laser Speckle Imaging (LSI) [1,2] ha demostrado ser una técnica óptica noinvasiva eficiente en la medición de flujo sanguíneo, la cual ha sido implementada en diferentes áreas de la medicina. LSI conjuga una fácil implementación, una alta resolución espacial y temporal aun bajo costo comparado con sistemas similares. Existen algunos métodos alternativos para la medición de flujo sanguíneo, sin embargo, estos son en general costosos. Las imágenes por resonancia magnetica^{3,4} no son practicas para uso rutinario y tiene una resolución temporal limitada, los sistemas de tomografía óptica Doppler⁵⁻⁹ requieren de un escaneo mecánico, limitándose a si su resolución espacial y temporal.

LSI es una técnica óptica no-invasiva para medición de flujo sanguíneo, la cual combina de manera simultanea, la capacidad de generar un mapa de velocidades en 2D y un procesamiento de datos bastante simple y sobre todo económico. Originalmente llamada "Fotografía speckle de una exposición", esta técnica se basa en el análisis estadístico de speckle integrado y fue originalmente desarrollado para la medición de flujo sanguíneo en la retina. La idea básica es fotografíar la retina bajo iluminación láser empleando un tiempo de integración (o tiempo de exposición) que es del mismo orden o mayor que el tiempo de correlación de las fluctuaciones de la intensidad luminosa. Es claro que un tiempo de exposición bastante largo permitirá al speckle promediarse y por lo tanto generar un bajo contraste. En general, la distribución de velocidades en la región de interés es mapeada como variaciones de contraste. Posteriormente, un proceso de filtraje pasa-altos de la imagen convierte variaciones de contraste a variaciones de falso color asociados con variaciones en velocidad.

La configuración experimental de LSI es muy simple (Fig. 1), el haz de luz de un láser es colimado por una lente para iluminar el área de interés. Una cámara CCD captura una imagen del área iluminada con un tiempo de integración determinado. El contraste en esta imagen es cuantificado como el cociente de la desviación stardard sobre la intensidad promedio, de esta forme se obtiene una imagen de contrate y posteriormente un mapa de velocidades. El tiempo de procesamiento de la imagen (dependiendo del número de pixeles) puede ser menor a un segundo.

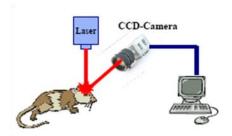


Figura 2.6.1. Configuración básica de un sistema de LSI.

4.6.1 Modelo teórico

Para cuantificar la perdida de contraste mencionada anteriormente, debida a la integración temporal del speckle dinámico proveniente de las células de la sangre en movimiento, Briers et al relacionaron el contraste con el tiempo de exposición de la CCD (T) y con el tiempo de correlación (τ_C) de la luz esparcida por los vasos sanguíneos, si se considera que la función de correlación del campo eléctrico de luz esparcida es una función lorentziana, entonces el contraste del speckle (K) integrado esta dado por:

$$K^2 = \frac{1 - e^{-2x}}{2x}$$
 (Ec. 1)

donde $x=T/\tau_c$. Es bien sabido que la velocidad de las células de la sangre es proporcional a $1/\tau_C$, por lo tanto, si se mide experimentalmente el contraste (en la siguiente sección hablaremos de las diferentes técnicas para hacerlo), y se conoce el tiempo de exposición de la cámara, entonces se puede obtener $1/\tau_C$ de la Ec. 1.

En 2005 [10], Bandyopadhayay et al, demostraron que para el cálculo de la Ec. 1, se había realizado una aproximación para la función de correlación de luz esparcida que no se justificaba en términos de la relación de Siegert, a partir de esta corrección, se obtuvo una segunda versión de la Ec. 1:

$$K^2 = \beta \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^2}$$
 (Ec. 2)

donde β es un factor que toma en cuenta la integración espacial del speckle dinámico sobre las dimensiones finitas de un pixel.

Las Ecs. 1 y 2, son validas solo en el caso de que la luz esparcida por el tejido biológico sea completamente dinámica, lo cual solo es cierto en el caso de que los vasos sanguíneos sean completamente superficiales, como en cerebro expuesto.

En el 2010, Boas y Dunn [11], desarrollaron un modelo para LSI que toma en cuenta que en la mayoría de los casos prácticos, la luz esparcida contiene speckle dinámico (proveniente de los vasos sanguíneos) y estático (proveniente del tejido "estático" que se encuentra sobre los vasos sanguíneos):

$$K^{2} = \beta \left[\rho^{2} \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^{2}} + 4\rho (1 - \rho) \frac{e^{-x} - 1 + x}{x^{2}} + (1 - \rho)^{2} \right] + C_{noise}$$
 (Ec. 3)

donde ρ es la fracción de luz dinámica esparcida por el medio biológico y C_{noise} es un término de posible ruido electrónico generado en la cámara CCD. En esta ultima ecuación, si ρ =1 (es decir, el speckle es completamente dinámico), la Ec. 3 se reduce a la Ec. 2. Si bien esta-ultima ecuación es útil para el caso de vasos sanguíneos profundos, aun tiene el problema del factor de proporcionalidad β , del cual no se tenia una expresión teórica que pudiera estimar su valor.

Recientemente [12], el grupo de Biofotónica del INAOE contribuyó al modelo teórico de LSI, tomando en cuenta que el speckle esparcido por el material biológico, no solo se integraba temporalmente sobre un pixel de la CCD, como lo se hizo en el cálculo de las Ecs. 1-3, si no que también se integraba espacialmente, llegando a la expresión:

$$K^{2} = \left[\sqrt{\frac{1}{N}} erf\left(\sqrt{\pi N}\right) - \left(\frac{1}{\pi N}\right) (1 - e^{-\pi N}) \right]^{2} \left[\rho^{2} \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^{2}} + 4\rho (1 - \rho) \frac{e^{-x} - 1 + x}{x^{2}} + (1 - \rho)^{2} \right] + K_{noise}$$
 (Ec. 4)

donde N es el cociente del área del pixel entre el área de correlación de las motas de speckle. Es decir, el primer factor en la Ec. 4 es el factor β en la Ecs. 1-3, esta ultima expresión, permite una mejor estimación del tiempo de correlación de luz esparcida por el material biológico y por lo tanto de la velocidad relativa del flujo sanguíneo. Para llevar a cabo esta última tarea, es necesario estimar experimentalmente el contraste de la(s) imagen(es) de speckle capturadas por la CCD. En la Figura 2, se observa la dependencia del contraste como función de x y de N.

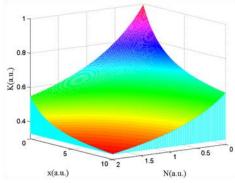


Figura 2.6.2.- Caída del contraste de imágenes de speckle debidas a la integración temporal (x) y espacial (N) del speckle sobre un pixel de la CCD.

4.6.2 Algoritmos para el cálculo de contraste de imágenes de speckle

Básicamente existen tres algoritmos para la medición experimental del contraste local en imágenes de speckle:

4.6.2.1.- Algoritmo espacial [2]:

Este algoritmo requiere de una sola imagen de speckle (ver Fig. 3a), para calcular el contraste del pixel negro, se calcula el cociente de la la desviación estándar y la intensidad

promedio de los pixeles rojos (normalmente la ventana roja es de 5x5 o 7x7 pixeles), este valor se asigna al pixel negro, la ventana se desplaza un pixel a la derecha y se repite la misma operación, así sucesivamente hasta que se cubre toda la imagen, la imagen resultante (pixeles azules) es la imagen de contraste que se utilizara en la Ec. 4 para el cálculo del tiempo de correlación, note que la imagen de contraste es ligeramente mas pequeña que la imagen original de speckle. El índice de perfusión se calcula para cada pixel de la imagen de contraste como el inverso del correspondiente tiempo de correlación. La Fig. 4a es la imagen de perfusión del algoritmo espacial. Esta imagen se caracteriza por una pobre resolución espacial pero alta resolución temporal, pues solo se requiere de una sola imagen cuyo tiempo de exposición es de unos cuantos milisegundos. Si se requiere de un análisis de flujo sanguíneo en el tiempo, se puede adquirir una secuencia de imágenes de speckle, cada una es tratada de manera independiente como se describió anteriormente.

4.6.2.2.- Algoritmo temporal [13]:

Este algoritmo requiere una secuencia de imágenes de speckle, los autores [13] sugieren al menos 15 imágenes. En este caso en contraste del pixel negro (Fig. 3b) se calcula temporalmente a lo largo de los pixeles rojos, este proceso se repite para cada pixel del área azul, la imagen resultante es una imagen de contraste temporal. Al igual que en el algoritmo espacial, para cada pixel de la imagen de contraste se calcula el tiempo de correlación con ayuda de la Ec. 4 y finalmente se obtiene la imagen de perfusión como el inverso del tiempo de correlación asociado a cada pixel. La figura 4b es la correspondiente imagen de perfusión. Esta imagen se caracteriza por una óptima resolución espacial, pero pobre resolución temporal.

4.6.2.3.- Algoritmo espacio-temporal [14]

En este caso el contraste del pixel negro se calcula para un cubo de NxN_sxN_s pixeles (ver Fig. 3c), normalmente este cubo es de 3x3x3 pixeles. Este proceso se repite para cada pixel azul, como en los dos algoritmos anteriores, se obtiene finalmente la imagen de perfusión (Fig. 4c). Esta imagen se caracteriza por tener mejor resolución espacial que la Fig. 4a y mejor resolución temporal que la Fig. 4b.

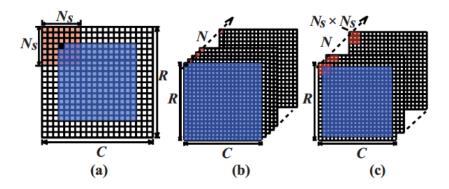
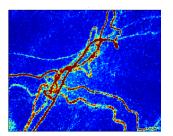
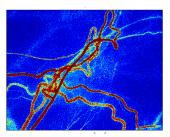


Figura 2.6.3 a) algoritmo espacial, b) algoritmo temporal y c) algoritmo espacio-temporal Imagen tomada de: Jianjun Qiu et al, "Spatiotemporal laser speckle contrast analysis for blood flow imaging with maximized specklecontrast"; Journal of Biomedical Optics **15**(1), 016003





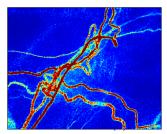


Fig 2.6.4. Imágenes de perfusión para los algoritmos a) espacial (5 x 5 pixeles), b) temporal (27 imágenes) and c) espacio-temporal (3 x 3 x 3 pixeles).

4.6.4. Aplicaciones

Aun cuando una de las limitantes principales en muchos métodos de imagen que utilizan como fuente luz un laser, es la capacidad de penetración de la luz en el tejido biológico (debido al alto nivel de esparcimiento) LSI es una técnica que imagen que presenta una gran versatilidad debido que su costo es reducido en comparación con otras técnicas, además que su implementación experimental permite su portabilidad, lo que ha dado lugar a que pueda ser aplicada en diversas áreas de la medicina donde se requiere de generar un mapa de velocidades del flujo sanguíneo. A nivel experimental se ha aplicado en tejido vivo en modelos de ratón, para estudiar el flujo sanguíneo en cerebro y el dorso de ratón. También se ha utilizado para el análisis en retina o como una técnica que permite conocer el efecto de la aplicación de laser en piel. Otras aplicaciones que se han reportado son como una herramienta para el diagnostico en la viabilidad de semillas de maíz o para el estudio de la actividad biológica de células de melanoma [15].

4.7 Estado del arte en Mexico

En México, se realiza investigación principalmente en las áreas de análisis y procesamiento de imagen, así como el en modelado teórico que permitan entender la dinámica de propagación de la luz y su esparcimiento a través del tejido biológico, estas investigaciones se realizan en el Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica (INAOE), en el Centro Universitario de los Lagos de la Universidad de Guadalajara (CU-Lagos UdeG). A continuación se describen las actividades más relevantes en cada institución:

INAOE:

Mediante el conocimiento de la propagación de luz en medios altamente esparcidores y en particular en el tejido biológico, se han propuesto mejoras a las técnicas de LSI, por ejemplo, mediante el uso de una fuente de luz laser pulsada es posible incrementar el movimiento de algunos de los elementos que conforman la sangre y de esta forma mejorar la visualización de vasos sanguíneos considerados profundos para la técnica de LSI tradicional [16], se estudian también modificaciones a los algoritmos temporales utilizados para el tratamiento de datos con lo cual se ha logrado determinar de manera precisa los cambios que experimenta el flujo sanguíneo en presencia de dispersión estática [17], el conocimiento de los instrumentos de medición permite tener mediciones con un alto grado de confiabilidad, como influyen en los resultados y los efectos colaterales [18] son un factor importante para el estudio de la técnica LSI.

Actualmente, se realiza investigación para mejorar la detección de vasos sanguíneos en profundidades donde LSI empieza a tener limitaciones (> $300\mu m$) con métodos no invasivos. Para ello se han explorado técnicas de procesamiento de imágenes digitales que permiten recuperar y resaltar las características propias de la región dinámica (vaso) en una imagen de speckle. Además, se están explorando alternativas que permiten representar la información estática y dinámica de la imagen de raw speckle a través de descriptores complementarios al contraste en LSI [20].

CU-Lagos UdeG

Cuando la luz se propaga en un medio esparcidor mucha de la información es enmascarada por la presencia de estructuras estáticas, esto lleva a que las imágenes se vean obscurecidas por ruido y se imposibilite la visualización del flujo sanguíneo y en particular de los vasos sanguíneos, mediante el uso de técnicas de procesamiento de imagen en particular análisis multivariado [19] es posible mejorar y alcanzar profundidades de observación mayores a las reportadas con la técnica tradicional de LSI

BIBLIOGRAFIA

- 1. Dunn, A.K., Bolay, T., Moskowitz, M.A. & Boas, D.A. Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **21**, 195-201 (2001).
- 2. Briers, J.D. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiological Measurement* **22**, R35-R66 (2001).
- 3. Forrester, K.R., Stewart, C., Tulip, J., Leonard, C. & Bray, R.C. Comparison of laser speckle and laser Doppler perfusion imaging: measurement in human skin and rabbit articular tissue. *Medical & Biological Engineering & Computing* **40**, 687-697 (2002).
- 4. Schauble, B. & Cascino, G.D. Advances in neuroimaging: management of partial epileptic syndromes. *Neurosurgical Review* **26**, 233-246 (2003).
- 5. Ren, H.W. et al. Phase-resolved functional optical coherence tomography: simultaneous imaging of in situ tissue structure, blood flow velocity, standard deviation, birefringence, and Stokes vectors in human skin. *Optics Letters* **27**, 1702-1704 (2002).
- 6. Rollins, A.M., Yazdanfar, S., Barton, J.K. & Izatt, J.A. Real-time in vivo colors Doppler optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics* **7**, 123-129 (2002).
- 7. Yang, V.X.D. et al. High speed, wide velocity dynamic range Doppler optical coherence tomography (Part I): System design, signal processing, and performance. *Optics Express* **11**, 794-809 (2003).
- 8. Li, X.D., Ko, T.H. & Fujimoto, J.G. Intraluminal fiber-optic Doppler imaging catheter for structural and functional coherence tomography. *Optics Letters* **26**, 1906-1908 (2001).
- 9. Zhao, Y. et al. Doppler standard deviation imaging for clinical monitoring of in vivo human skin blood flow. *Optics Letters* **25**, 1358-1360 (2000).
- 10. R. Bandyopadhyay, AS Gittings, SS Suh, PK Dixon and DJ Durian, "Speckle-visibility spectroscopy: A tool to study time-varying dynamics", Rev Sci Instrum. **76** 093110 (2005).

- 11. DA Boas and AK Dunn, "Laser speckle contrast imaging in biomedical optics", J Biomed Opt. **15**, 011109 (2010).
- 12. Ramirez-San-Juan JC, Ramos-Garcia R, Martinez-Niconoff G and Choi B; "Simple correction factor for laser speckle imaging of flow dynamics"; Opt. Letters **39**, 678-681 (2014).
- 13. H. Cheng, Q Luo, S Zeng, S Cheng, J Cen and H. Gong; "Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution"; J. Biomed. Opt. 8(3), 559-564 (2003).
- 14. Jianjun Qiu et al, "Spatiotemporal laser speckle contrast analysis for blood flow imaging with maximized specklecontrast"; Journal of Biomedical Optics **15**(1), 016003
- 15. Martínez-Celorio, R. A.; González-Peña, R.J.; Cibrián, R.M.; Salvador, R.; Gil-Benso, R.; San Miguel, T.; Sánchez-Muñoz, O.L, Estudio de la Actividad Biológica de Células de Melanoma en un Medio de Cultivo Mediante Técnicas de Biospeckle Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica, vol. 33, núm. 2, (2012), pp. 117-126
- 16. Caitlin Regan, Julio C. Ramirez-San-Juan, and Bernard Choi, "Photothermal laser speckle imaging," Opt. Lett. 39, 5006-5009 (2014)
- 17. Ramirez-San-Juan, J. C., Regan, C., Coyotl-Ocelotl, B., & Choi, B. "Spatial versus temporal laser speckle contrast analyses in the presence of static optical scatterers." Journal of biomedical optics 19.10 (2014): 106009-106009.
- 18. N. Cruz-Ojeda, R. Porras-Aguilar, R. Ramos-Garcia, J.C. Ramirez-San-Juan. Influence of photo-detector's dead-time on the speckle contrast for blood flow measurement Journal of Applied Research and Technology, Volume 13-6, (2015)
- 19. Angel Arias Cruz, "Aplicación del método de componentes principales al análisis de flujo sanguíneo" (Maeter Dissertation) INAOE (2015).
- 20. Arias-Cruz, J. A., Perez-Corona, C. E., Peregrina-Barreto, H., Ramos-Garcia, R., & Ramirez-San-Juan, J. C. (2015, August). Visualization of deep blood vessels in speckle imaging using homogeneity measurement of the co-occurrence matrix. In SPECKLE 2015: VI International Conference on Speckle Metrology (pp. 96601O-96601O). International Society for Optics and Photonics.

5 Tomografía fotoacústica, Fenomenos Fototérmicos y biosensores

Crecencio Garcia Segundo

Laboratorio de Imagenología Biomédica, Física y Computacional CCAEDET, UNAM crescencio.garcia@ccadet.unam.mx.

5.1 Tomografía Fotoacústica (TFA)

El fenómeno fotoacústico se refiere a la generación de perturbaciones mecánicas inducidas por pulsos de luz, ya sea láser o bien fuente continua modulada. Una vez generadas estas perturbaciones, se propagan a la velocidad del sonido, con estructura espectral en el ultrasonido, en concordancia con la física de los fenómenos de transporte. Existen varios métodos de detección de estas perturbaciones, siendo el uso de transductores la forma más recurrente, deflectometria, interferometría y otros métodos ópticos semejantes son los mas frecuentes. La formación de imágenes tomográficas es la aplicación que ha hecho crecer significativamente la atención en el fenómeno fotoacústico. Actualmente esta modalidad esta en proceso de prueba para su uso controlado en humanos. Es la modalidad más visible como alternativa a los métodos ionizantes y con posibilidades de resolución de sublongitud de onda [1]. Esta modalidad de tomografía parte del principio de usar láseres en la ventana biológica del infrarrojo cercano (0.7 a 2.0 micrómetros de longitud de onda), para inducir el fenómeno fotoacústico (luz absorbida produce perturbaciones acústicas en el rango de frecuencias de 0.5 a 100 MHz). Este efecto principalmente ocurre en absorbentes biológicos presentes en la sangre. Esta modalidad de tomografía identifica su nicho de oportunidad en el cáncer mamario y otras expresiones de cáncer y que son en tejido blando a profundidades menores a los 6 cm. Se sabe que una neoplasia cancerígena tiene vascularidad degenerada y por lo tanto un mayor volumen de flujo sanguíneo. Esto implica un potencial aumento de la absorción de radiación. Las señales producidas son registradas por arreglos de sensores especializados, y procesadas de manera semejante a resonancia magnética o tomografía de rayos X y se logra la reconstrucción de imágenes.

Por sus caracterizaras, las imágenes poseen resolución semejante a las imágenes ópticas pero con profundidad de información semejante al ultrasonido clínico. La resolución en hasta 5 mm puede ser de unas cuantas micras y en pruebas de epitelio, se han alcanzado resoluciones sub-longitud de onda. En profundidad la resolución aun es un tema de intensa investigación, así como los criterios de discernimiento entre un tumor maligno y un falso positivo, de acuerdo como el protocolo de imagenología clínica lo requiere. La tecnología definitiva de sensores y de algoritmos de reconstrucción aun son temas de intensa investigación. La ventaja de esta técnica es que no es fundamentalmente dependiente de la densidad del tejido, la radiación utilizada es no ionizante e inocua para el tejido, por ello es potencialmente es viable de uso en cualquier edad biológica. A la fecha no se han detectado efectos colaterales en humanos y en pruebas en animales. Se ha explorado su uso en fusión con modalidades ya establecidas como resonancia magnética, CT-rayos X, ultrasonido, PET. Hoy día existe intensa investigación en el desarrollo de nanomateriales como potenciales marcadores o amplificadores de imagen, específicos para TFA.

Imaging modality	Primary contrast	Imaging depth	Resolution
Confocal microscopy	Fluorescence/scattering	~0.2 mm	~1-2 microns
Two-photon microscopy	Fluorescence	~0.5 mm	~1-2 microns
Optical coherence tomography	Optical scattering	~1-2 mm	~10 microns
Ultrasonography (5 MHz)	Ultrasonic scattering	~60 mm	~300 microns
Photoacoustic microscopy (50 MHz)	Optical absorption	~3 mm	~15 microns
Photoacoustic tomography (3.5 MHz)	Optical absorption	~50 mm	~700 microns

Cuadro comparativo entre la Tomografía Fotoacústica y otras modalidades equivalentes de imagen. Los parámetros de comparación son el contraste, la profundidad de imagen y la escala espacial de resolución.

Los primeros indicios de la técnica datan de principios de 1980's y la sugerencia de su viabilidad fue hecha a mediados de los 1970's. En [1] existe una reseña aproximada de la evolución de la técnica. La primera patente fue registrada en 1983 y Scopus reporta 3290 de titulado Photoacoustics patentes. partir 2013 existe Journal (http://www.journals.elsevier.com/photoacoustics) indizado distribución con internacional, el factor de impacto (IPP) al año 2015 es de 4.0. La principal rama de interés de quines ahí publican es la llamada fotoacústica biomédica y de ahí la TFA es el principal tema actualmente. Según Scopus en la búsqueda especifica Tomografía Fotoacústica da como resultado del orden de 2055 documentos con un pico máximo en 2016. El registro indica que el nombre genérico fue usado en el titulo por primera vez en 1989. Lo cual indica que el tema esta en continuo aumento de interés público y científico. Otros nombres asociados son mamomgrafia fotoacústica, tomografía o mamoscopia optoacústica y variantes de todos ellos.

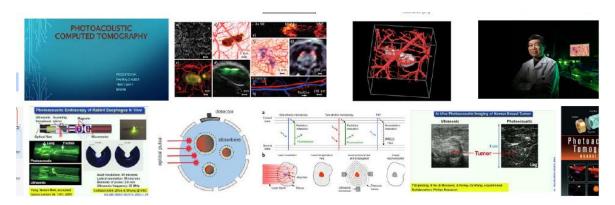


Imagen representativa de el principio de funcionamiento y ejemplos de imágenes reportadas. Prof. Leong V. Wang en la parte superior derecha.

El Prof. Leong V. Wang, adscrito a la Universidad de Washington y a la Universidad de Missouri en San Luis, es el académico mas activo en el área (mas de 300 artículos publicados). En distribución por país, Estados Unidos, China y Alemania encabezan la lista de actividad científica y tecnológica. Actualmente existen equipos comerciales para uso experimental en animales. Así mismo equipo experimental para uso en humanos, el más destacado es el mamografo de la Universidad de Twente en Holanda conducido por Prof. Wiendelt Steembergen y Prof. Sjran Manhoar. En 2012 recibieron apoyo estatal y de la Unión Europea por 3.5 millones de euros para desarrollar la investigación, tecnología y plataforma de pruebas en una clínica de cáncer mamario. Grupos de investigación existen en más de 30 países. En América los más notables son Estados Unidos, Canadá, Brasil, Argentina y en México solo dos grupos han reportado resultados de investigación (DGCI-Univ. Guanajuato en León y CCADET-UNAM, 1 y 4 respectivamente, y uno mas en colaboración conjunta) con publicaciones en revistas indizadas y citas internacionales.

1	Study of the effect introduced by an integrating sphere on the temporal profile characterization of short laser pulses propagating through a turbid medium	Morales-Cruzado, B., Pérez- Gutiérrez, F.G., De Lange, D.F., Romero-Méndez, R.	2015	Applied Optics	0			
	View at Publisher							
	On the spectral response of thick piezoelectric capacitive sensors for arrays in imagenology applications	Reyes-Ramírez, B., Garcia- Segundo, C., García- Valenzuela, A.	2014	Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE	1			
	View at Publisher							
	An examination of polyvinylidene fluoride capacitive sensors as ultrasound transducer for imaging applications	Reyes-Ramírez, B., García- Segundo, C., García- Valenzuela, A.	2014	Measurement Science and Technology	2			
	View at Publisher							
4	Photoacoustic tomography with diffusion approximation	Moock, V.M., Garduño, E., García-Segundo, C., Cosio, F.A.	2013	Lecture Notes in Engineering and Computer Science	0			
5	Signal processing for photoacoustic tomography	Moock, V., Garcia-Segundo, C., Garduño, E., (), Manohar, S., Steenbergen, W.	2012	2012 5th International Congress on Image and Signal Processing, CISP 2012	2			
	View at Publisher							
6	Photoacoustic tomography system	Martinez-Ramírez, J.D., Quispe-Siccha, R., Garcia- Segundo, C., (), Espinosa-Luna, R., Gutiérrez-	2012	Journal of Applied Research and Technology	1			

Figura. Lista de publicaciones indizadas con autoría y adscripción en México

Hasta el mejor de nuestro conocimiento, es de destacar que nuevos grupos y esfuerzos individuales comienzan a aprecer en INAOE, CICESE, UAM, UNAM, IPN. La mayoría de los esfuerzo son en aspectos teóricos o computacionales. El desarrollo de investigación experimental y de tecnología directamente asociada (transductores, electronica de control y registro de señales) se limita aun a los dos grupos antes indicados.

En el ambito internacional, se encuentra que existe un congreso internacional bi-anual que engloba fenómenos fotoacústicos y fototérmicos (International conference in Potoacoustic, Potothermal Penomana, ICPPP). Última edición 2015 en Novi Sad (Servia). Próxima edición 2017 Bilbao (España), ICPPP19.

ICPPP Conferences

- Topical Meeting on Photoacoustic Spectroscopy, 1-3 August 1979. Ames, Iowa, USA
- International Conference on Acoustic Emission and Photoacoustic Spectroscopy, London (July 1981)
- First International Conference on the Photoacoustic Effect in Germany, held on February 23-26, 1981 in Bad Honnef (FRG)
- 3rd International Conference on Photoacoustic and Photothermal Spectroscopy, Paris, France, 1983
- 4th International Topical Meeting on Photoacoustics, Thermal, and Related Sciences, Quebec, Canada, August 4-8, 1985.
- ITMPPP05, July 27-30, 1987, Heilderberg, F.R. Germany
- ITMPPP06, July 31-August 3, 1989, Baltimore, USA
- ITMPPP07, August 26-30, 1991, Doorwerth, The Netherlands
- ITMPPP08 January 22-26, 1994, 1994, Pointe-a-Pitre, Guadeloupe, France
- ICPPP09 June 27-30, 1996, Nanjing, China
- ICPPP10 August 23-27, 1998, Rome, Italy
- ICPPP11 August 25-29, 2000, Kyoto, Japan
- ICPPP12, June 24-27, 2002, Toronto, Canada
- ICPPP13, July 5-8, 2004, Rio de Janeiro, Brazil
- ICPPP14, January 6-9, 2007, Cairo, Egypt

- ICPPP15, July 19-23, 2009, Leuven, Belgium
- ICPPP16, November 27-December 1, 2011, Merida, Yucatan, Mexico
- ICPPP17, October 20-24, 2013, Suzhou, Jiangsu, China
- ICPPP18, September 6-10, 2015, Novi Sad, Serbia
- ICPPP19, Julio 16-20 2017, Bilbao, España

Para una descripción resumida de los avances técnicos y tecnológicos consultar [3]. En términos estadísticos la productividad e interés en el área es como sigue,

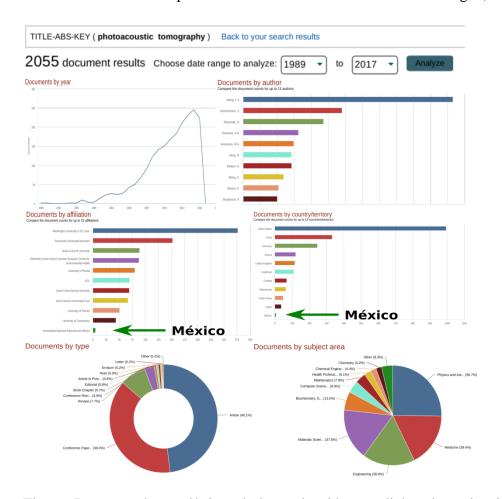


Figura. Resumen de estadísticas de la producción mundial en investigación en tomografía fotoacústica. Fuente SCOPUS

5.2 Imagenología Fototérmica y Fenómenos fototérmicos

Se distinguen dos ramas. (1) Imagenología Infrarroja Médica (IIRM): Termogarfía, Imagenología Fototérmica, y (2) Terapia Fototérmica. Dos posibles formas del fenómeno son: (1) en su forma pasiva, la generación de calor, por efectos de absorción de luz. (2) Forma activa, de manera natural un objeto radia en el infrarrojo como consecuencia de establecer equilibrio termodinámico con sus alrededores. En ambos casos se exhibe diferencia de temperatura de emisión de radiación dentro del objeto de interés y/o contra los alrededores. Si bien el registro de esta radiación más frecuente se realiza en el rango del infrarrojo desde cerca de una micra de longitud de onda y hasta 14 micras de longitud de onda (también conocido como rango térmico), la emisión de radiación no necesariamente se limita a este rango.

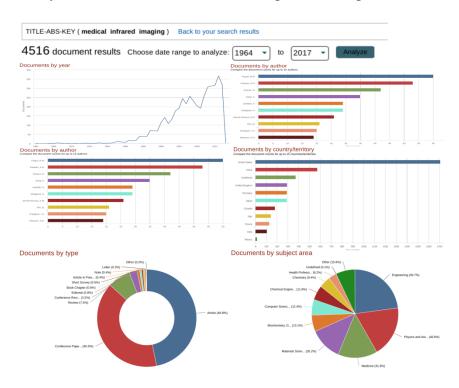
5.3 Imagenología Infrarroja Médica

Aquí se refiere a la emisión de radiación de manera activa (funcional), por parte de un ser vivo. El primer reporte significativo fue por Williams y Handley en 1961 en Lancet, aplicado en detección de cáncer. En 1980 Tom J. Love [4] asoció la emisión de radiación de 8 a 14 micrómetros de longitud de onda, con calor causado por procesos metabólicos: calor metabólico. El estudio establece bases suficientes que permiten identificar al calor registrado como el emitido por el cuerpo humano y asociado a aspectos de termoregulación natural, o bien por respuesta fisiológica a estímulos inducidos o por anomalías patológicas, metabólicas o sobre-estimulación crónica (estrés, fatiga, etc). Actualmente, partiendo de la tecnología existente, se reconocen tres ventanas de oportunidad. Imagenología de infrarrojo cercano 0.7 a 2.0 micrómetros de longitud de onda (NIR, del inglés Near InfraRed), infarrojo medio 3.0 a 5.0 micrómetros de longitud de onda (MIR, del inglés Mid InfraRed) y el infrarrojo lejano, 7.0 a 14.0 micrómetros de longitud de onda (FIR, del inglés Far InfraRed). Para longitudes de onda espectralmente reconocidas en el rango FIR a partir de las 40.0 micras de longitud de onda, se ha preferido incluirlas en lo que hoy días se llama TeraHertz (THz). El rango de tecnología que involucra es claramente distinto. Los los aspectos Físicos y Químicos que involucra su emisión se distancian del rango de longitudes de onda mas cortas y en general requiere de un estímulo externo. Durante los 1980's y los 1990's la termografía cayo en desuso y se mitificaron su capacidades. A la fecha con el advenimiento de nueva tecnología, mejoras en las políticas regulatorias y entrenamiento apropiado de ingenieros expertos y de expertos clínicos y de imagen, la técnica ha renacido y esta en continuo estudio y exploración tratando de llevarla a la clínica para estudios prediagnóstico que permita reducir la lista de espera en las áreas radiológicas. En algunos casos como en la diabetes, se propone como un coadyuvante para dirigir angiografía y evitar medio de contraste.

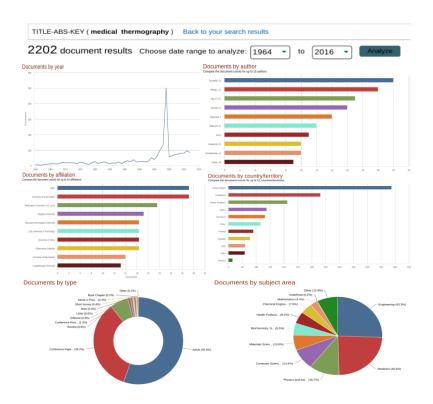
Actualmente existen no menos de cinco revistas especializadas e indizadas que publican de tres a diez artículos especializados mensualmente. Es decir mensualmente se producen del orden de cien artículos y más de mil artículos anualmente. Existen programas supervisados en Estados Unidos (de manera limitada, algunos estados no la autorizan mas que como tema de investigación), Canadá, México, Brasil, Argentina. En Europa es un tema ampliamente en estudio, lo mismo que en países asiáticos como China, Japón, India, Corea, Vietnam y otros. En Europa y Asia, en Australia y Nueva Zelanda existen centros de investigación específicos para el desarrollo de tecnología de imágenes y de desarrollo de potenciales aplicaciones de las imágenes médicas en infrarrojo, siempre en condiciones

supervisadas por una contraparte científica o clínica, según sea el caso. En [5] se describen aspectos generales de las limitaciones hasta 2001. Si bien ha habido avance significativo, aun no existe la validación clínica abierta. En 2009 se reportó [6] una posible metodología para normalizar y estandarizar imágenes biomédicas, sin embargo aun se considera en estado experimental.

En la búsqueda *Medical Infrared Imaging*, Scopus reporta 4,517 documentos y 90,023 patentes. Los registros son a partir 1964 con el artículo de Wolfe [7]. De grupos mexicanos hay 14 publicaciones. En la búsqueda *Medical thermography*, Scopus reporta 2202 documentos y 4194 patentes. Coincide 1964 como el año en que se reportan cinco contribuciones adicionales a la de Wolfe. Son 4 en Annals of the New York Academy of Sciences y una en el British Medical Journal. Con la búsqueda **Photothermal Imaging**, Scopus reporta 2,112 documentos y 5488 patentes. Aquí 15 publicaciones son con adscripción en México, abarcando: Guanajuato, Michoacan, Puebla, Ciudad de México, Veracruz y San Luis Potosí, Chihuahua y Sonora, principalmente. En las figuras abajo se incluyen los datos estadísticos de la búsqueda en Scopus



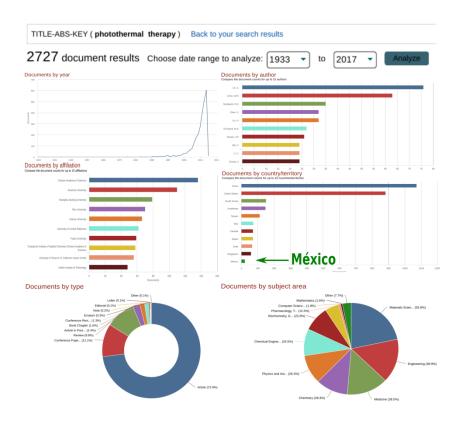
Resultados estadísticos para la búsqueda Medical Infrared Imagin



Resultados estadísticos para la buesqueda Medical Thermography

5.4 Terapia Fototérmica e Imágenes Fototérmicas

La terapia fototérmica es un campo de aparente reciente creación. Su antecedente inicial data de 1933, cuando apareció el articulo llamado Terapia de luz [8], el siguiente registro aparece en 1977 [9], en el que por primera vez se reporta el uso de luz láser para inducir efectos fototérmicos para inducir foto-coagulación. En 1986 se hace el primer esfuerzo por identificar que fuente de luz láser usar en aplicaciones biomédicas [10] y ya para entonces se han publicado seis volúmenes de la revista científica Lasers in Surgery and Medicine y dos volúmenes de la revista Journal of Photochemstry and Photobiology. Es decir para mediados de los años 1980's el uso de láseres en biomedicina se ha consolidado, así como los métodos fototérmicos. En 1989 por primera vez se reporta el uso de láseres pulsados y en combinación con fibras ópticas para estudios de diagnosis de piedras en vías urinarias [11]. En los 1990's su uso dio lugar al nacimiento de la llamada foto-quimioterapia, se comienza a combinar con los métodos de detección fotoacústicos en aplicaciones biomédicas y se reportan por primera vez más de un artículo por año, así como resultados de ablación láser en tejido [13]. Con la rápida expansión de resultados en el desarrollo de nanomateriales y su síntesis conjugada con materiales diversos para hacerlos biocompatibles, desde 2002 donde se publicaron catorce artículos y hasta la fecha (de 2016 se tiene registro de 604 artículos) esta rama ha tenido un crecimiento sostenido. En 2002 se publicó el primer reporte de uso de nanomateriales metálicos en terapia fototérmica de tumores [14]. En 2005 los registros indican la primera publicación de imagenología fototérmica en un sistema biológico [15]. Desde entonces y hasta la fecha se han realizado un sinnúmero de estudios de toxicidad y pruebas en animales y humanos en el tratamiento de distintas formas de cáncer. Resalta próstata, mama y cerebro; sin embargo aun esta en etapa experimental. Scopus reporta 2727 documentos científicos y 24 patentes.



La gráfica muestra el estado del arte específicamente para terapia fototérmica, donde notablemente China encabeza la lista de más documentos científicos publicados con cerca de 1100 y seguida de Estados Unidos con cerca de 900. En México a la fecha se reportan 22 contribuciones científicas. Una aplicación que resulta del uso de nanomateriales con otras formas de radiación, distintas a la luz láser es la llamada hipertermia inducida por resonancia magnética o por radio frecuencias. Las nanopartículas se usan como agentes de contraste o bien como osciladores locales para inducir gradientes de temperatura en el entorno local que los rodea. La llamada termoplasmónica es la rama emergente más activa y se espera que con ella la imagenología fototérmica sirva como punto de consolidación de la Imagenología Infrarroja y la Tomografía Fotoacústica y con ello den el siguiente gran salto en imagenología biomédica. Es decir, alcancen la acreditación para su uso regulado en el gabinete de imagenología con fines diagnósticos y prediagnóstico y por primera vez tener modalidades no-ionizantes con resolución del orden de micras y tal vez aun escalas más pequeñas.

En México la distribución de contribuciones sobre aplicaciones de terapia fototérmica abarca desde la Ciudad de México, Baja California, San Luis Potosí, Yucatan, Puebla, Queretaro, Jalisco, Sonora, Colima, Estado de México. No hay un solo registro de imagenología fototérmica en México.

La descripción de aplicaciones de del fenómeno fotoacústico y fenómenos fototérmicos, distinta a imágenes y a el uso dirigido del fenómeno foto-térmico, es aun mas notable en

términos de producción, sin embargo dada su mezcla con otras áreas temáticas se dificulta la distinción precisa de las contribuciones y registro histórico de publicaciones. Para el efecto de lograr datos representativos se realizo una búsqueda cruzada de fotoacústica y fenómenos fototérmicos en combinación con: fisiología, células, biología y medicina. Scopus emite un registro de 3,711 documentos científicos, 6,078 patentes. Mas de 600 artículos publicados en 2015, mientras que hasta Noviembre de 2016 se tiene un conteo de 510 publicaciones. El registro de la primera publicación en el tema es de 1970. En 1985 se reportó el primer microscopio fotoacústico.

5.5 Resumen general

El resumen generalizado de todas las áreas muestra que el trabajo de investigación es incipiente en contraste contra el universo a nivel mundial. Las contribuciones reportadas en el área se centran en iniciativas desde universidades y pocas instituciones de salud han participado. Resalta el Hospital General de México "Francisco Liceaga" (HGM-FL), algunas unidades de especialidades del IMSS, el Instituto Nacional de Rehabilitación y El Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubiran". En su mayoría los trabajos registrados en colaboración con esas entidades, se reportan como informes técnicos o en formato de divulgación. Resalta la asociación entre el CCADET-UNAM y el HGM-FL, quien desde 2013 conjuntamente iniciaron la operación de la Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico donde actualmente hay actividades en los estos temas de este capitulo. Los esfuerzos son en investigación y desarrollo en ciencia básica y aplicaciones a problemas clínicos dirigidos.

Los datos de las áreas temáticas de investigación y producción de publicaciones y de recursos humanos de da en la sección 2 y sus subsecciones.

5.6. Instituciones se desarrollan actividades de investigación

Institución	Acrónimo	Estado	
Escuela Superior de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional	ESCB-IPN	CDMX	
Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Electrica, IPN	ESIME-IPN	CDMX	
Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. Unidad Legaria	CICATA-Legaria	CDMX	
Hospital General de México "Dr. Fernando Liceaga"	HGM-FL	CDMX	
Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, Universidad Nacional Autónoma de México	CCADET- UNAM	CDMX	
División de Ciencias e Ingenierías, Universidad de Guanajuato	DCEI-UGto	León, Guanajuato	
Instituto de Investigación en Materiales, UNAM	IIM-UNAM	CDMX	
Instituto de Física, UNAM	IF-UNAM	CDMX	
Facultad de Ingeniería, UNAM	FI-UNAM	CDMX	
Facultad de Medicina, UNAM	F.Med-UNAM	CDMX	

Instituto nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica	INAOE	Tonanzintla, Puebla	
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada	CICESE	Ensenada, California	Baja
Universidad Autónoma de Zacatecas	UAZ	Zacatecas, Zacatecas	

6. MATERIALES PARA BIOFOTONICA

Dr. Gabriel Ramos Ortiz (Centro de Investigaciones en Óptica, León, México).

Coordinador y miembro del CTA.

Dr. Miguel Camacho López (Universidad Autónoma del Estado de México)

Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas (Universidad de las Américas, Puebla)

Dra. Tzarara López Luke (Centro de Investigaciones en Óptica)

Dr. Luis Armando Díaz Torres (Centro de Investigaciones en Óptica)

6.1 Aspectos Generales

El estudio de la interacción de la luz con la materia biológica abre toda una serie de posibilidades científicas y tecnológicas. Desde el punto de vista de ciencia fundamental, la luz puede contribuir a estudiar procesos biológicos, biofísicos y bioquímicos cuyo entendimiento es esencial para poder implementar tecnologías de diagnóstico y terapia de diversos padecimientos médicos. La biofotonica está generando investigaciones multidisciplinarias en las que intervienen la física (óptica), la biología y medicina, la química, la ciencia de materiales y la ingeniería. En particular, el desarrollo de nuevos materiales o el uso de biomateriales es un tema muy activo de investigación en el área de biofotónica. Así por ejemplo, el desarrollo de nuevos materiales con propiedades ópticas diversas está motivado por la potencial implementación de bioesensores; técnicas de ensayo para detección y cuantificación de diversos analitos de interés en medicina, ciencias ambientales, biología molecular; agentes de contraste para la generación de bio-imágenes para el estudio de dinámica celular y diagnóstico; implementación de técnicas de terapia basadas en la luz tales como terapia fotodinámica y terapia fototérmica. El uso de materiales en biofotónica no está restringido a materiales sintéticos, y parte de los esfuerzos de investigación están dedicados al empleo de biomoléculas en pruebas técnicas de ensayo, diagnóstico y terapia.

Los materiales utilizados en biofotónica pueden interaccionar con luz de diferentes características. Usando radiación óptica (en el rango visible hasta el cercano infrarrojo) en combinación con un material de respuesta óptica apropiada (alta absorción, fotoluminiscencia, fotogeneración de calor, generación de especies citotoxicas, etc.) es posible examinar, generar una imagen o dar terapia a tejido o especímenes completos de manera no invasiva; con el advenimiento de las nanociencias se ha dado un gran impulso a nuevos materiales que pueden ser usados en el estudio de elementos básicos de la células vivas o *en vitro*, e incluso para la detección de una sola molécula o proteína. Los materiales también pueden ser usados para generar, controlar, transportar y detectar radiación en instrumental biomédico. Es evidente entonces que en muchos campos de la biofotónica están supeditados al desarrollo de nuevos materiales. Algunas características generales que deben satisfacer los materiales para aplicaciones biofotónicas son:

- Aplicaciones Bio-fotónicas:
 - i) Bio-imágenes
 - ii) Diagnóstico
 - iii) Terapia
 - iv) Teranostica
 - v) Técnicas de ensayo
 - vi) Biosensores



- i) Biocompatibles
- ii) Selectivos
- iii) Fotoestables

6.2 Uso de Materiales en técnicas y dispositivos biofotónicos

Este capítulo no tiene por objeto hacer una descripción detallada de los principios y fundamentos ópticos en los que se basa e l uso materiales en biofotónica, sino presentar de manera general el estado del arte y actividades que se desarrollan en este campo en México. De manera general e ilustrativa, a continuación se ejemplifican algunas aplicaciones de materiales en biofotónica.

Terapia Fototérmica:

Un agente (fotosensibilizador) capaz de absorber radiación óptica es dirigido selectivamente a un tejido u órgano; después de que el agente absorbe la radiación genera eficientemente calor para dar terapia térmica (eliminando células cancerosas) en dicha región del organismo como se esquematiza en la Figura 1.

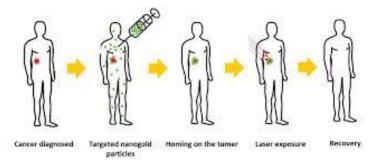


Fig. 1 Esquema del proceso de fototerapia térmica

En la actualidad los agentes para este tipo de terapia consisten en nanopartículas metálicas cuyo diseño de tamaño y morfología favorecen una terapia eficiente.

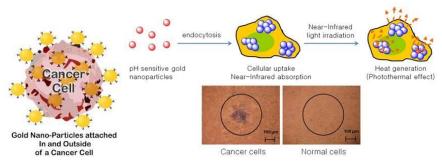


Fig. 2 Esquema del proceso de fototerapia térmica usando nanopartículas metálicas

Terapia Fotodinámica:

La terapia fotodinámica consiste en hacer incidir radiación ultravioleta, visible o infrarroja sobre la piel (o bien sobre tejido a nivel intersticial). Dicho tejido es previamente tratado con sistemas moleculares fotosensibilizadores los cuales después de ser irradiados liberan especies citotoxicas tales como singuletes de oxígeno, óxido nítrico u otras especies altamente reactivas. La terapia fotodinámica es útil para eliminar virus, bacterias y células cancerosas. La eficacia de esta terapia depende del desarrollo de nuevos fotosensibilizadores capaces de absorber eficientemente incluso en el infrarrojo y generar también eficientemente las especies citotoxicas . Mayores detalles sobre este tema pueden ser encontrados en las conclusiones de la mesa de trabajo "*Terapia Fotodinamica*" de esta Red de Biofotónica.

Terapia y generación de bio-imágenes mediante materiales magnéticos:

Ciertos núcleos atómicos pueden absorber y emitir radio frecuenciaS bajo la influencia de un campo magnético. La radiación emitida puede ser utilizada para dar terapia localmente eliminando células o bien se pueden utilizar para generar una bio-imagen (imágenes por resonancia magnética) y así poder realizar un diagnóstico del objeto baso estudio. En especial, se desarrollan nanopartículas magnéticas hechas de materiales como Fe₂O₄, MnFe₂O₄, (XO)_nFe₂O₃ en done X puede ser Co, Li, Zn o Ni. En este caso los materiales con propiedades magnéticas son dirigidos selectivamente a un tejido u órgano.

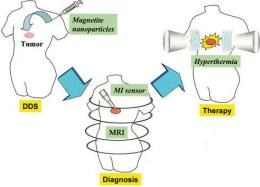


Fig. 3 Esquema del uso de nanopartículas magnéticas para diagnóstico y terapia de enfermedades

Técnicas de ensayo y Técnicas de Punto de Cuidado

De especial interés es el desarrollo de dispositivos fotónicos capaces de identificar biomoleculas y células con propósito de diagnóstico o estudio de procesos biológicos. En

este caso, hay una estrecha relación entre en desarrollo de técnicas de ensayo con el uso de biomateriales. Por ejemplo, mediante plataformas que involucran proteínas y tecnologías de laboratorio en chip (lab-on-chip) es posible hacer diagnósticos de manera no invasiva mediante el análisis de saliva, orina, fluido nasal, sangre, etc. La detección específica de analitos se lleva a cabo mediante biosensores cuya respuesta puede ser óptica y ser usada a su vez por un transductor para generar una señal medible y que es de utilidad para ser procesada y analizada.

Entre los métodos ópticos que se utilizan están ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) en la cual la detección del analito se da mediante una respuesta óptica colorimétrica o de fluorescencia. La citometría de flujo es otra aproximación en la cual las células bajo estudios atraviesan un fluido de pequeñas dimensiones y mediante el empleo de luz y biomarcadores fluorescentes se puede extraer información de las mismas. Es una técnica de empleo amplio y en la cual el desarrollo de biomarcadores específicos es de interés para medir contenido de DNA celular o identificar células asociadas a enfermedades específicas. Otra técnica de detección óptica consiste en resonancia superficial de plasmones. Más información sobre este último tema se puede encontrar en las conclusiones de otra de las mesas de trabajo de la Red de Biofotónica.

En relación a las técnicas de ensayo antes descritas, se puede agregar otra aproximación conocida como técnicas de Punto de Cuidado o Punto de Atención (*Point of Care* en inglés) que están basadas en pequeños dispositivos portátiles, de bajo costo y mantenimiento simple, y fáciles de usar para el diagnóstico usando principios de biosensado.



Fig. 4 Ilustración de técnicas de ensayo y Punto de Cuidado con el uso de biosensado óptico para diagnostico

Espectroscopia Raman Realzada por Superficie (SERS)

La espectroscopia Raman es muy útil para la identificación de sustancias a nivel molecular, pues el espectro de esparcimiento tipo Raman para una molécula en específico es único. En este sentido, el espectro Raman asociado a una sustancia determinada es una huella digital de la misma. Sin embargo, es un efecto de esparcimiento muy tenue. Para realzar el efecto, se pueden utilizar nanopartículas de metales nobles las cuales por efecto de respuesta plasmonica realzan el esparcimiento Raman de moléculas adheridas a dichas nanopartículas. El realce es de tal magnitud que permite la detección a concentraciones extremadamente pequeñas de biomoleculas en fluidos corporales.



Fig. 5 Esquema de la técnica SERS para la identificación de biomoleculas

Marcadores fluorescentes y sensores químicos colorimétricos y fluorescentes

En relación a técnicas de ensayo que se usan de manera rutinaria en laboratorios de biología y laboratorios clínicos se utilizan una variedad amplia de marcadores colorimétricos y fluorescentes disponibles comercialmente. La mayoría de estos marcadores son cromoforos y fluoróforos orgánicos (cumarinas, cianinas, Cy4, Cy5, alexas, etc.) que pueden utilizarse para cuantificar proteínas. Derivados de estos compuestos son diseñados para lograr una alta especificidad como marcadores. No obstante, tienen algunas desventajas como baja fotoestabilidad y brillo. Para solventar estas desventajas, en la actualidad se están desarrollando nuevos marcadores entre los cuales destacan los puntos cuánticos (nanopartículas de semiconductores) que tienen un alto brillo, buena fotoestabilidad y un espectro de emisión angosto que puede ser sintonizado en base al confinamiento cuántico (tamaño de particula) e ingeniería sobre la superficie del mismo. También se están desarrollando moléculas orgánicas y polímeros de nueva generación con mayor fotoestabilidad y brillo y capaces incluso de absorber en el rango infrarrojo. Gran parte de los esfuerzos por generar nuevos materiales de este tipo consiste en funcionalizar su superficie para conjugarlos con biomoléculas.

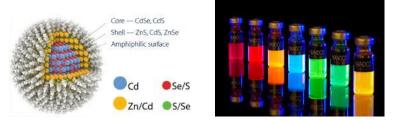


Fig. 6 Puntos cuánticos

Por otra parte, en ciencias biológicas y ambientales son de importancia los sensores químicos capaces de detectar iones metálicos (zinc, calcio, hierro, etc.) pues estos son vitales para muchos procesos bioquímicos. Es importante señalar que en la actualidad la actividad industrial del ser humano ha provocado la presencia a altas concentraciones de otros muchos iones metálicos en el medio ambiente lo que significa procesos de contaminación; cuando estos iones están presentes en organismos vivos (incluyendo el ser humano) son el origen de muchas enfermedades. Existe hoy en día una actividad importante en el mundo para desarrollar sensores químicos moleculares de respuesta colorimétrica o fluorescente para la detección selectiva de iones metálicos ya sea en organismos vivos o en el medio ambiente.

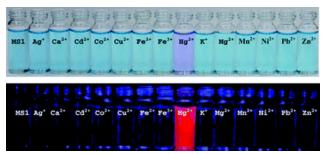


Fig. 7 Ilustración de un sensor químico colorimétrico (foto superior) y fluorescente (foto inferior) con selectividad a iones de mercurio. Cada muestra es una solución de diferentes iones metálicos que se mezcla con el sensor.

Marcadores fluorescentes para microscopia de escaneo laser

En otra de las mesas de trabajo de la Red de Biofotónica se analiza la microscopia óptica y su uso en biofotónica. En esta sección nos limitaremos a describir la importancia que tiene el desarrollo de nuevos materiales de contraste para su uso en microscopia de escaneo laser (confocal y multifotónica). Debe mencionarse que este tipo de microscopia es de un amplio uso en laboratorios de investigación biomédica, en los cuales se analiza no solo la estructura celular, sino también su dinámica, efecto de medicamentos, etc.



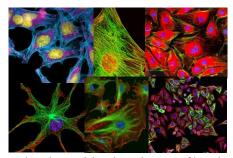


Fig. 8 Microscopia de escaneo laser para la obtención de micrografías de líneas celulares y tejido

Para generar este tipo de imágenes se requiere de marcadores de contraste (marcadores fluorescentes). Como se discutió en una sección anterior, los marcadores fluorescentes comerciales tienen varias desventajas, por lo que en la actualidad se realiza mucha investigación para generar marcadores fluorescentes de nueva generación. Muchos de estos marcadores, consisten es nanoestructuras de materiales orgánicos, inorgánicos o híbridos que además incorporan selectividad celular mediante la conjugación con biomateriales. El siguiente esquema presenta como estos marcadores son de utilidad para diagnóstico de enfermedades como el cáncer usando microscopia de fluorescencia.

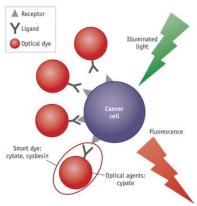


Fig. 9 Bio-conjugación de materiales fluorescentes para generar marcadores de contraste selectivos a líneas celulares de cáncer. Estos marcadores son usados para diagnóstico mediante microscopia de fluorescencia.

6.3 Desarrollo de materiales y Biofotónica en México

En general, de la consulta de base de datos como el ISI WEB se conoce lo siguiente:

- En México hay una amplia comunidad de científicos desarrollando nuevos materiales con propiedades ópticas
- Muchos de los estudios se enfocan al estudio de propiedades fotofisicas y su correlación con composición, estructura, morfología, ruta de síntesis, tamaño, etc.

Sin duda la nanociencias y nanotecnología ha dado un gran impulso al desarrollo de materiales en México con potenciales aplicaciones biofotónicas. Se hizo una búsqueda de artículos científicos publicados por investigadores y grupos de investigación que desarrollan materiales en México. Para ello se usó a base de datos del ISI-Web. Como palabras clave se emplearon algunos términos relacionados con los materiales que se usan en las técnicas biofotónicas descritas anteriormente en este documento. El número de trabajos fue significativo, indicando que la comunidad de materiales es México es significativa y de constante crecimiento. No obstante, aunque se encontró que en muchos casos el desarrollo de materiales tuvo como motivación científica su potencial uso en biofotónica u otras aplicaciones tecnológicas, tal y como se mencionaba en el resúmen o en la introducción de dichos artículos, en la practica el número de trabajos que validaron la aplicación biofotónica de tales materiales fue mucho menor. Con la finalidad de restringir la búsqueda a solo aquellos artículos en los que se realiza la validación se usaron conectores booleanos en la búsqueda. En la siguiente sección se presenta el resultado de la búsqueda. A manera de ejemplo, se muestran los casos de diferentes materiales y técnicas, y en cada caso se presente un par artículos publicados por investigadores mexicanos.

Búsqueda en ISI Web sobre trabajos en terapia fototérmica

Palabras clave de búsqueda: **Photothermal AND** (cancer OR therapy OR nanoparticles) El buscador arrojo un total de alrededor de 4 000 documentos generados por investigadores de cualquier parte del mundo. El número de trabajos para México fue de 43. La siguiente grafica muestra la estadística sobre estos trabajos:

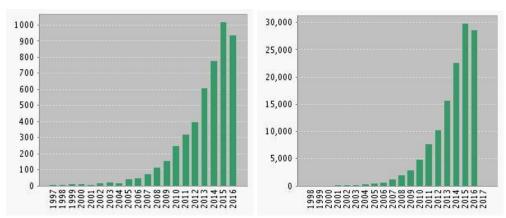


Fig. 10 Numero de artículos científicos en el mundo relacionados con terapia fototérmica (grafica de la izquierda) y el número de citas obtenidas por estos trabajos (grafica de derecha).

Se observa que esta temática ha tenido un constante crecimiento en los últimos años. Para el caso de trabajos generados por investigadores mexicanos se tiene la siguiente estadística:

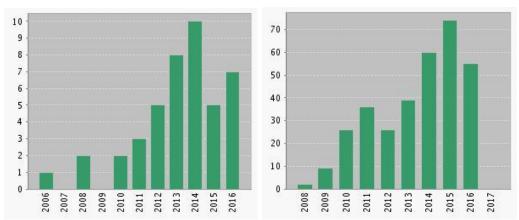


Fig. 10 Numero de artículos científicos generados por científicos mexicanos relacionados con terapia fototérmica (grafica de la izquierda) y el número de citas obtenidas por estos trabajos (grafica de derecha).

A continuación se citan un par de trabajos encontrados en esta área así como las instituciones de adscripción.

Research Article

Antibacterial and Antibiofilm Activities of the Photothermal Therapy Using Gold Nanorods against Seven Different Bacterial Strains

Juan Carlos Castillo-Martínez, Gabriel Alejandro Martínez-Castañón, Hidel Martínez-Gutierrez, Norma Veronica Zavala-Alonso, Nuria Patiño-Marín, Nereyda Niño-Martinez, V. Zaragoza-Magaña, and C. Cabral-Romero

The objective of this work was to determine the bactericidal and antibiofilm activities of gold nanorods (AuNRs) using plasmonic photothermal therapy (PPTT) against oral microorganisms. AuNRs were synthesized by the seed and growth solution method and the gold nanoclusters were characterized with a size of 33.2 nm ± 2.23 length and 7.33 nm ± 1.60 width. The efficacy of PPTT related to its temperature was done reaching 67°C. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericide concentration (MBC) of AuNRs and AuNRs PPTT were determined against *Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, Streptococcus oralis, Streptococcus salivarius*, and *Escherichia coli* growth. The antibiofilm activity of AuNRs was explored by fluorescence microscopy. After experimental analyses, AuNRs PPTT shows better results in MICs and MBCs, when it was compared with AuNRs alone. The laser employed to activate the AuNRs had no antibacterial effect against oral microbes. The MICs and MBCs values were higher for *S. aureus* and *E. coli* and lower against *S. oralis*. Surprisingly, the AuNRs alone presented a high antibiofilm activity, inhibiting the biofilm formation of *S. mutans*. Altogether, these results strongly suggest that AuNRs could be an interesting option to control oral biofilms.

Research Article

Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals

Received 8 April 2013,

Revised 7 June 2013,

Accepted 11 June 2013

Published online 19 July 2013 in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/jlcr.3087

Multifunctional targeted therapy system based on 99mTc/177Lu-labeled gold nanoparticles-Tat(49-57)-Lys3-bombesin internalized in nuclei of prostate cancer cells

Nallely Jiménez-Mancilla,^{a,b} Guillermina Ferro-Flores,^{a*} Clara Santos-Cuevas,^a Blanca Ocampo-García,^a Myrna Luna-Gutiérrez,^{a,b} Erika Azorín-Vega,^a Keila Isaac-Olivé,^b Miguel Camacho-López,^b and Eugenio Torres-García^b

Radiolabeled gold nanoparticles may function simultaneously as radiotherapy and thermal ablation systems. The gastrin-releasing peptide receptor (GRP-r) is overexpressed in prostate cancer, and Lys⁵-bombesin is a peptide that binds with high affinity to the GRP-r. HIV Tat(49–57) is a cell-penetrating peptide that reaches the DNA. In cancer cells, ¹⁷⁷Lu shows efficient crossfire effect, whereas ^{99m}TC that is internalized in the cancer cell nuclei acts as an effective system of targeted radiotherapy because of the biological Auger effect. The aim of this research was to evaluate the *in vitro* potential of ^{99m}TC-labeled and ¹⁷⁷Lu-labeled gold nanoparticles conjugated to Tat(49–57)-Lys³-bombesin peptides (^{99m}TC/¹⁷⁷Lu-ANNP-Tat-BN) as a plasmonic photothermal therapy and targeted radiotherapy system in PC3 prostate cancer cells. Peptides were conjugated to AuNPs (5 mm) by spontaneous reaction with the thiol group of cysteine (Cys). The effect on PC3 cell viability after laser heating of the AuNP-Tat-BN incubated with the cancer cells was conducted using an Nd:YAG laser pulsed for 5 ns at 532 nm (0.65 W/cm²). For the ^{99m}TC-I¹⁷⁷Lu-AuNP-Tat-BN ob to ebatained, the ¹⁷⁷Lu-DOTA-Gy-Gly-Cys and ^{99m}TC-I¹⁷⁷Lu-AuNP-Tat-BN incubated with the cancer cells was conducted using an Nd:YAG laser pulsed for 5 ns at 532 nm (0.65 W/cm²). For the ^{99m}TC-I¹⁷⁷Lu-AuNP-Tat-BN obe en the cell proliferation was evaluated after 3 days. Fluorescence images of ^{99m}TC-I¹⁷⁷Lu-AuNP-Tat-BN incubated with PC3 cells, and the effect on the cell proliferation was evaluated after 3 days. Fluorescence images of ^{99m}TC-I¹⁷⁷Lu-AuNP-Tat-BN increase in the temperature of the medium (46.4 vs 39.5 °C of that without AuNP) resulting in a significant decrease in PC3 cell viability down to 1.3%. After treatment with ^{99m}TC/I¹⁷⁷Lu-AuNP-Tat-BN, the PC3 cell proliferation was inhibited. The nanosystem exhibited properties suitable for plasmonic photothermal therapy and targeted radiotherapy in the treatment of prostate cancer.

Búsqueda en ISI Web sobre trabajos en terapia con materiales magnéticos Palabras clave de búsqueda: magnetic AND (cancer OR therapy OR nanoparticles)

¹ Ciencias Odontológicas, Facultad de Estomatologia, UASLP, Avenida Manuel Nava No. 2, Zona Universitaria, CP 78290, SLP, Mexico

²Facultad de Ciencias Quimicas, UASLP, Avenida Manuel Nava S/N, Zona Universitaria, CP 78290, SLP, Mexico

³Facultad de Ciencias, UASLP, Avenida Salvador Nava No. 2, Zona Universitaria, CP 78290, SLP, Mexico

⁴Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, CP 64460, Monterrey, NL, Mexico

En el caso de materiales magnéticos y su uso para terapia y diagnostico mediante bioimagenes se encontraron registros de 4500 trabajos de todo el mundo, de los cuales aproximadamente 300 corresponden a trabajos generados por investigadores mexicanos. La estadística para México es la siguiente:

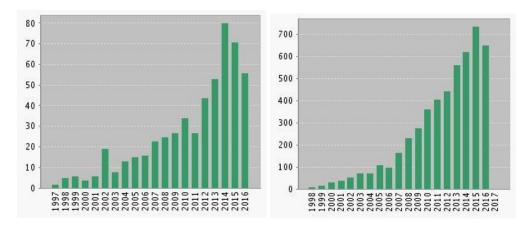


Fig. 11 Número de artículos generados por científicos mexicanos relacionados con materiales magnéticos en biofotónica (grafica de la izquierda) y el número de citas obtenidas por estos trabajos (grafica de derecha).

Se observa que este campo de materiales magnéticos es uno de los más activos en el área de biofotónica en México. Se citan a continuación un par de trabajos en esta área



OPEN Plasmonic/Magnetic Multifunctional nanoplatform for **Cancer Theranostics**

Received: 11 April 2016 Accepted: 09 September 2016 Published: 10 October 2016

M. Ravichandran¹, Goldie Oza², S. Velumani³, Jose Tapia Ramirez², Francisco Garcia-Sierra⁴, Norma Barragan Andrade⁴, A. Vera⁵, L. Leija⁵ & Marco A. Garza-Navarro⁶

A multifunctional magneto-plasmonic CoFe₂O₄@Au core-shell nanoparticle was developed by iterativeseeding based method. This nanocargo consists of a cobalt ferrite kernel as a core (Nk) and multiple layers of gold as a functionalizable active stratum, (named as Nk@A after fifth iteration). Nk@A helps in augmenting the physiological stability and enhancing surface plasmon resonance (SPR) property. The targeted delivery of Doxorubicin using Nk@A as a nanopayload is demonstrated in this report. The drug release profile followed first order rate kinetics optimally at pH 5.4, which is considered as an endosomal pH of cells. The cellular MR imaging showed that Nk@A is an efficient T2 contrast agent for both L6 $(r_2-118.08\,\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1})$ and Hep2 $(r_2-217.24\,\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1})$ cells. Microwave based magnetic hyperthermia studies exhibited an augmentation in the temperature due to the transformation of radiation energy into heat at 2.45 GHz. There was an enhancement in cancer cell cytotoxicity when hyperthermia combined with chemotherapy. Hence, this single nanoplatform can deliver 3-pronged theranostic applications viz., targeted drug-delivery, T2 MR imaging and hyperthermia.

¹Program on Nanoscience and Nanotechnology, Av. 2508 National Polytechnic Institute, Gustavo A. Madero, San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, Mexico. ²Department of Genetics and Molecular Biology, Av. 2508 National Polytechnic Institute, Gustavo A. Madero, San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, Mexico. 3Department of Electrical Engineering, Av. 2508 National Polytechnic Institute, Gustavo A. Madero, San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, Mexico. Department of Cell Biology, Av. 2508 National Polytechnic Institute, Gustavo A. Madero, San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, Mexico. 5 Department of Electrical Engineering - Bioelectronics Section, CINVESTAV-IPN, Av. 2508 National Polytechnic Institute, Gustavo A. Madero, San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City. Department of Mechanical and Electrical Engineering, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, San Nicolás de Los Garza, Nuevo León, 66451 Mexico City, Mexico. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.V. (email: velu@cinvestav.mx) or J.T.R. (email: jtapia@cinvestav.mx)



Cite this: RSC Adv., 2016, 6, 77558

Enhanced magnetic properties and MRI performance of bi-magnetic core-shell nanoparticles

Fernando Arteaga Cardona,** Esmeralda Santillán Urquiza,* Patricia de la Presa,* Silvia Hidalgo Tobón, de Umapada Pal, Patricia Horta Fraijo,* Miguel José Yacaman,* José Daniel Lozada Ramírez, a Robert Ivkov, h Aracely Angulo-Molina and Miguel Ángel Méndez-Rojas*

Two sets of bi-magnetic Zn_{0.5}Mn_{0.5}Fe₂O₄@Fe₃O₄ core-shell nanoparticles were prepared by a seedmediated modified co-precipitation method. While the first set was obtained by fast addition of the alkaline solution to grow Fe₃O₄ shells over the ferrite seeds, a slow drop-wise addition of stoichiometric Fe²⁺/Fe³⁺ ion solution to the alkaline ferrite seeds solution was adopted to synthesize the second set. Samples were characterized by electron microscopy (STEM, TEM, UHRTEM) and magnetometry measurements. Viability MTT assay of the nanoparticles on L929 murine fibroblasts were performed. indicating that they are biocompatible. The coating of the $\rm Zn_{0.5}Mn_{0.5}FeO_4$ nanoparticle by a magnetite or maghemite shell minimizes the effect of the magnetic dead layer at the core surface, improving the magnetic properties and offering thus outstanding values for biological application. Relaxometry values r_2 higher than 300 mM⁻¹ s⁻¹ at H 1.5 T, and cell viability at concentrations as high as 0.5 mg mL⁻¹ means these bi-magnetic nanoparticles have a vast potential as MRI contrast agents.

Received 1st June 2016 Accepted 2nd August 2016 DOI: 10.1039/c6ra14265f

www.rsc.org/advances

Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de las Américas Puebla 72810 Puebla, Mexico. E-mail: fernando.arteagaca@udlap.mx; miguela.mendez@ udlap.mx; Tel: +52 222 4568069; +52 222 2292607

Instituto de Magnetismo Aplicado, UCM-ADIF-CSIC, A6 22,500 Km, 28230 Las Rozas,

^dDepartamento de Física, Universidad Autónoma Metropolitana, Avenida San Rafael Atlixco 186 Iztapalapa, Mexico City, Mexico

Departamento de Imagenología, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr Marquez, Col. Doctores, Mexico City, Mexico

Instituto de Física, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Apdo. Postal J-48, Puebla, Pue. 72570, Mexico

Department of Physics and Astronomy, University of Texas at San Antonio, One UTSA

Circle, San Antonio, TX 78249, USA Department of Radiation Oncology and Molecular Radiation Sciences, Johns Hopkins

University School of Medicine, Baltimore, MD 21287, USA

Departamento de Ciencias Químico-Biológicas/DIFUS, Universidad de Sonora Colonia Centro, 83000, Hermosillo, Sonora, Mexico

Búsqueda en ISI Web sobre trabajos en diagnóstico y bioimagenes usando materiales luminiscentes

Palabras clave de búsqueda: (Fluorescence OR luminescent) AND (cancer OR therapy **OR** nanoparticles)

El buscador arrojo un total de alrededor de 200 documentos generados por investigadores de México en esta área. La estadística sobre estos trabajos es:

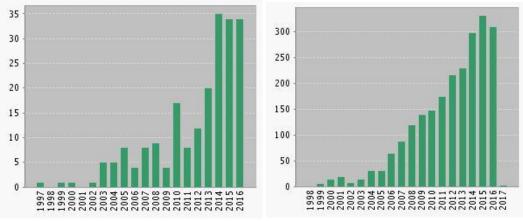


Fig. 12 Número de artículos generados por científicos mexicanos relacionados con materiales luminiscentes en biofotónica (grafica de la izquierda) y el número de citas obtenidas por estos trabajos (grafica de derecha).

Se citan a continuación un par de trabajos en esta área

Two-Photon Imaging of a Cellular Line Using Organic Fluorescent Nanoparticles Synthesized by Laser Ablation

Laura Aparicio-Ixta, J. E. Alba-Rosales, Gabriel Ramos-Ortiz,* Mario Rodriguez, Juan L. Pichardo-Molina, Gerardo Gutierrez-Juarez, Myrna Sabanero-Lopez, Liss Flores Villavicencio, Rosa Santillan, Víctor M. Tellez-Lopez, and Daniel Martinez-Fong

A comparative study of the optical properties of organic fluorescent nanoparticles fabricated by laser ablation (NPs-LA), reprecipitation (NPs-RP), and microemulsion (NPs-ME) methods is presented. These nanoparticles contain a fluorene-based p-conjugated molecule (BT2). Distinctive electronic transitions are observed in samples due to the specific way in which the molecule BT2 is assembled in each type of nanoparticles; for instance, transitions involved in absorption and emission spectra of NPs-LA result in blueshifting with respect to the molecular solution of BT2, whereas redshifting is observed in NPs-RP and NPs-ME. Further, the results show that under infrared excitation, the aqueous suspensions of NPs-LA exhibit the highest fluorescence induced by two-photon absorption (≈790 GM at 740 nm), as well as the best photostability, compared with aqueous suspensions of NPs-RP and NPs-ME. The nanoparticles synthetized by the three aforementioned methods are employed as exogenous agents for the visualization of human cervical cancer cell line (HeLa) using confocal and two-photon microscopy. Under similar experimental conditions, it is found that microscopy images of the best quality are obtained with NPs-LA. These results show that laser ablation is a suitable technique for the fabrication of organic fluorescent nanoparticles used as contrast agents for in vitro fluorescence microscopy.

L. Aparicio-Ixta, Prof. G. Ramos-Ortiz, Prof. M. Rodriguez, Prof. J. L. Pichardo-Molina Centro de Investigaciones en Óptica A. C., A.P. 1-948, 37000 León, Gto., Mexico E-mail: garamoso@cio.mx J. E. Alba-Rosales, Prof. G. Gutierrez-Juarez División de Ciencias e Ingeniería Campus León Universidad de Guanajuato Loma del bosque 103 Lomas del Campestre 37150 León, Gto., Mexico Prof. M. Sabanero-Lopez, L. F. Villavicencio Departamento de Biología Div. Ciencias Naturales y Exactas Universidad de Guanajuato

Guanajuato 36050, Gto., Mexico

Synthesis, characterization and biocompatibility of cadmium sulfide nanoparticles capped with dextrin for in vivo and in vitro imaging application

Jorge Reyes-Esparza¹, Alberto Martínez-Mena¹, Ivonne Gutiérrez-Sancha¹, Patricia Rodríguez-Fragoso², Gerardo Gonzalez de la Cruz², R. Mondragón³ and Lourdes Rodríguez-Fragoso^{1*}

Abstract

Background: The safe use in biomedicine of semiconductor nanoparticles, also known as quantum dots (QDs), requires a detailed understanding of the biocompatibility and toxicity of QDs in human beings. The biological characteristics and physicochemical properties of QDs entail new challenges regarding the management of potential adverse health effects following exposure. At certain concentrations, the synthesis of semiconductor nanoparticles of CdS using dextrin as capping agent, at certain concentration, to reduce their toxicity and improves their biocompatibility.

Full list of author information is available at the end of the article

^{*}Correspondence: mrodriguezf@uaem.mx

¹ Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62210, Mexico

Búsqueda en ISI Web sobre trabajos en biosensores y sensores químicos luminiscentes y colorimétricos

Palabras clave de búsqueda: (Fluorescence OR luminiscent) AND (sensors)

El buscador arrojo un total de alrededor de 100 documentos generados por investigadores de México en esta área. La estadística sobre estos trabajos es:

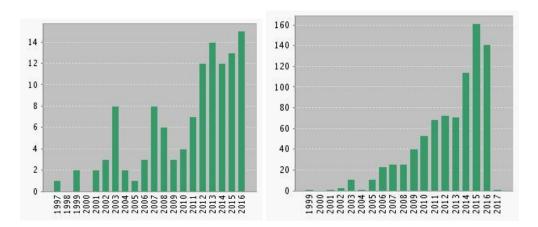


Fig. 13 Número de artículos generados por científicos mexicanos relacionados con biosensores y sensores químicos luminiscentes (grafica de la izquierda) y el número de citas obtenidas por estos trabajos (grafica de derecha).

Se citan a continuación un par de trabajos en esta área



Three novel input logic gates supported by fluorescence studies: Organic nanoparticles (ONPs) as chemo-sensor for detection of Zn²⁺ and Al³⁺ in aqueous medium



C.A. Huerta-Aguilar a, T. Pandiyan a,*, N. Singh b, N. Jayanthi c

^a Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D.F., Mexico

b Indian Institute of Technology (IIT), Ropar, Punjab, India
CDivisión de Nanotecnología, Universidad Politécnica del Valle de México (UPVM), Av. Mexiquense, C.P. 54910 Tultitlan, Estado de México, Mexico

Organic nanoparticles (ONPs) of N,N'-ethylenebis(salicylimine) (salen) were synthesized and applied for specific recognition of Zn^{2+} and Al^{3+} ions in an aqueous medium. The results show that fluorescence intensity rises with the increasing concentration of Zn^{2+} in salen solution, proving that salen-ONPs detect Zn^{2+} efficiently in the aqueous medium as chemo-sensor. Furthermore, the salen-ONPs/ Zn^{2+} system performs as an ON-OFF switch between pH 6.0 and 4.0. Amusingly, although salen-ONPs/ Al^{3+} does not show any significant effect in the fluorescence spectra, highest fluorescence intensity was observed when Al^{3+} ion was added to salen-ONPs/ Zn^{2+} in a sequential order (addition of Zn^{2+} to salen-ONPs, followed by Al^{3+}). This system can be applied as a novel three inputs logic gate supported by the fluorescence for the detection of Zn^{2+} and Al^{3+} in biological and environmental samples. It appears that photo induced electron transfer (PET) occurs in the salen-ONPs when the fluorophore is excited. For salen/ Zn^{2+} system, the PET is being inhibited considerably by lowering the receptor HOMO energy due to the formation of a bond between the metal ion and ligand, enhancing the fluorescence emission. This is consistent with the theoretical study that the energy of HOMO of the ligand is lower than that of $Zn(salen)^{2+}$ complex.

Article

Design and Test of a Low-Cost RGB Sensor for Online Measurement of Microalgae Concentration within a Photo-Bioreactor

Micaela Benavides ¹, Johan Mailier ¹, Anne-Lise Hantson ¹, Gerardo Muñoz ², Alejandro Vargas ², Jan Van Impe ³ and Alain Vande Wouwer ^{1,*}

- BioSys, University of Mons, Boulevard Dolez 31, 7000 Mons, Belgium; E-Mails: micaela.benavides@umons.ac.be (M.B.); johan.mailier@fpms.ac.be (J.M.); anne-lise.hantson@umons.ac.be (A.-L.H.)
- ² Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de Méxic Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro 76230, Mexico; E-Mails: GMunozM@ii.unam.mx (G.M.); AVargasC@ii.unam.mx (A.V.)
- ³ Department of Chemical Engineering, Catholic University of Leuven, 3001 Leuven, Belgium; E-Mail: jan.vanimpe@cit.kuleuven.be

Abstract: In this study, a low-cost RGB sensor is developed to measure online the microalgae concentration within a photo-bioreactor. Two commercially available devices, *i.e.*, a spectrophotometer for offline measurements and an immersed probe for online measurements, are used for calibration and comparison purposes. Furthermore, the potential of such a sensor for estimating other variables is illustrated with the design of an extended Luenberger observer.

Búsqueda en ISI Web sobre trabajos en SERS

Palabras clave de búsqueda: surface enhanced Raman Spectroscopy OR SERS

El buscador arrojo un total de alrededor de 100 documentos generados por investigadores de México en esta área. La estadística sobre estos trabajos es:

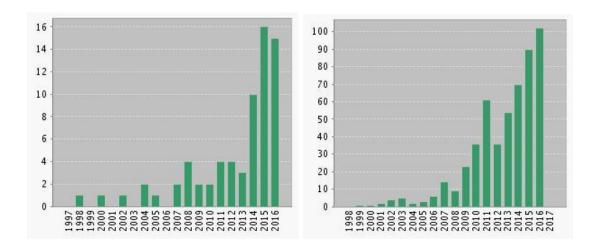


Fig. 14 Número de artículos generados por científicos mexicanos relacionados con SERS (grafica de la izquierda) y el número de citas obtenidas por estos trabajos (grafica de derecha).

Interaction of TGA@CdTe Quantum Dots with an Extracellular Matrix of Haematococcus pluvialis Microalgae Detected Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)

Elisa Cepeda-Pérez¹, Iris Aguilar-Hernández², Tzarara López-Luke¹, Valeria Piazza¹, Ramón Carriles¹, Nancy Ornelas-Soto², and Elder de la Rosa¹

Abstract

The present study reports the localization and interaction of thioglycolic acid (TGA) capped CdTe quantum dots (TGA@CdTe QDs) within the extracellular matrix (ECM) of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) microalgae (HPM) after an incubation period of 5 min. Changes in the Raman spectrum of HPM induced by the adsorption of the TGA@CdTe QDs are successfully found by using naked gold anisotropic structures as nano-sensors for surface-enhanced Raman scattering (SERS effect). Raman spectroscopy results show that TGA@CdTe QDs interact with the biomolecules present in the ECM. Sample preparation and characterization by complementary techniques such as confocal and electron microscopy are also used to confirm the presence and localization of the nanoparticles in the algae. This research shows new evidence on early accumulation of QDs in plant cells and would further improve our understanding about their environmental impact.

SERS spectroscopy and SERS imaging of Shewanella oneider silver nanoparticles and nanowires†‡

Sandra Preciado-Flores, Damon A. Wheeler, Tuan Minh Tran, California, Zuki Tanaka, California, Tuan Minh Tran, Tuan Minh Tran, Tuan Minh Tran, Tuan Minh Tran, California, Cal Chaoyang Jiang, Marcelino Barboza-Flores, Fang Qian, Yat Li, Bin Chen*c and Jin Z. Zhang*a

Facile and reproducible SERS signals from Shewanella oneidensis were obtained utilizing silver nanoparticles (AgNPs) and silver nanowires (AgNWs). Additionally, SERS images identify the distribution of SERS hot-spots. One important observation is the synergistically enhanced SERS signal when AgNPs and AgNWs are used in conjunction, due to constructively enhanced electromagnetic field.

a Department of Chemistry and Biochemistry, University of Califo Santa Cruz, CA 95060, USA. E-mail: zhang@ucsc.edu; Tel: +1 831-459-3776

b Department of Chemical Engineering, University of Wisconsin,

Madison, WI 53706-1607, USA

^c Advanced Studies Laboratories, NASA Ames Research Center, Moffett Field, California, 94035, USA. E-mail: Bin.Chen-1@nasa.gov; Tel: +1 650 6040310

^d Department of Electrical Engineering, University of California, Santa Cruz, CA 95060, USA e Department of Chemistry, University of South Dakota,

Vermillion SD 57069, USA

f Centro de Investigación en Física de la Universidad de Sonora, Apartado Postal 5-088, Hermosillo, Sonora, 83190, México

6.4 Fortalezas y Retos en el desarrollo de materiales biofotónicos en México.

Aunque la información presentada anteriormente puede no ser exhaustiva al no abarca la totalidad de temáticas sobe materiales y biofotónica en México. No obstante, debe señalarse que el ejercicio proporciona información valiosa pues presenta del número de artículos científicos restringidos a aquellos casos en que se hace una validación de los materiales y técnicas en aplicaciones biofotónicas (in vivo, ex vivo, in vitro). Es evidente entonces que el número de artículos publicados en México en relación a materiales es mucho mayor siendo que en México se desarrollan muchos materiales con potenciales aplicaciones biofotónicas, pero su validación no se lleva a cabo. Por otra parte, destaca el hecho de que muchos de los desarrollos de validación o construcción de instrumental la realizan los investigadores mexicanos en colaboración con laboratorios extranjeros. Si bien la colaboración internacional fortalece e impulsa nuestras líneas de investigación, se observa que en México existe la infraestructura e investigadores con la experiencia para realizar dicha validación. En este sentido, se puede concluir que falta interacción y conocimiento entre los investigadores mexicanos para poder llevar a cabo esta validación. También debe mencionarse que de la literatura se observa que en México existen varios grupos que si realizan el desarrollo de nuevos materiales biofotónicos y validan su aplicación en técnicas de ensayo, generación de bioimaganes y terapia. Algunos grupos incluso han empezado a trabajar en materiales teranósticos (materiales capaces de realizar diagnóstico y terapia). De manera sucinta, podemos llegar a las siguientes conclusiones de fortalezas y áreas de oportunidad que existen en el desarrollo de materiales biofótonicos en México.

Tabla 1. Fortalezas y Retos de la investigación de materiales biofotónicos en México

Fortalezas	Áreas de oportunidad
Existe un comunidad muy amplia de científicos	Un alto porcentaje de la investigación en materiales
haciendo investigación en el área de materiales	biofotónicos que se realiza en México no concluye
	en una validación del tipo in vivo, ex vivo o in vitro
La comunidad trabajando en materiales	Falta interacción de científicos con diferente
biofotónicos está en pleno crecimiento	formación. La Red de Biofotónica debe impulsar la
	multidisciplinariedad
La infraestructura para el desarrollo y	La Red de Biofotónica puede aglutinar esfuerzos
caracterización de nuevos materiales en México	para la creación de infraestructura de uso común en
es aceptable.	un Laboratorio Nacional de Biofotónica
Cada vez existen más programas de posgrado e	Priorizar el desarrollo de algunos materiales
incluso de pregrado especializados en materiales.	biofotónicos para resolver problemas de salud y
A1	ambientales de relevancia en México
Algunos grupos de investigación empiezan a	No existe un lenguaje común entre las diferentes
realizar investigación multidisciplinaria	comunidades (físicos, químicos, biólogos, médicos) para abordar temáticas prioritarias para México en el
	área de biofotónica
La comunidad científica de físicos que trabajan	Se observa una participación casi nula del sector
en óptica es significativa. De esta comunidad,	salud y médicos en la definición de problemas que
mucha investigación se está dirigiendo hacia	son abordados por investigadores que desarrollan
biofotónica y materiales desde diferentes	nuevos materiales biofotónicos.
perspectivas (bio-nanomateriales, investigación	And you make made of or
sobre cáncer, óptica no lineal, fibras ópticas,	
plásmonica, microscopía óptica de alta y	
superresolución, infrarrojo	
Los trabajos de investigación que se desarrollan	Mucha investigación es fundamental y orientada a
en México en materiales biofotónicos y su	aplicaciones, pero hay una ausencia notable de
validación son relativamente bien citados por la	desarrollos de ingeniería para dispositivos. Véase por
comunidad internacional.	ejemplo el caso de la tecnología de Punto de
	Atención.
Mucha de la investigación que se desarrolla	Falta desarrollar la infraestructura en el área de
pudiera extenderse a la industria de los alimentos	microfluidica dispositivos biofotónicos basados en
y agricultura	plataformas y micro/nano (lab on chip)

6.5 Grupos de Trabajo de materiales y Biofotónica en México

La siguiente lista puede ser aun no exhaustiva, pero ilustra de manera apropiada la los grupos de investigación que desarrollan materiales biofotónicos.

7. Cavitación

Francisco Perez (UASLP) y Juan Pablo Padilla (BUAP)
Coordinadores
Santiago Camacho Lopez (CICESE)
Ruben Ramos Garcia (INAOE)
Hector Cerecedo Nuñez (UV)
Pedro Quinto Su (ICN-UNAM)

7.1. Breve historia y desarrollo de la cavitación en el mundo

La cavitación es la formación, evolución y colapso de burbujas de vapor en líquidos. Una característica única de cavitación es el colapso violento de las burbujas dando lugar a la formación de ondas de choque. De hecho, el daño provocado por el colapso de las burbujas de cavitación en las hélices de los barcos y perdida de potencia motivó al ministerio de marina británico a crear una comisión especial instituida para investigar las causas de este daño mecánico. La comisión reportó que el daño era principalmente debido a "golpes hidráulicos" que las hélices sufrían debido a burbujas de cavitación colapsando [1]. Desde entonces se empezó a estudiar la cavitación de manera metódica tanto experimental como teórica.

El primer estudio teórico sobre cavitación fue hecho por Lord Rayleigh en 1917, quien consideró el colapso de una burbuja esférica dentro de un fluido infinito y con ello, logró explicar el ahora bien conocido mecanismo de implosión [2]. Durante la implosión de una burbuja esférica se generan presiones extremadamente altas (ondas de choque), las cuales son consideradas como el principal mecanismo de daño por cavitación. En 1996, Bejamin y Ellis [3] estudiaron el comportamiento de una burbuja esférica cerca de una superficie sólida, reportando la formación de un jet en los últimos momentos del colapso de la burbuja, sugiriendo que el impacto de este jet con la superficie podría ser la principal causa de daño por cavitación. Sin embargo, dos años más tarde Philipp y Lauterborn observaron el colapso de una burbuja de cavitación usando una cámara de alta velocidad [4]. En este estudio, fue reportado que el principal mecanismo de daño por cavitación es debido a onda de choque generada en el momento del colapso producida muy cerca de la superficie sólida.

A partir de esta breve revisión histórica, podríamos decir que cavitación es un fenómeno no deseable. Sin embargo, este fenómeno juega un papel importante tanto en la industria como en el campo de la biomedicina. El estudio de cavitación no solo involucra la formación y colapso de la burbuja, sino también las posibles aplicaciones de este fenómeno. Por lo cual, más adelante presentamos una breve descripción sobre los diferentes mecanismos para generar burbujas de cavitación (enfocando nuestro principal interés en cavitación inducida por láser), así como algunas de las aplicaciones en las cuales este fenómeno puede ser efectivamente utilizado.

7.2 Tipos de Cavitación

Los métodos más comunes para producir burbujas de cavitación incluyen: (i) el uso de ultrasonido generado por transductores piezoeléctricos (cavitación acústica), la cual es ampliamente utilizado sonoluminiscencia y en aplicaciones médicas; (ii) flujo de agua a alta velocidad, por ejemplo, la cavitación producida por las hélices de los barcos o en maquinaria hidráulica (cavitación hidráulica); (iii) descarga eléctrica o partículas elementales en agua (cavitación de partículas); y por último, mediante (iv) láseres pulsados o de onda continua enfocados en soluciones de bajo o alto coeficiente de absorción, respectivamente (cavitación óptica: OC). En el presente documento, centraremos nuestra atención en OC o también conocida como cavitación inducida por láser (CIL).

Cavitación inducida por láser

A lo largo de los años, se puede identificar que los esfuerzos se han centrado en tres aspectos de la CIL: (1) Elucidar los mecanismos físicos que producen las burbujas, (2) estudiar el proceso de los ciclos de crecimiento y colapso de una burbuja mientras pierde energía por disipación viscosa en el fluido, a través de experimentación y propuestas de modelos matemáticos que ayuden a comprender el rol de las variables involucradas y, (3) usar la CIL para aplicaciones prácticas. Esta sección presenta un panorama general siguiendo las tres etapas mencionadas.

7.3 Mecanismos de producción

La generación de CIL se presenta bajo diferentes escenarios físicos dependiendo del mecanismo de interacción entre la luz láser y el medio. En el caso más general, para inducir una burbuja usando luz láser se requiere acoplar energía óptica de un haz láser a un medio que vaporice cierto volumen de éste. El medio puede ser algún fluido o materiales viscoelásticos, como los geles o tejidos biológicos; en este documento se hablará simplemente del "medio". Entre muchos fenómenos físicos en la interacción de luz láser y un medio, el acoplamiento de energía puede ocurrir en dos regímenes claramente identificados: la absorción lineal y la absorción no lineal. Que ocurra una u otra depende de la combinación de las propiedades ópticas del medio y la intensidad de la luz láser.

7.3.1 Absorción lineal

En este régimen el acoplamiento de energía óptica al medio está descrita por la Ley de Beer, donde el coeficiente de absorción lineal es la propiedad óptica que domina la interacción La absorción lineal se presenta cuando se emplean haces de baja intensidad, como son los de onda continua o pulsos láser con duración de milisegundos o microsegundos. La energía acoplada eleva la temperatura del medio y se difunde en forma de calor en éste. Las condiciones de irradiación, es decir, la combinación del coeficiente de absorción del medio y la potencia (para haces de onda continua), o la fluencia (para pulsos láser), da origen a diversos escenarios físicos de producción de CIL que se describen a continuación.

7.3.2 Termocavitación

Este mecanismo de absorción lineal es relativamente nuevo y fue redescubierto en México en 2010. Ocurre cuando se enfoca un láser de onda continua en una solución absorbente a la longitud de onda del láser empleado, calentando el fluido por encima del punto de ebullición sin que hierva produciendo un líquido supercaliente. Existe un límite al cual el líquido puede ser supercalentado, en particular para agua dicho límite es ~300°C para agua ultrapura. Dado que la radiación es rápidamente absorbida (debido al alto coeficiente de absorción) una vez que entra al líquido, el líquido supercaliente está localizado en la entrada al líquido, y por lo tanto, la burbuja que se forma está en todo momento en contacto con la pared de entrada. La burbuja generada es semiesférica, en contraste con el caso de burbujas inducidas por láseres pulsados en el régimen de absorción no lineal, donde las

burbujas pueden formarse en el volumen del líquido determinado por la distancia focal de la lente. Adicionalmente, mientras el haz láser se mantenga enfocado sobre la solución absorbente, la cavitación se producirá de manera continua cuya frecuencia de cavitación es determinada por la intensidad del láser. El caso de la termocavitación es interesante porque para una potencia láser y coeficiente de absorción determinados, el tamaño (por ende el tiempo de colapso) y frecuencia de formación de las burbujas varía en la medida que el foco del láser se desplaza hacia dentro o fuera de la solución. Cuando el foco está cerca de la interfase las burbujas son más pequeñas y tienen tiempo de colapso menor, mientras que sucede lo opuesto en la medida que el foco se aleja de la interfase. Si la burbuja se induce en la cercanía de la superficie libre del fluido, se forman chorros de fluido que lo eyectan del cuerpo del mismo y éstos han encontrado potenciales aplicaciones prácticas[5], [6],[7],[8]–[12].

7.3.3 Partículas calentadas por láser

Se ha encontrado que el mecanismo para inducir daño (deseado o no) en tejidos biológicos que contienen partículas absorbentes a través de un láser es la formación de burbujas alrededor de éstas. Estas partículas tienen coeficiente de absorción lineal superior al del medio en el que se encuentran y son las responsables de acoplar la energía óptica de la luz láser al medio. La vaporización del medio circundante a estas partículas puede ocurrir a distintas temperaturas dependiendo de la presión local ocasionada por la interacción de ondas de presión originadas en la expansión térmica de los cromóforos alcanzados por el láser y respectivas reflexiones [13],[14][15], [16], [17],[18], [19],[20] [21].

7.3.4 Absorción no lineal

La cavitación óptica basada en este mecanismo surgió casi inmediatamente después del descubrimiento del láser [22]–[24]. En este régimen se acopla energía óptica a un medio transparente tal que la energía del fotón es pequeña comparada con la energía de excitación necesaria para ionizar el medio. Se presenta típicamente cuando se emplean pulsos láser cortos (nanosegundos o más cortos), que contienen mucha energía en un tiempo corto y por lo tanto tienen alta intensidad. Cuando el campo electromagnético del pulso láser interactúa con el medio existe una combinación de procesos de ionización multifotónica y en avalancha. Si se alcanza el umbral de densidad de electrones libres de 10^{18} and 10^{21} cm⁻³ se produce un plasma. El plasma absorbe la radiación incidente y lo calienta a temperaturas de varios miles de Kelvins, vaporizando el agua con la rodea (ver referencia [25] y referencias ahí citadas) y por lo tanto dando lugar a la formación de una burbuja de vapor.

7.3.5 Esfuerzo de tensión

Cuando un medio es irradiado con un pulso láser de duración menor al tiempo en el que ocurre su expansión termoelástica, se dice que se cumplen las condiciones de confinamiento temporal de esfuerzo térmico, que se define como $\square_{\square\square}\square_{\square}\square_{\square}\ll I$, donde $\square_{\square\square}$ es el coeficiente de atenuación óptica, \square_{\square} es la velocidad del sonido en el medio y \square es la duración del pulso láser. Cuando estas condiciones se cumplen, el volumen calentado por el pulso láser experimenta dilatación térmica muy rápida y produce una onda de presión que se propaga en el medio; cuando ésta interactúa con una interfase de

impedancia acústica mayor, se refleja hacia el medio con signo cambiado, produciendo así una onda de presión negativa (generando un esfuerzo de tensión) en el medio. Mientras esta onda de tensión se propaga, el medio experimenta una presión local menor, produciendo un cambio de fase a una temperatura menor al punto de ebullición a la presión atmosférica (100°C para el caso de agua) [26], [27], [28], [29].

7.4. Dinámica de las burbujas y métodos de detección

Desde el inicio de los estudios de CIL se ha puesto atención a entender los ciclos de expansión y colapso que una burbuja experimenta mientras disipa su energía al medio donde fue inducida. El modelo matemático más empleado para este fin es la famosa ecuación de Rayleigh-Plesset (ERP) [2], [30]–[32], que describe la evolución temporal del radio de una burbuja esférica; esta ecuación considera los efectos de la diferencia de presiones dentro y fuera de la burbuja, de la viscosidad y tensión superficial del medio, así como la transferencia de masa del gas disuelto hacia la burbuja y la transferencia de calor. Cabe señalar que la dinámica de las burbujas lejos de paredes sólidas es descrita muy bien por la ERP. Sin embargo, cuando la burbuja es creada cerca de paredes (solidas o suaves) condiciones de frontera adecuadas deben tomarse en cuenta. La dinámica de las burbujas es muy diferente dando lugar a un colapso asimétrico de la misma y a la generación de chorros de alta velocidad dirigidos hacia el substrato. En resumen, la ERP describe muy bien la física de las burbujas bajo múltiples condiciones. Una descripción completa de la dinámica de burbujas cerca de interfaces se pueden encontrar en las referencias [33]–[37].

En forma paralela a los estudios teóricos, se ha puesto atención a comprobar experimentalmente lo descrito en la ecuación de Rayleigh-Plesset [2], [30]–[32]. Además, los experimentos han contribuido a encontrar y entender situaciones donde la dinámica de la burbuja se desvía del comportamiento totalmente esférico y que tienen aplicaciones prácticas. Con este objetivo se han desarrollado diversas técnicas experimentales que permiten estudiar la evolución temporal de las burbujas, cada una con sus ventajas y desventajas, que a continuación se describen.

7.4.1 Video de alta velocidad

Como el fenómeno de CIL es muy rápido, burbujas grandes que pueden llegar a medir 1 mm de diámetro tienen un tiempo de vida que dependiendo de la diferencia de presiones entre el interior y el exterior y las propiedades mecánicas del medio, es típicamente de centenas de microsegundos, por lo que el uso de cámaras de alta velocidad con capacidad de grabar hasta 100,000 cuadros por segundo ha sido una herramienta fundamental. Hoy en día se pueden grabar hasta 1 000,000 cuadros por segundo. Este tipo de video tiene la ventaja de que se puede grabar un evento de cavitación por completo y que al ser basado en imagen, se pueden estudiar eventos de cavitación no esféricos [8], [10]. Tiene la desventaja que requiere un mucho tiempo de procesamiento de imágenes y que pese a ser video de alta velocidad, no es capaz de detectar los colapsos de las burbujas con precisión.

7.4.2 Imágenes resueltas en el tiempo

Es un método atractivo cuando no se dispone de una cámara de alta velocidad. Consiste en inducir un evento de CIL y tomar una imagen de la burbuja en un tiempo posterior a cuando ésta fue inducida. Para lograr la resolución temporal que el fenómeno requiere, es necesario contar con la instrumentación necesaria. Una alternativa es una serie de fibras ópticas con diferente longitud a donde se introduzca parte de la luz láser que induce la burbuja para que viaje dentro de la fibra y sirva como iluminación para tomar la imagen en un tiempo posterior. Otra opción es contar con un segundo láser que sea sincronizado con el que induce la burbuja, tal que este segundo pulso sirva como iluminación para adquirir la imagen. Tiene la misma ventaja que el video de alta velocidad en el sentido de poder capturar información de burbujas no esféricas y, con la electrónica adecuada puede alcanzar resolución temporal de acuerdo a la duración del pulso de iluminación, esto es femtosegundos hasta nanosegundos. La desventaja es que también requiere de tiempo de procesamiento de imágenes, pero además no es posible obtener imágenes de un solo evento de CIL, sino que se trata de inducir múltiples burbujas y adquirir imágenes con tiempo de retraso con respecto al pulso de bombeo en cada evento de CIL. Al final lo que se obtiene es un promedio de varios eventos de CIL, por lo que es todavía menos eficaz al determinar el tiempo de colapso de las burbujas que el video de alta velocidad. Esta técnica de adquisición de imágenes o el video de alta velocidad se puede combinar con otros métodos como fotografía Schlieren, holografía, contraste de fases, etc. [18], [27], [26], [38]

7.4.3 Transmitancia espacial modulada

Consiste en inducir una burbuja y hacer pasar a través de ésta un haz de onda continua como haz de prueba que es monitoreado por un fotodetector conectado a un osciloscopio. La presencia de la burbuja disminuye la cantidad de luz del haz de prueba que llega al fotodetector y como consecuencia la señal en el fotodiodo disminuye, la amplitud de esta señal es inversamente proporcional al tamaño de la burbuja. Se han desarrollado algoritmos que calculan la propagación del haz de prueba a través de una burbuja que se expande y colapsa en el tiempo con base en la señal adquirida en el osciloscopio, y de esta manera se reproduce la dinámica de la burbuja. Tiene la ventaja que el proceso se desarrolla para un solo evento de CIL y puede detectar el tiempo de colapso con una precisión igual a la tasa de adquisición del osciloscopio y tiempo de respuesta del fotodetector. Tiene la limitación de funcionar, al menos en su estado actual, solamente para burbujas esféricas y que no se desplazan del punto donde fueron inducidas [39], [40]

7.4.4 Deflexión del haz de prueba

Se basa en inducir una burbuja con un pulso láser y hacer pasar un haz de onda continua como haz de prueba enfocado en el punto donde se induce el plasma para generar la burbuja. El haz de prueba es llevado mediante una lente a un detector de cuadrante. La presencia de la onda de la burbuja y la correspondiente onda de choque modifican el índice de refracción del medio y por lo tanto deflectan el haz de prueba. La deflexión del haz de prueba es monitoreada por el fotodetector de cuadrante tanto en dirección horizontal como en dirección vertical con respecto al eje de propagación del pulso laser que induce la burbuja. La desventaja de este método es que para cuantificar el tamaño de la burbuja es necesario hacer múltiples mediciones desplazando el haz de prueba; la resolución espacial y

temporal está determinada por la instrumentación para desplazar el haz de prueba. Al igual que en el caso de imágenes resultas en el tiempo, el resultado final es un promedio de muchos eventos de CIL [41], [42].

7.4.5 Interferometría Mach-Zehnder

Como todo interferómetro, se basa en la interferencia de dos ondas y tiene la ventaja de ser muy sensible a muy pequeños cambios de índices de refracción, por lo que es una opción muy atractiva para detectar microburbujas inducidas por un cambio de presión local debido al paso de ondas inducidas bajo condiciones de confinamiento de esfuerzos termicos a temperaturas por debajo de los 100°C, descritas anteriormente [28],[43], [44]. Sin embargo, esta es una técnica muy complicada ya que requiere usar las técnicas anteriores para medir los cambios de fase además de ser altamente sensibles a vibraciones del medio ambiente.

7.4.6 Detección ultrasónica/acústica

Se basa en el uso de transductores acústicos de alta frecuencia para detectar ondas de presión (ondas de choque) que se generan durante CIL. Adicionalmente, las burbujas son monitoreadas mediante medidas de ecos con el mismo transductor. Después de que la burbuja se forma, las señales que se reciben tienen un pulso extra que describe su ubicación y provee una medida del tamaño de la burbuja. Esta técnica tiene como ventaja sobre todas las técnicas ópticas que puede usarse en medios no transparentes [45], [46], [35], [47].

7.5 Aplicaciones

Actualmente, la cavitación es un fenómeno bien conocido y el cual ha encontrado diversas aplicaciones en diferentes campos de la investigación, la industria y principalmente en la biomedicina [48], en donde la cavitación acústica ha sido más utilizada. A continuación presentamos algunas de las aplicaciones médicas donde la cavitación puede ser efectivamente utilizada.

7.5.1 Cirugía de córnea

Es quizá la aplicación más conocida de la cavitación láser. La córnea es un tejido transparente que sirve como una lente que forma las imágenes en la retina, donde se transfiere al nervio óptico y es llevada al cerebro en forma de señales eléctricas. En ocasiones la córnea está deformada y no lleva la imagen adecuadamente a la retina. El remedio es hacer una corrección morfológica a la córnea mediante cirugía que consiste evaporar el tejido en las regiones donde éste sobra para finalizar con una capa de tejido (la córnea) que forme la imagen correctamente en la retina. Para ello es necesario hacer un corte de alta precisión en la córnea para extraerla del ojo y fuera de éste practicarle la corrección morfológica, para luego reubicarla en su lugar. Este corte se hacía antiguamente con bisturí, pero ahora se hace induciendo burbujas de cavitación muy juntas una de otra con un láser pulsado (Q-switch). La corrección morfológica se logra haciendo ablación del tejido por el mismo mecanismo que forma las burbujas, pero localizando el foco del haz láser en la superficie del tejido [48].

7.5.2 Litotripsia

Es un procedimiento para destruir cálculos renales y/o biliares mediante ondas de choque, que mecánicamente son una diferencia de presiones alta y baja. Las ondas de choque se pueden producir a través de un pulso acústico enfocado en el cálculo, alrededor del que se pueden formar burbujas de cavitación, que a su vez también emiten ondas de choque en su colapso que contribuyan a la destrucción del cálculo; otra forma de producir las ondas de choque es induciendo un CIL directamente dentro de tejido que use las ondas de choque asociadas [48].

7.5.3 Medición de presión intraocular

Como el tamaño y el tiempo de colapso de una burbuja dependen, entre otros factores, de la diferencia de presiones entre el interior y exterior de la burbuja. Existen esfuerzos para desarrollar una técnica de medición de presión intraocular basado en CIL. Ésta consiste en inducir un evento de CIL dentro del humor acuoso del ojo y monitorear con mucha precisión el tiempo de colapso de la burbuja mediante una modificación de la técnica de transmitancia espacial modulada. Si se conoce la energía del pulso láser, las condiciones de enfoque del haz, las propiedades mecánicas del humor acuoso y el tiempo de colapso de la burbuja, entonces mediante la ecuación de Rayleigh-Plesset se puede calcular la presión del medio donde la burbuja fue producida. Es importante mencionar que los instrumentos de medición de presión ocular por contacto presentan grandes incertidumbres respecto de los valores reales, por lo tanto esta técnica basada en CIL tiene el potencial de ayudar a los oftalmólogos a mejorar la eficacia de sus diagnósticos.

7.5.4. Destrucción celular y tejidos

En ocasiones el daño celular a tejidos es un fin que se procura obtener. Uno de los mecanismos que se han propuesto es inducir CIL en células mediante el acoplamiento de micro y nano partículas funcionalizadas que sirvan como absorbedores de luz láser y formar CIL alrededor de estas partículas. La expansión y colapso y posiblemente ondas de presión asociadas son los responsables de la destrucción celular. Algunos ejemplos son los melanosomas en la retina o en células de melanoma pigmentado.

7.5.5. Propiedades mecánicas de fluidos, tejidos y células

Similarmente al caso de medición de presión intraocular, la CIL se ha empleado para medir las propiedades mecánicas de tejidos y células acoplando la ecuación de Rayleigh-Plesset a mediciones experimentales del tiempo de colapso y tamaño de burbujas inducidas bajo condiciones de enfoque conocidas [35].

7.5.6. Flujos inducidos por burbujas

La CIL se ha empleado como fuerza motriz para mover fluidos dentro de microcanales y construir así micro y nano bombas. Estos dispositivos tienen entrada en los llamados "Lab on a chip devices" con aplicaciones en biología donde es necesario manipular soluciones con flujos muy pequeños.

7.5.7 Entrega de medicamentos

La CIL también se ha empleado para depósito de medicamentos y sustancias al interior de tejidos y/o células. El mecanismo es la inducción de una burbuja que desplaza el fluido donde se encuentra el medicamento en la vecindad de las células. La interacción de fluido desplazado con la superficie genera esfuerzos cortantes que puede ocasionar que se abran poros en la membrana celular a través de los que se pueden introducir sustancias [49]–[54].

7.5.8 Formación de imágenes por ultrasonido

Como es bien sabido el ultrasonido es usado ampliamente para visualización médica a baja presiones acústicas (~1 MPa). El desarrollo y explotación de agentes de contraste ha abierto una gran oportunidad para diagnosticos y terapias novedosas. Estos agentes son microburbujas llenas de gas de ~ 3 □ m de diámetro inyectadas intravenosamente y excitadas resonantemente con ultrasonido causando que la señal reflejada sea miles de veces mayor que la del tejido normal proporcionando mejores imágenes. También abre la posibilidad de explotar fenómenos no lineales de ultrasonido como producción de armónicos, difusión rectificada, microcorrientes y fuerzas de Bjerknes [55]–[57].

7.5.9 Facoemulsificación

En la cirugia de cataratas la lente interna del ojo es emulsificada con ultrasonido y aspirada. Los fluidos aspirados son reemplazados con una solución salina para mantener la cámara anterior temporalmente y posteriormente reemplazado con una lente artificial. La técnica ahora es tan común que millones operaciones son llevadas a cabo cada año en EUA. La misma técnica se usa para remover placa dental [58], [59].

7.6 Investigación de la cavitación en México

En esta sección se presentan las líneas de investigación que existen en México en torno a la cavitación con énfasis en aplicaciones biofotónicas o biomédicas. Esto deja fuera grupos de trabajando en sonoluminiscencia, simulaciones numéricas de dinámica de burbujas de cavitación. La información se clasifica por institución, aunque existen colaboraciones entre instituciones que trabajan las mismas líneas.

7.6.1 UNAM

En la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) la cavitación se trabaja en las siguientes dependencias: Facultad de Ingeniería (FI), Instituto de Ingeniería (II), Instituto de Investigación en Materiales (IIM), Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico (CCADET), Instituto de Ciencias Nucleares (ICN), Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) e Instituto de Energías Renovables (IER).

En el campo de la CIL, las aportaciones más importantes se encuentran en la generación e interacción de burbujas dentro y entre células asi como en microcanales [60]. Por otro lado, existen estudios de generación de burbujas en la interacción fototérmica de un láser de onda continua dentro de una fibra recubierta de nanopartículas de carbono y metálicas, incluyendo una descripción experimental del campo de flujo alrededor de las burbujas que

se forman [61], [62]. Estos estudios abarcan investigación básica con aplicaciones en microfluídica y entrega de medicamentos, que son áreas de interés a nivel biológico y médico.

En la misma institución existen otros esfuerzos que incluyen estudios de cavitación, que no necesariamente son CIL, pero que sí contribuyen al entendimiento de los fenómenos físicos asociados. Por ejemplo existe la iniciativa de usar cavitación hidrodinámica luminiscente en el colapso de la burbuja debido a las altas temperaturas alcanzadas 15,000 K en el colapso generando presiones de GPa y un pulso de luz. La aplicación de estos estudios está en el diseño de un reactor cavitante para la limpieza y desinfección de agua. [63]. También existen investigaciones de flujo cavitante en geometría Venturi [63], así como muchos estudios de la interacción entre burbujas, burbujas en fluidos no newtonianos, pseudoturbulencia en flujos con burbujas, etc. [64].

En el laboratorio del Dr. Achim M. Loske (Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada en Querétaro) se está estudiando el uso de ondas presión generadas por cavitación inducida por espejos piezoeléctricos. En el foco del piezoeléctrico se coloca un vial con hongos filamentosos como Mycosphaerella fijiensis. La idea detrás de este proyecto es la inserción de DNA en hongos usados para la producción de antibióticos, proteínas y otros compuestos para la industria farmacéutica [65]. Con este método aceleran la transformación de hongos por órdenes de magnitud con una técnica sencilla y barata. Además, han empleado la misma técnica para hacer sonoporación en otros microorganismos. Si bien los mecanismos por lo que la transformación no se entienden del todo, continúan trabajando en el tema.

7.6.2 CICESE

En el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada se han realizado estudios básicos sobre la formación y colapso de burbujas inducidas en agua y geles de agar usando pulsos de nanosegundos. Derivado de estos estudios se ha desarrollado una técnica experimental para monitorear la dinámica de las burbujas a un costo mucho menor que las técnicas tradicionales que involucran video de alta velocidad. La aplicación que se le ha dado a esta técnica experimental, y en lo que se está trabajando actualmente, es el desarrollo de una metodología para medir la presión intraocular, que ayude a los oftalmólogos a mejorar sus diagnósticos [66]–[69].

7.6.3 INAOE

En el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica, se ha redescubierto la termocavitación en el año 2010 y desde entonces han realizado estudios básicos sobre la física de la formación y colapso de burbujas y le han encontrado aplicaciones prácticas en desarrollo. En el punto de colapso de la burbuja se genera la onda de choque, que al estar en contacto con el substrato la posibilidad de daño al mismo es alta. De hecho demostraron que materiales tan duros como titanio (películas delgadas de ~60 nm) e ITO (~100 nm) pueden ser removidos eficientemente, tal que grabado patrones complejos pueden ser grabado en dichas películas. Adicionalmente, usando el mismo efecto demostraron que se

puede romper el estratum corneum y hacer más eficiente la difusión de medicamentos a través de la piel [70]. Actualmente, han demostrado que la expansión de burbujas de cavitación creadas en configuraciones confinadas, tales como tubos capilares y dispositivos microfluídicos, desplazan el líquido contenido. Mediante un diseño adecuado del canal de salida del dispositivo han demostrado la generación de jets de fluido a alta velocidad que podrían servir como mecanismo de inyección transdérmica de fármacos libre de agujas [9], [11], [71], [72]. Otras posibles aplicaciones incluyen optical clearing y tatuajes. Inyecciones sin aguja reducirían los riesgos de salud y reduciría costos en el sector salud. Adicionalmente, se ha usado la termocavitación como método alternativo para generación de ultrasonido inducido por láseres pulsados en mediciones de fracturas de piezas solidas mediante interferometría dinámica [12].

7.6.4 UASLP

En la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí se encuentra en desarrollo de una microbomba basada en la geometría de una válvula Tesla, donde la fuerza motriz es proporcionada por la expansión y colapso de burbujas de termocavitación. Además se desarrollan experimentos básicos para determinar las propiedades mecánicas de polímeros viscoelásticos.

7.6.5. Dr. Leonardo Traversoni (Investigador independiente)

La cavitación hidrodinámica se origina en zonas de líquidos moviéndose a altas velocidades tal que la presión en esas zonas puede caer por debajo de la presión de vapor dando lugar a la formación de burbujas. El colapso violento y la emisión de la onda de choque pueden romper la pared celular de microorganismos ocasionando su muerte. Usando este concepto, el Dr. Traversoni, ha desarrollado un sistema semi-industrial para purificar agua. Este sistema podría tener impacto en zonas de alta marginación sin acceso a agua potable.

7.7 REFERNCIAS

- [1] M. Atlar, "A history of the emerson cavitation tunnel," *School of Marine Science and Technology University of Newcastle*.
- [2] Lord Rayleigh, "Pressure Develope in a liquid during the collapse of a Spherical Cavity," *Philos. Mag.*, vol. 34, pp. 94–98, 1917.
- [3] A. . Benjamin, T.B. and Ellis, "The collapse of cavitation bubbles and the pressure thereby produced against solid boundaries," *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, vol. 260, pp. 221–240, 1996.
- [4] W. Philipp, A. and Lauterborn, "Cavitation Erosion by Single Laser-produced bubbles," *J. Fluid Mech*, vol. 361, pp. 75–116, 1998.
- [5] F. Rastopov, "heat cycle due to," vol. 1, pp. 671–674, 1988.
- [6] S. F. Rastopov and A. T. Sukhodol, "Cluster nucleation in the process of CW laser induced thermocavitation," vol. 149, no. 4, pp. 229–232, 1990.
- [7] A. Takamizawa, S. Kajimoto, J. Hobley, K. Hatanaka, K. Ohta, H. Fukumura, A. I. Science, K. Centre, and A. Article, "Explosive boiling of water after pulsed IR laser heating," 2003.
- [8] J. P. Padilla-Martinez, G. Aguilar, J. C. Ramirez-San-Juan, and R. Ramos-García, "Temporal evolution of thermocavitation bubbles using high speed video camera,"

- vol. 8097, p. 809727, Sep. 2011.
- [9] J. P. Padilla-Martinez, D. Banks, J. C. Ramirez-San-Juan, G. Aguilar, and R. Ramos-Garcia, "Liquid jet generated by thermocavitation bubbles within a droplet," vol. 8611, p. 86111J, Mar. 2013.
- [10] J. P. Padilla-Martinez, C. Berrospe-Rodriguez, G. Aguilar, J. C. Ramirez-San-Juan, and R. Ramos-Garcia, "Optic cavitation with CW lasers: A review," *Phys. Fluids*, vol. 26, no. 12, p. 122007, Dec. 2014.
- [11] J. P. Padilla-Martinez, D. Banks, J. C. Ramirez-San-Juan, R. Ramos-Garcia, F. Sun, and G. Aguilar, "Towards the enhancement of transdermal drug delivery through thermocavitation," *Photonics Lasers Med.*, vol. 1, no. 3, pp. 183–193, Jan. 2012.
- [12] N. Korneev, P. R. Montero, R. Ramos-García, J. C. Ramirez-San-Juan, and J. P. Padilla-Martinez, "Ultrasound induced by CW laser cavitation bubbles," *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 278. p. 12029, 2011.
- [13] B. S. Gerstman and C. R. Thompson, "Laser Induced Bubble Formation in the Retina," vol. 21, pp. 10–21, 1996.
- [14] C. P. Lin and M. W. Kelly, "Cavitation and acoustic emission around laser-heated microparticles," vol. 72, no. 22, pp. 2800–2802, 1998.
- [15] C. P. Lin, M. W. Kelly, S. A. B. Sibayan, M. A. Latina, and R. R. Anderson, "Selective Cell Killing by Microparticle Absorption of Pulsed Laser Radiation," vol. 5, no. 4, pp. 963–968, 1999.
- [16] R. Brinkmann and G. Hu, "Origin of Retinal Pigment Epithelium Cell Damage by Pulsed Laser Irradiance in the Nanosecond to Microsecond Time Regimen," vol. 464, no. May, pp. 451–464, 2000.
- [17] C. M. Pitsillides, E. K. Joe, X. Wei, R. R. Anderson, and C. P. Lin, "Selective Cell Targeting with Light-Absorbing Microparticles and Nanoparticles," vol. 84, no. June, pp. 4023–4032, 2003.
- [18] J. Roegener and C. P. Lin, "Pump-probe detection of laser-induced microbubble formation in retinal pigment epithelium cells," vol. 9, no. 2, pp. 367–371, 2004.
- [19] G. Schuele, M. Rumohr, G. Huettmann, and R. Brinkmann, "RPE Damage Thresholds and Mechanisms for Laser Exposure in the Microsecond-to-Millisecond Time Regimen," vol. 46, no. 2, pp. 714–719, 2005.
- [20] J. Neumann, "Cell disintegration by laser-induced transient microbubbles and its simultaneous monitoring by interferometry," vol. 11, no. August, pp. 1–11, 2006.
- [21] D. O. Lapotko, E. Lukianova, and A. A. Oraevsky, "Selective Laser Nano-Thermolysis of Human Leukemia Cells With Microbubbles Generated Around Clusters of Gold Nanoparticles," vol. 642, no. April, pp. 631–642, 2006.
- [22] G. P. Askar'yan, A., Prokhorov, A.M., Chanturiya, G. F. and Shipulo, "The effects of a laser beam in a liquid," *Sov. Phys. JETP*, vol. 17, pp. 1463–1465, 1963.
- [23] C. E. Bell, "LASER-INDUCED HIGH-PRESSURE SHOCK WAVES IN WATER," Appl. Phys. Lett., vol. 10, no. 2, p. 46, 1967.
- [24] E. F. Carome, C. E. Moeller, and N. A. Clark, "Intense Ruby-Laser-Induced Acoustic Impulses in Liquids," *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 40, no. 6, p. 1462, 1966.
- [25] A. Vogel and V. Venugopalan, "Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues," 2003.
- [26] A. A. Oraevsky, S. L. Jacques, R. Esenaliev, and F. K. Tittel, "Pulsed Laser Ablation of Soft Tissues, Gels, and Aqueous Solutions at Temperatures Below 100 ° C," vol. 240, pp. 231–240, 1996.

- [27] A. A. Oraevskya, S. L. Jacques, H. Boulevard, and F. K. Tittel, "Mechanism of laser ablation for aqueous under confined-stress conditions media irradiated," vol. 78, no. July, pp. 1281–1290, 1995.
- [28] D. Kim, M. Ye, and C. P. Grigoropoulos, "Pulsed laser-induced ablation of absorbing liquids and acoustic-transient generation," vol. 181, pp. 169–181, 1998.
- [29] L. V Zhigilei and B. J. Garrison, "Microscopic mechanisms of laser ablation of organic solids in the thermal and stress confinement irradiation regimes," vol. 88, no. 3, 2000.
- [30] M. S. Plesset and A. Prosperetti, "Bubble Dynamics and Cavitation," *Annu. Rev. Fluid Mech.*, vol. 9, no. 1, pp. 145–185, Jan. 1977.
- [31] W. Lauterborn and C.-D. Ohl, "The Peculiar Dynamics of Cavitation Bubbles," *Appl. Sci. Res.*, vol. 58, no. 1/4, pp. 63–76, 1997.
- [32] W. Lauterborn and C.-D. Ohl, "Cavitation bubble dynamics," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 4, no. 2, pp. 65–75, Apr. 1997.
- [33] J. R. Blake, "Cavitation bubbles near boundaries," *Ann. Rev. Fluid Mech*, vol. 19, pp. 99–123, 1987.
- [34] Y. Tomita and A. Shima, "Mechanisms of impulsive pressure generation and damage pit formation by bubble collapse," *J. Fluid Mech.*, vol. 169, no. 1, p. 535, Aug. 1986.
- [35] A. Brujan, "P HYSICAL J OURNAL Dynamics of shock waves and cavitation bubbles in bilinear elastic-plastic media, and the implications to short-pulsed laser," vol. 123, pp. 115–123, 2005.
- [36] J. R. Blake, B. B. Taib, and G. Doherty, "Transient cavities near boundaries. Part 1. Rigid boundary," *J. Fluid Mech.*, vol. 170, no. 1, p. 479, Sep. 1986.
- [37] J. R. Blake, B. B. Taib, and G. Doherty, "Transient cavities near boundaries Part 2. Free surface," *J. Fluid Mech.*, vol. 181, no. 1, p. 197, Sep. 1987.
- [38] R. Evans and S. Camacho-l, "Pump-probe imaging of nanosecond laser-induced bubbles in agar gel," vol. 16, no. 10, pp. 23–28, 2008.
- [39] L. F. Devia-cruz, G. P. Francisco, and D. Garc, "HIGH RESOLUTION OPTICAL EXPERIMENTAL TECHNIQUE FOR COMPUTING PULSED LASER-INDUCED CAVITATION BUBBLE DYNAMICS IN A SINGLE SHOT," vol. 23, no. 6, pp. 505–515, 2013.
- [40] L. F. Devia-cruz, A. Hildebrand, A. M. Ovando, and E. R. Mora, "1 er Simposio en cavitación inducida y sus aplicaciones Nombre Correo electrónico," p. 2016, 2016.
- [41] P. Gregor, "Measurements of cavitation bubble dynamics based on a beam-deflection probe," pp. 901–905, 2008.
- [42] P. Gregorc, J. Moz, M. Jezers, and N. Lukac, "Synchronized delivery of Er: YAG-laser pulses into water studied by a laser beam transmission probe for enhanced endodontic treatment," 2016.
- [43] J. Hobley, Y. Kuge, S. Gorelik, and M. Kasuya, "Water expansion dynamics after pulsed IR laser heating," pp. 5256–5263, 2008.
- [44] G. P. Francisco, "Time-resolved study of the mechanical response of tissue phantoms to nanosecond laser pulses Time-resolved study of the mechanical response."
- [45] A. Vogel and W. Lauterborn, "Acoustic transient generation by laser-produced cavitation bubbles," vol. 84, no. August, pp. 719–731, 1988.
- [46] S. M. Milas, J. Y. Ye, S. Member, T. B. Norris, K. W. Hollman, S. Y. Emelianov,

- and M. O. Donnell, "Acoustic Characterization of Microbubble Dynamics in Laser-Induced Optical Breakdown," vol. 50, no. 5, pp. 517–522, 2003.
- [47] A. B. Karpiouk, S. R. Aglyamov, F. Bourgeois, and A. Ben-yakar, "Quantitative ultrasound method to detect and monitor laser-induced cavitation bubbles," vol. 13, no. June 2008, pp. 1–13, 2009.
- [48] C. E. Brennen, "Invited Lecture A Review of Cavitation Uses and Problems in Medicine," no. July, pp. 1–12, 2006.
- [49] H. Jang, S. Lee, N. G. Kang, and J. J. Yoh, "Laser-induced microjet injection into preablated skin for more effective transdermal drug delivery for more effective transdermal drug delivery."
- [50] J. Baxter and S. Mitragotri, "Needle-free liquid jet injections: mechanisms and applications," pp. 565–574, 2006.
- [51] M. Park, H. Jang, F. V Sirotkin, and J. J. Yoh, "Er: YAG laser pulse for small-dose splashback-free microjet transdermal drug delivery," vol. 37, no. 18, pp. 3894–3896, 2012.
- [52] A. Arora, I. Hakim, J. Baxter, R. Rathnasingham, R. Srinivasan, D. A. Fletcher, and S. Mitragotri, "Needle-free delivery of macromolecules across the skin by nanoliter-volume pulsed microjets," 2007.
- [53] B. Chavan, A. Doshi, Y. Malode, and B. Misal, "Review on Needle Free Drug Delivery Systems," vol. 2, no. 9, pp. 30–36, 2013.
- [54] V. Menezes, S. Kumar, K. Takayama, V. Menezes, S. Kumar, and K. Takayama, "Shock wave driven liquid microjets for drug delivery Shock wave driven liquid microjets for drug delivery," vol. 86102, no. 2009, pp. 2010–2013, 2011.
- [55] A. L. Klibanov, "Microbubble Contrast Agents: targeted ultrasound imaging and ultrasound-assisted drug-delivery applications," *Invest. Radiol.*, vol. 41, no. 3, pp. 354–362, Mar. 2006.
- [56] C.-K. Yeh and S.-T. Kang, "Ultrasound microbubble contrast agents for diagnostic and therapeutic applications: current status and future design," *Biomed. J.*, vol. 35, no. 2, p. 125, 2012.
- [57] L. Crum, M. Bailey, J. H. Hwang, V. Khokhlova, and O. Sapozhnikov, "Therapeutic ultrasound: Recent trends and future perspectives," *Phys. Procedia*, vol. 3, no. 1, pp. 25–34, Jan. 2010.
- [58] P. Jacobi, "Primary phacoemulsification and intraocular lens implantation for acute angle-closure glaucoma Historical image," *Ophthalmology*, vol. 109, no. 9, pp. 1597–1603, Sep. 2002.
- [59] O. A. Cruz, G. W. Wallace, C. A. Gay, A. Y. Matoba, and D. D. Koch, "Visual Results and Complications of Phacoemulsification with Intraocular Lens Implantation Performed by Ophthalmology Residents," *Ophthalmology*, vol. 99, no. 3, pp. 448–452, Mar. 1992.
- [60] P. A. Quinto-su, K. Y. Lim, and C. Ohl, "Cavitation bubble dynamics in microfluidic gaps of variable height," pp. 6–9, 2009.
- [61] R. Pimentel-Domínguez, P. Moreno-Álvarez, M. Hautefeuille, A. Chavarría, and J. Hernández-Cordero, "Photothermal lesions in soft tissue induced by optical fiber microheaters," *Biomed. Opt. Express*, vol. 7, no. 4, p. 1138, Apr. 2016.
- [62] R. Pimentel-Domínguez, J. Hernández-Cordero, and R. Zenit, "Microbubble generation using fiber optic tips coated with nanoparticles," *Opt. Express*, vol. 20, no. 8, p. 8732, Apr. 2012.

- [63] M. Navarrete, M. J. Francisco, H. Valle, J. L. Morales, and R. M. V. Muniz, "Journal of Applied Research and Technology," vol. 2, pp. 230–235, 2004.
- [64] R. Zenit and D. Legendre, "The coefficient of restitution for air bubbles colliding against solid walls in viscous liquids," *Phys. Fluids*, vol. 21, no. 8, p. 83306, 2009.
- [65] L. Escobar-Tovar, D. Magaña-Ortíz, F. Fernández, M. Guzmán-Quesada, J. A. Sandoval-Fernández, E. Ortíz-Vázquez, A. M. Loske, and M. A. Gómez-Lim, "Efficient transformation of Mycosphaerella fijiensis by underwater shock waves," *J. Microbiol. Methods*, vol. 119, pp. 98–105, Dec. 2015.
- [66] R. Evans, S. Camacho-López, F. G. Pérez-Gutiérrez, and G. Aguilar, "Pump-probe imaging of nanosecond laser-induced bubbles in agar gel," *Opt. Express*, vol. 16, no. 10, p. 7481, May 2008.
- [67] F. G. Pérez-Gutiérrez, S. Camacho-López, R. Evans, G. Guillén, B. S. Goldschmidt, J. A. Viator, and G. Aguilar, "Plasma Membrane Integrity and Survival of Melanoma Cells After Nanosecond Laser Pulses," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 38, no. 11, pp. 3521–3531, Nov. 2010.
- [68] R. Evans and S. Camacho-López, "Pump-probe imaging of nanosecond laser-induced bubbles in distilled water solutions: Observations of laser-produced-plasma," *J. Appl. Phys.*, vol. 108, no. 10, p. 103106, 2010.
- [69] L. F. Devia-Cruz, F. Perez-Gutierrez, D. Garcia-Casillas, G. Aguilar, S. Camacho-Lopez, and D. Banks, "HIGH RESOLUTION OPTICAL EXPERIMENTAL TECHNIQUE FOR COMPUTING PULSED LASER-INDUCED CAVITATION BUBBLE DYNAMICS IN A SINGLE SHOT," *At. Sprays*, vol. 23, no. 6, pp. 475–485, 2013.
- [70] J. P. Padilla-Martinez, D. Banks, J. C. Ramirez-San-Juan, R. Ramos-Garcia, F. Sun, and G. Aguilar, "Towards the enhancement of transdermal drug delivery through thermocavitation," *Photonics Lasers Med.*, vol. 1, no. 3, pp. 1–11, Jan. 2012.
- [71] C. Berrospe-Rodriguez, C. W. Visser, S. Schlautmann, R. Ramos-Garcia, and D. F. Rivas, "Continuous-wave laser generated jets for needle free applications," *Biomicrofluidics*, vol. 10, no. 1, 2016.
- [72] J. P. Padilla-Martinez, "BREAKING THE RAYLEIGH-PLATEAU INSTABILITY LIMIT USING THERMOCAVITATION WITHIN A DROPLET," vol. 23, no. 6, pp. 517–533, 2013.

8. Procesado de Imágenes

Dr. Josué Álvarez Borrego, CICESE
Coordinador
Dr. Alberto Jaramillo Nuñez, INAOE.
Dra. Hayde Peregrina-Barreto, INAOE
Dra. Bárbara Sánchez Rinza, BUAP.
Dra. Selene Solorza Calderón, UABC campus Ensenada.
Dra. Cristina Chávez Sánchez, CIAD, Unidad Mazatlán.
Dra. Isabel Israde Alcántara, UMSNH.
Dr. José Luis Pech Pacheco, Empresa SolexVintel.
Dr. Alfredo Solís Ventura, Empresa SolexVintel.

8.1 Introducción

El cáncer de piel es una de las enfermedades que afecta a los humanos. Es causado por el desarrollo de células cancerosas en cualquiera de las capas de la piel, ocurre cuando las células en cualquier parte del cuerpo comienzan a crecer fuera de control y se expanden a otros tejidos y órganos. Estados Unidos es uno de los países que ha tenido gran incidencia de esta enfermedad y representa un importante problema de salud. Hay tres principales tipos de cáncer de piel, los cuales son el carcinoma basocelular, el carcinoma epidermoide y el melanoma [1, 2]. El carcinoma basocelular es el más común de los tres, sin embargo es el menos peligroso si se detecta a tiempo. Este cáncer aparece en las células que se encuentran en la capa más profunda de la piel, generalmente en partes del cuerpo que son expuestas al sol, como la cara, cabeza, cuello, orejas, hombros y espalda, sin embargo se localizan con mayor frecuencia en la cara y raramente puede causar metástasis [3-6]. El carcinoma epidermoide es el segundo tipo de cáncer de piel más común, el cual aparece en las células que componen las capas superiores de la piel, es más probable que se propague a zonas bajo la piel. Se encuentra generalmente en las partes del cuerpo que están expuestas a la luz ultravioleta, por lo que puede aparecer en las piernas o los pies, puede ser localmente invasivo, puede ser capaz de alcanzar grandes tamaños si no es detectado a tiempo. Puede causar metástasis [6], clásicamente se presenta como un nódulo, una pápula o tumor [5]. El melanoma es el menos común, pero es el más peligroso, puede causar la muerte si no se detecta a tiempo. Puede aparecer en cualquier parte de la piel, pero es mas probable que se desarrolle en ciertos lugares. Al igual que el carcinoma basocelular y epidermoide, el melanoma es casi siempre curable si es detectado en etapas tempranas [6, 7].

El cáncer de piel es muy común en Europa, Australia y Estados Unidos [6], casi siempre es curable si es reconocido y tratado tempranamente. Los mayores factores de riesgos están relacionados con el color de la piel, exposición al sol, el clima, edad avanzada, genética e historia familiar. La mejor forma para detectar el melanoma es reconocer una nueva mancha en la piel, o una mancha que esta cambiando de tamaño, forma y color. La detección temprana de cáncer de piel puede evitar la muerte [8].

Actualmente esta enfermedad representa un serio problema de salud, la búsqueda de un diagnostico clínico preciso ha sido una preocupación constante por parte de los dermatólogos. Hoy en día en el área de procesamiento de imágenes algunas metodologías han sido desarrolladas usando algoritmos o sistemas para la detección y clasificación por medio de técnicas y métodos computaciones, las cuales han sido aplicadas en la solución de problemas médicos. Estas metodologías pueden ser una herramienta efectiva, especialmente cuando no hay un especialista, por otra parte es también una herramienta no invasiva para el paciente [7-9]. En las últimas décadas el procesamiento de imágenes ha sido aplicado en diferentes áreas, permitiendo mejorar la información en una imagen para su interpretación, representación, descripción y procesamiento.

En los últimos años se han desarrollado varios estudios y trabajos relacionados con lesiones de piel pigmentadas para el diagnostico y clasificación de lesiones de piel, tales como el cáncer de piel por medio del análisis digital de imágenes, su principal objetivo ha sido proporcionar un diagnostico preciso. La mayoría de estudios están relacionados con el melanoma maligno.

Gola et al. [10] desarrollaron una herramienta dermatológica automatizada para identificar melanoma. Sus algoritmos se basan en identificar tres categorías: pigmentación reticular, globular y azul homogénea. Un aspecto importarte en este trabajo es extraer la forma de la lesión de la piel, de esta manera ellos obtienen las características de interés. Cada algoritmo no puede hacer una decisión final, por lo que ellos desarrollaron un sistema para correlacionar todos los algoritmos con el fin de obtener un diagnóstico correcto. Rahman y Bhattacharya [9] propusieron un método similar para reconocer el melanoma. Ellos presentaron un sistema de decisión usando diferentes clasificadores tales como máquinas de soporte vectorial (SVMs), vecino cercano (K-NNs) y la probabilidad del máximo gaussiano (G-ML). La morfología de la lesión se detecta aplicando el método de segmentación basado en umbral, luego se obtiene la mascara de la lesión que contiene el área de la lesión en escala de grises. Características de color son extraídas de la mascara de la lesión para entrenar los respectivos clasificadores, después de hace una comparación de cada clasificador, donde el porcentaje mas alto de precisión obtenido con uno de los calificadores fue de 72.45. En este método fueron clasificados el melanoma, lesiones benignas y nevus displácicos. Cavalcanti and Scharcanski [11] propusieron un método para clasificar lesiones de piel pigmentadas como benignas o malignas usando dos clasificadores: vecino cercano y vecino cercano por medio de un árbol de decisión. Primero se aplica un pre-procesamiento a la imagen, donde se atenúan los efectos de sombreado, para esto la imagen a color RGB es convertida al espacio de color HSV. Luego se desarrolla un método de segmentación considerando la textura y los patrones de color de la imagen, en este paso algunas operaciones son aplicadas para eliminar imperfecciones causadas por ruido. Las características son extraídas de la imagen segmentada de acuerdo a la regla ABCD (asimetría, borde, color y diámetro). Ambos clasificadores fueron entrenados con estas características. El resultado mostró una precisión de 94,54% para predecir una lesión como benignos o malignos. La metodología propuesta por Jaleel et al. [12] se basa en técnicas de procesamiento de imágenes usando Redes Neuronales Artificiales. Su principal objetivo fue clasificar el melanoma de otras enfermedades de la piel. La imagen fue pre-procesada con el fin de eliminar el ruido presente en ella. Luego se suaviza por medio del filtro de la mediana. Después la imagen es segmentada y binarizada usando la segmentación umbral. La transformada 2D wavelet se aplica sobre la imagen segmentada para extraer las características tales como la media, la desviación estándar, media absoluta, norma L1 y la norma L2. La red fue entrenada con estas características. Por tanto, su tasa de precisión fue buena, sin embargo puede mejorar para este sistema. Dada una imagen dermatoscópico Sadegui et al. [13] clasificaron la ausencia o presencia de una red pigmentada. En primer lugar la imagen fue pre-procesada aplicando un filtro paso alto para eliminar el ruido de baja frecuencia. Este paso se realizó en diferentes transformaciones de color (NTSC, L * a * b *, rojo, verde y azul). Un filtro Laplaciano gaussiano se aplicó con el fin de encontrar mallas o estructuras cíclicas, que representan la presencia de una región de red pigmentada. El conjunto de sub-gráficos obtenidos se convierte en un gráfico usando un análisis de ocho componentes conectados, después las estructuras o ruido no deseados se eliminan. Teniendo en cuenta la distancia entre los nodos que corresponden a un agujero encontrado en cada sub-grafo se crea un gráfico de alto nivel. Por medio de este gráfico se obtiene la relación de densidad, que compara el número de aristas en el gráfico, con sus vértices y toda la zona de la lesión. La densidad se utiliza para detectar una red pigmentada. Se informó de un porcentaje de clasificación de 94,3%. Barata et al. [14] propuso un sistema para detectar una red pigmentada. Este método utiliza

filtros direccionales. La imagen se convierte en escala de grises para eliminar el vello y reflejos causados por el gel dermatoscópico. La propiedad de intensidad se toma para realzar la red pigmentada aplicando filtros direccionales y la geometría o la organización espacial se utiliza para generar la mascara de red binaria. Por lo tanto la organización espacial se lleva a cabo con la conexión de todos los píxeles. A continuación, una etiqueta se asigna a cada imagen binaria es decir, con o sin red pigmentada. Las características se extraen y se utilizan para entrenar un clasificador utilizando el algoritmo de boosting. El algoritmo fue probado en un conjunto de datos de 200 imágenes dermatoscópicas (88 con red pigmentada y 112 sin ella). Se reportaron resultados 82,1% para la clasificación. Betta et al. [15] se describieron un método para detectar una red pigmentada. Esta metodología se basa en la combinación de técnicas estructurales y espectrales. La técnica estructural se aplica para identificar la textura definida por las discontinuidades locales, tales como líneas y / o puntos. Esto se obtiene mediante la comparación de la imagen monocromática con la imagen que se le aplica el filtro de la mediana. La técnica espectral se basa en el análisis de Fourier de la imagen para obtener el periodo espacial de la textura, de esta manera se crea una máscara "de regiones con red". Por lo tanto, esta máscara se une con la máscara segmentada, obtener una "imagen de la red", donde el área de la lesión y de la red de pigmentada son realzadas. Finalmente para cuantificar la naturaleza de la red se han obtenido dos índices relacionados con la variabilidad espacial y cromática. Para evaluar el desempeño de este método se evaluaron 30 imágenes.

La mayoría de los estudios publicados en la literatura, tales como [16-18] incluyen etapas similares como en las mencionadas anteriormente. Estos métodos consisten generalmente de cuatro etapas que son: (i) adquisición del conjunto de imágenes, (ii) segmentación (que incluyen varios métodos, por ejemplo las técnicas basadas en los bordes, umbral, segmentación del histograma, crecimiento de regiones, etc.), (iii) extracción de características, (iv) la clasificación o detección de una lesión para el diagnóstico.

Es importante evaluar rápidamente y eficientemente a pacientes manchas en la piel, a través de una técnica no invasiva y fácil de implementar. La importancia de obtener un método de diagnóstico preciso ha llevado a desarrollar técnicas basadas en el procesamiento de imágenes.

Por otro lado, la población de plantas microscópicas marinas que se encuentran flotando en el océano, conocidas como fitoplancton, presenta una gran distribución global y estas poblaciones contribuyen en el 25% del total de la vegetación del planeta [19]. La importancia primordial del fitoplancton radica en que son los productores primarios de la cadena trófica alimenticia del océano, su biomasa determina directamente la productividad del agua, por lo tanto el fitoplancton marino representa una de las más importantes fuentes de alimentación para todos los organismos filtradores (almejas, ostiones, ballenas, etc.) y para un gran número de larvas, crustáceos y peces de importancia comercial. En aguas someras se considera como uno de los principales alimentadores de la comunidad bentónica [20]. Una ventaja de trabajar el fitoplancton, es su rápida respuesta a los cambios en el ambiente, debido a que multiplican sus poblaciones en cuestión de horas pues tienen tasas de división celular hasta de 1.0 día-1 [21-23] de tal forma que cualquiera alteración se ve reflejada en la comunidad del fitoplancton [24]. Debido a que las células presentan adaptaciones según las condiciones de su ambiente [25-28]; y es interesante relacionar el

contenido total de biomasa con la abundancia y estructuras taxonómicas, así como con la variabilidad espacio-temporal de la población para poder interpretar de mejor forma las fluctuaciones de la comunidad [29]. La principal diferencia de la producción primaria en los océanos y en la tierra es que en el mar, frecuentemente todo el fitoplancton es consumido por el zooplancton, mientras que en la tierra los vegetales solo son consumidos en un 10 % por los herbívoros. Además los tiempos de generación en los vegetales terrestres son grandes comparados con los tiempos de crecimiento del fitoplancton en el mar (se regeneran cada día). Las especies fitoplanctónicas y sus características biológicas han sido estudiados desde diferentes puntos de vista: su índice de refracción [30]; su crecimiento en sistemas de cultivo [31]; análisis de sus pigmentos [32]; relación de crecimiento con respecto a la luz y temperatura [33]; prueba de ecotoxicología [34]; ecofisiología del fitoplancton costero [35] (Orellana et al., 1993). De estos trabajos se demuestra que las características del medio pueden verse reflejadas en la composición específica del fitoplancton.

Dentro del grupo de Procesado de Imágenes y Reconocimiento de Patrones del CICESE, nos hemos dado a la tarea de desarrollar varios algoritmos matemáticos para la identificación de microorganismos como fitoplancton, zooplancton, bacterias, cuerpos de inclusión de virus en tejido de camarón así como algunos trabajos en citogenética.

Otro tema de gran importancia en México es el estudio de la diabetes mellitus (DM) y sus complicaciones. El pie diabético es una de las principales complicaciones y puede tener como consecuencia la amputación de miembros inferiores. Datos de la Organización mundial de la salud (OMS) reportan que el 80% de las amputaciones en personas con diabetes fueron debidas a complicaciones que iniciaron con una úlcera. Esto no solo limita la calidad de vida de una persona sino además implica un costo de atención elevado. Por ejemplo, se reportó que el costo del tratamiento de la diabetes y sus complicaciones durante el año 2007 en USA fue de 116 millones y el 33% de esto se destinó para el tratamiento de úlceras en el pie diabético [36]. En México, según datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012, el gasto relacionado a la DM fue de 14 mil milles de pesos en el IMSS y en la SS fue de 7734 millones de pesos correspondiendo el 75% a gastos de atención en complicaciones tardías [37]. La atención y el seguimiento preventivos son la mejor forma de evitar este tipo de consecuencias físicas y económicas. En el caso del pie diabético la prevención consiste en una revisión constante de los pies para detectar cualquier indicación que apunte a un posible riesgo de ulceración, por ejemplo, temperatura. Sin embargo, la ENSANUT 2012 también reportó que existe un bajo porcentaje (<15% en promedio) de diabéticos a los cuales se les realiza una revisión de pies. Debido a esto existe la necesidad de mejorar y facilitar métodos que ayuden a la detección y monitoreo de los riesgos de ulceración en el pie diabético.

Estudios previos han reportado que la neuropatía periférica y los riesgos de ulceración, ambos asociados a la DM, se relacionan con incrementos de temperatura en la región plantar [38]. Así mismo, diversos estudios encontraron que en grupos que continuamente monitorean la temperatura plantar hay bajos porcentajes de ulceración [39-41]. Dichos estudios hacen uso de termometría y termografía infrarroja para el estudio de las temperaturas plantares, siendo la termografía la que aporta mayor cantidad de información. El uso de la termografía consiste en obtener una imagen térmica (termograma) de la región

plantar para poder analizar la temperatura presente. Una vez obtenidos los termogramas de un grupo de control y otro de personas con diabetes, es posible estudiar las diferencias no solo de manera visual sino aplicando análisis estadístico para obtener la mayor cantidad de información que permita caracterizar ambos grupos. En este sentido, en el INAOE se ha hecho un esfuerzo por contribuir al estudio del pie diabético generando una base de datos de termogramas plantares de pacientes de control y con DM para su estudio, concretamente para la detección de los riesgos de ulceración, utilizando diversas técnicas computacionales. El análisis de dichos termogramas implica varios retos a resolver: (i) extraer y uniformar solo la región plantar, (ii) calcular descriptores e índices asociados a las temperaturas, (iii) identificar patrones asociados a ambos grupos e (iv) identificar las etapas de evolución del cambio térmico. Para lo anterior se ha hecho uso de técnicas procesamiento de imágenes digitales, estadística y aprendizaje automático.

Derivado de lo anterior se han propuesto varias metodologías para cuantificar el cambio térmico en la región plantar [42] así como para encontrar patrones característicos que describan la distribución térmica tanto en el grupo de control como en el grupo de DM [43].

El cáncer de próstata es la neoplasia maligna con mayor incidencia en hombres mayores de 65 años. En México, tan solo en el 2014, se detectaron 14200 nuevos casos y esta enfermedad ocupa el segundo lugar de causa de muerte en hombres. Un alto porcentaje de ellos desarrollaran una metástasis ósea durante el transcurso de la enfermedad. En el caso de las mujeres, en México se diagnostican 11 mil nuevos casos de cáncer de mama al año y de ellos un alto porcentaje desarrollarán también metástasis óseas. Además, en promedio, cada día mueren 12 mujeres lo cual lo convierte también en un problema de salud pública.

En el cáncer, las metástasis óseas son una complicación común y severa de la enfermedad avanzada. Las metástasis óseas pueden ser de tipo osteolíticas, osteoblásticas o una combinación de ambas [44,45]. En las metástasis de tipo osteolíticas la enfermedad disuelve algunos minerales que contiene la masa ósea disminuyendo su densidad. En las radiografías éstas se observan como zonas más oscuras que el hueso circundante. En las metástasis de tipo osteoblásticas, se forma hueso y en una radiografía se ven como zonas más blancas que el hueso circundante [45,46].

Es común hallar, en literatura relacionada con la interpretación de imágenes radiológicas, el comentario de que en radiografías planas no es posible detectar la metástasis ósea temprana [46,47]. Algunos autores mencionan que antes es necesario que el hueso tenga una degradación ósea del 30 al 50% [48,49] para que pueda observarse la lesión metastásica en una radiografía; lo que hace imposible la detección temprana y es necesario recurrir a otros tipos de pruebas diagnósticas tales como la gammagrafía ósea o la resonancia magnética, por ejemplo.

La gammagrafía ósea es la modalidad de imagen en medicina nuclear más común para evaluar la dispersión metastásica del cáncer a hueso. La medicina nuclear constituye una subespecialidad del campo de las imágenes médicas que utiliza cantidades muy pequeñas de material radioactivo para diagnosticar y determinar la gravedad de enfermedades, incluyendo varios tipos de cáncer, enfermedades cardíacas, gastrointestinales y otras anomalías dentro del cuerpo.

Los estudios de medicina nuclear se realizan administrando un radiofármaco (marcadores o trazadores) al paciente y posteriormente registrando su distribución en el cuerpo a lo largo de un determinado período de tiempo. Los radiofármacos son compuestos radiactivos que típicamente no desencadenan una respuesta fisiológica cuando se administran con intención diagnóstica o terapéutica.

La captación selectiva de estos compuestos por distintos órganos constituye la base de la imagen nuclear. Además, normalmente el radiofármaco debe estar implicado en el metabolismo fisiológico del órgano para obtener una imagen satisfactoria. Estos radiofármacos típicamente tienen dos componentes:

- 1. **El componente principal**: Es el compuesto que se distribuye en determinados órganos debido a distintos mecanismos fisiológicos.
- 2. **El radionúclido o radiofármaco pegado a dicho compuesto**: Este emite rayos gamma, permitiendo la detección del mismo en el cuerpo.

Cuando se interpretan gammagramas óseos a veces es difícil dar un diagnóstico acertado principalmente cuando se trata de diferenciar si la acumulación de marcador se debe a enfermedades degenerativas, inflamación, una infección o una metástasis ósea en etapa temprana. Usando algunas rutinas sencillas del procesado digital de imágenes se mejora sustancialmente la visualización de los gamagramas óseos, de tal manera que es posible distinguir las diferentes enfermedades que ocasionan la acumulación de marcador.

El problema principal que se tiene con el gamagrama óseo para determinar el diagnóstico es que generalmente los tonos de gris de la imagen son bajos, lo que origina que el contraste sea inadecuado para su análisis visual. Esto se debe principalmente a que los tonos de gris más altos corresponden al lugar donde se inyecto el marcador y/o la zona de la vejiga, llegando incluso a tener el valor 1000 o más. Este inconveniente y la actividad osteoblástica que se puede también dar debido no precisamente a una metástasis, hacen que en ocasiones sea difícil diferenciar cuándo se trata de una metástasis y cuándo se trata de alguna otra anormalidad ósea.

Hemos introducido algunas técnicas [50,51] que mejoran la visualización del gammagrama con la finalidad de mejorar el diagnóstico y consisten principalmente en analizar los valores de los tonos de gris del gammagrama óseo. Para hallar otro tipo de anomalías óseas diferentes a la metástasis se recurre al graficado por zonas de dichos valores, de tal manera que es posible observarlas. La técnica está basada en la suposición de que en un sistema óseo sano no hay absorción del radiotrazador y por consiguiente todo el sistema óseo debería de tener el mismo valor de tono de gris (tono de gris ideal), ya que lo que capta la cámara gamma es la presencia del radiotrazador en los huesos y al no haberlo, entonces todo el sistema óseo debería mostrar la misma intensidad. Cualquier diferencia, por muy pequeña que sea, respecto al tono de gris ideal, será un indicativo de que algo anda mal.

8.2. Referencias

1. M. J. Eide, M. M. Asgari, S. W. Fletcher, A. C. Geller, A. C. Halpern, W. R. Shaikh, L. Li, G. L. Alexander, A. Altschuler, S. W. Dusza, A. A. Marghoob, E. A. Quigley, and M. A. Weinstock; Informed (Internet course for Melanoma Early

- Detection) Group, "Effects on skills and practice from a web-based skin cancer course for primary care providers," J. Am. Board Fam. Med. 26(6), 648–657 (2013).
- 2. American Cancer Society. Cancer Facts and Figs. (2014).
- 3. N. R. Telfer, G. B. Colver, and C. A. Morton; British Association of Dermatologists, "Guidelines for the management of basal cell carcinoma," Br. J. Dermatol. 159(1), 35–48 (2008).
- 4. A. Kricker, B. Armstrong, V. Hansen, A. Watson, G. Singh-Khaira, C. Lecathelinais, C. Goumas, and A. Girgis, "Basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma growth rates and determinants of size in community patients," J. Am. Acad. Dermatol. 70(3), 456–464 (2014).
- 5. E. A. Gordon Spratt and J. A. Carucci, "Skin cancer in immunosuppressed patients," Facial Plast. Surg. 29(5), 402–410 (2013).
- 6. S. Ogden and N. R. Telfer, "Skin cancer," Medicine (Baltimore) 37(6), 305–308 (2009).
- 7. K. Korotkov and R. Garcia, "Computerized analysis of pigmented skin lesions: a review," Artif. Intell. Med. 56(2), 69–90 (2012).
- 8. A. O. Berg, D. Best; US Preventive Services Task Force, "Screening for Skin Cancer: recommendations and rationale," Am. J. Prev. Med. 20(3 Suppl), 44–46 (2001).
- 9. M. M. Rahman and P. Bhattacharya, "An integrated and interactive decision support system for automated melanoma recognition of dermoscopic images," Comput. Med. Imaging Graph. 34(6), 479–486 (2010).
- 10. A. G. Isasi, B. G. Zapirain, and A. M. Zorrilla, "Melanomas non-invasive diagnosis application based on the ABCD rule and pattern recognition image processing algorithms," Comput. Biol. Med. 41(9), 742–755 (2011).
- 11. P. G. Cavalcanti and J. Scharcanski, "Automated prescreening of pigmented skin lesions using standard cameras," Comput. Med. Imaging Graph. 35(6), 481–491 (2011).
- 12. J. A. Jaleel, S. Salim, and R. B. Aswin, "Artificial neural network based detection of skin cancer," IJAREEIE 1, 200–205 (2012).
- 13. M. Sadeghi, M. Razmara, T. K. Lee, and M. S. Atkins, "A novel method for detection of pigment network in dermoscopic images using graphs," Comput. Med. Imaging Graph. 35(2), 137–143 (2011).
- 14. C. Barata, J. S. Marques, and J. Rozeira, "A system for the detection of pigment network in dermoscopy images using directional filters," IEEE Trans. Biomed. Eng. 59(10), 2744–2754 (2012).
- 15. G. Betta, G. Di Leo, G. Fabbrocini, A. Paolillo, and P. Sommella, "Dermoscopic image-analysis system: Estimation of atypical pigment network and atypical vascular pattern," presented at the International Workshop on Medical Measurement and Applications, Benevento, Italy, 20–21 April 2006.
- M.E.Celebi, H.A.Kingravi, B.Uddin, H.Iyatomi, Y.A.Aslandogan, W.V.Stoecker, and R. H.Moss, "A methodological approach to the classification of dermoscopy images," Comput. Med. Imaging Graph. 31(6), 362–373 (2007).
- 17. N.SmaouiandS.Bessassi, "Adevelopedsystemformelanomadiagnosis," Int.J.Comput. Vis.3(1),10–17 (2013).

- 18. J. Premaladha and K. S. Ravichandran, "Asymmetry analysis of malignant melanoma using image processing: a survey," Science Alert 7(2), 45–53 (2014).
- 19. Jeffrey, S.W. y G. M. Hallegraeff. Phytoplankton ecology of Australian waters. In: Clayton, M. N. y R. J. King. (eds). Biology of Marine Plants, Longman cheshire, Melbourne 310-348 pp. (1990).
- 20. Zeitzschel, B. Why study phytoplankton? En: Sournia A. (ed) Phytoplankton manual. UNESCO. París. 1 5 pp. (1978).
- 21. Roberts, B. S. Oceurrence of Gymnodinium breven red tides along the west coasta of Floridaduring 1976 and 1977. En: L. D. Taylor y H. H. Seliger (eds.). Toxic dinoflagellate blooms. Elsevier/North Holland. EEUU. 199-202 pp. (1979).
- 22. Eppley, R. W. Plankton dynamics of the southern California Bight. Lectures notes in costal estuarin studies. Springer-Verlag. N. Y. 373 pp. (1986).
- 23. Tomas, C. R., G. Daniel y G. D. Baden. The influence of phosphorus source on the growth and cellular toxic content of the bentic Dinoflagellate Prorocentrum lima. En: T. J. Smayda y Y. Shimizu (eds.). Toxic phytoplankton bloons in the sea. Elsevier. Netherlands. 565-570. (1993).
- 24. Smayda, T. J. y Y. Shimizu. Toxic phytoplankton blooms in the sea. Elsevier. Netherlands. 952 pp. (1993).
- 25. Steeman-Nielsen, E. Uber quantitative Untersuchung von marinem Plankton mit Utermohl umgekehrten Mikroskop. J. Const. CIEM. 8(2):201-210 pp. (1933).
- 26. Morris, I. The physiological ecology of phytoplankton. University de California Press. L. A. EEUU. 625 pp. (1980).
- 27. Bidigare, R. R. y M. E. Ondrusek. In vivo absorption properties of algal pigments. Ocean Optics X. SPIE. 1302:290-302. (1990)
- 28. Sathyendranath, S., A. D. Gouveia, S. R. Shetye, P. Ravindram y P. Platt. Biological control of surface temperature in the Arabian Sea. Nature, 349:54-56. (1991).
- 29. Harris, G. P. Phytoplankton Ecology. Chapman and Hall. N. Y. 384 pp. (1986).
- 30. Carder, K.l. Tomlinson, R.D. y G. F. Jr. Berdsley. A technique for the estimation of indices of refraction of marine phytoplankters. Limnol. Oceanogr. 17: 833 839. (1972).
- 31. Pough, P.R. The application of particle counting to an understanding of the small scale distribution of plankton communities. Plenum Press. N. Y. 111 129 p. (1976).
- 32. Morris, I. The physiological ecology of phytoplankton. University de California Press. L. A. EEUU. 625 pp. (1980).
- 33. Hitchcock, G. L. Influence of temperature on the growth rate of Scheletonema costatum in response tovariations in dayly light intensity. Mar. Biol. 57: 261-269. (1980).
- 34. Jensen, A. Marine ecotoxicological test with phytoplankton. En. Persoone, G., Jaspers, E. y C. Claus. (eds.). Ecotoxicological Testing for the Marine Environment. State & University of Ghenrt and Institute for Marine Scientific Research. Bredene. Belgium, 1:195–214. (1984).
- 35. Orellana, E. Sistemática (dinoflagellatae) y distribucción del fitoplancton marino en un área del Pacífico Sud-Oriental. (Operación Oceanográfica "MARCHILE VII". Marzo-1968). Tesis de Licenciatura. Universidad Catolica de Valparaiso. Valparaiso, Chile. 92 pp. (1971).

- 36. Driver, V. R., Fabbi, M., Lavery, L. A., & Gibbons, G. (2010). The costs of diabetic foot: the economic case for the limb salvage team. *Journal of vascular surgery*, 52(3), 17S-22S.
- 37. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012, http://ensanut.insp.mx
- 38. Ring, F. (2010). Thermal imaging today and its relevance to diabetes. *Journal of diabetes science and technology*, 4(4), 857-862.
- 39. Armstrong, D. G., Holtz-Neiderer, K., Wendel, C., Mohler, M. J., Kimbriel, H. R., & Lavery, L. A. (2007). Skin temperature monitoring reduces the risk for diabetic foot ulceration in high-risk patients. *The American journal of medicine*, *120*(12), 1042-1046.
- 40. Lavery, L. A., Higgins, K. R., Lanctot, D. R., Constantinides, G. P., Zamorano, R. G., Athanasiou, K. A., ... & Agrawal, C. M. (2007). Preventing Diabetic Foot Ulcer Recurrence in High-Risk Patients Use of temperature monitoring as a self-assessment tool. *Diabetes care*, 30(1), 14-20.
- 41. Lavery, L. A., Higgins, K. R., Lanctot, D. R., Constantinides, G. P., Zamorano, R. G., Armstrong, D. G., ... & Agrawal, C. M. (2004). Home monitoring of foot skin temperatures to prevent ulceration. *Diabetes care*, 27(11), 2642-2647.
- 42. Peregrina-Barreto, H., Morales-Hernandez, L. A., Rangel-Magdaleno, J. J., Avina-Cervantes, J. G., Ramirez-Cortes, J. M., & Morales-Caporal, R. (2014). Quantitative estimation of temperature variations in plantar angiosomes: a study case for diabetic foot. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2014.
- 43. Hernandez-Contreras, D., Peregrina-Barreto, H., Rangel-Magdaleno, J., Ramirez-Cortes, J., & Renero-Carrillo, F. (2015). Automatic classification of thermal patterns in diabetic foot based on morphological pattern spectrum. *Infrared Physics & Technology*, 73, 149-157.
- 44. Singh A. and Rabani SA, Bone metastasis: Experimental and clinical Therapeutics, First ed. New Jersey: Humana Press, 2004.
- 45. Baert AL, Encyclopedia de diagnostic imaging, First ed. Berlin, Springer-Verlag, 2008.
- 46. Lerat JP, Cáncer óseo secundario [Conference], Centre Hospitalier Lyon Sud, Disponible en http://www.lerat-orthopedie.com/ES/cours/dipositivas/8.Power%20P.tumores/11-20Cancer%20Oseo%20Secundario.ppt
- 47. Jacox A, Carr DB, Payne R., et al., Management of cancer pain, Texas (Tex); Agency for Health Care Policy and Research, 1994 March, Report No. 94-0592.
- 48. Ahuja AT, Antonio GE, Wang KT and Yuen HY, Case studies in medical imaging: radiology for students and trainees, First ed. Cambridge: Cambridge University Press., 2006.
- 49. Garbayo AJ. Villafranca E, De Blas A, Tejero A, Eslava E, Manterola A, Romero P, Martínez M, Metastatic bone disease: Diagnosis and treatment, Anales 2004. Disponible en: http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol27/sup3/suple14a.html.
- 50. Jaramillo-Núñez A, Gómez-Conde JC. Método para incrementar la sensibilidad diagnóstica del gammagrama óseo. Anales de Radiología México 2015; 14:11-19.
- 51. Zapote-Hernández B, Cruz-Santiago JC, González-Vargas E, Jaramillo-Núñez A., Concordancia diagnóstica entre los métodos visual e informático en la detección de metástasis por gammagrafía ósea en cáncer de próstata. Anales de Radiología México 2016; 15(2):111-119.

9. Optica visual

Marcelo David iturbe Castillo Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica

> Gabriel Ramos Ortiz Centro de Investigaciones en Óptica, A. C.

9.1 Introducción

El estudio del ojo humano tiene una gran fascinación, ya que es uno de los órganos más versatiles desde un punto de vista funcional, pero al mismo tiempo uno de los más complicados del cuerpo humano. Los profesionales dedicados al estudio del ojo humano los podemos clasificar en grandes grupos atendiendo a su formación en el estudio de la visión, que son las siguientes:

- 1) Los medicos oftalmologos. Son los profesionales encargados del estudio del ojo humano.
- 2) La fisiología del ojo. Rama de la medicina encargada de estudiar los mecanismos biológicos de la visión. Esta es una rama transversal, ya que la comprensión de los mecanismos de visión involucra, además de la fisiología y la anatomía, la instrumentación óptica; la fotoquímica de la percepción; la ciencia del color y la psicología.
- 3) La optometría, que es la disciplina que tiene el encargo evaluar la cantidad de vision de las personas asi com del ajuste y adaptación de ayudas visuales. El objeto principal de la optometría es adaptar las ayudas visuales necesarias para la mejora de una calidad de vida. Adicionalmente, un optometrista se prepara para diagnosticar en su fase inicial cualquier problema que incide en los mecanismos de visión.
- 4) La ingeniería biomédica con especialización en visión. Un ingeniero o un científico que ha sido preparado en el conocimiento de la anatomía y fisiología de la visión, puede diseñar y construir los aparatos dedicados al diagnóstico; corrección; adaptación; estudio de materiales e investigación de nuevos sistemas relacionados con esta importante disciplina.

Los *investigadores de la óptica visual* buscan ampliar los conocimientos sobre el ojo humano, desarrollar nuevos instrumentos para el estudio del ojo y sus funciones y nuevos métodos para la detección de sus enfermedades.

9.2 Situacion nacional

En México hay una buena cantidad de oftalmólogos y de optometristas muy bien preparados para desempeñar su misión. Asimismo, a lo largo del país existen algunos hospitales e instituciones especializados en el tratamiento de enfermedades visuales, tales como el Hospital de la Luz, dedicados a la tarea de atender a la población con requerimientos clínicos de la visión. Algunos de estos hospitales cuentan con departamentos de investigación en el área clínica, pero no atienden el área instrumental, los modelos de visión o el reconocimiento de patrones. Esto último se explica porque no hay una suficiente cantidad de investigadores en óptica visual, y menos aún centros o institutos dedicados a ello de manera especial con los objetivos y alcances de los institutos nacionales de salud. Los pocos que hay están relativamente desconectados y se encuentran llevando a cabo labores aisladas de investigación en algunos campos muy particulares. Como en muchos otros campos, México se está quedando retrasado y algo debemos hacer para evitar que esto continúe así.

En México hay algunos casos relativamente aislados de investigadores, que han comenzado a hacer estudios en algunos aspectos relacionados con la óptica visual, principalmente en el Centro de Investigaciones en Óptica (CIO), en el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE), en la Universidad Nacional Autónoma de México en el Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico (CCADET-UNAM),

la Facultad de Ciencias (FC-UNAM) y el Instituto de Matemáticas (IM-UNAM), en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) y en la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), entre otras. Sin embargo, aún si sumamos a todos los investigadores en estas instituciones, son relativamente pocos y cada uno de ellos trabaja de forma relativamente independiente de los demás.

9.3 Laboratorio Nacional de Optica de la Vision

El Laboratorio Nacional de Óptica de la Visión (LaNOV) tiene su principal sede en el Centro de Investigaciones en Optica (CIO) en Leon, Guanajuato, y como una subsede el Instituto Nacional de Astrofisica Optica y Electronica (INAOE) en Tonantzintla, Puebla. Tiene como objetivo el realizar investigación básica y aplicada que nos permita desarrollar instrumentación de última generación y un mayor entendimiento de los modelos de visión que nos lleven a desarrollar las técnicas e instrumentación necesarias para la evaluación y corrección de algunos problemas visuales. Además se brindará soporte tecnológico a la parte clínica de instituciones del sector salud.

Integrantes (INAOE) Sabino Chavez Cerda Marcelo David Iturbe Castillo Julian David Sanchez de la Llave

Investigadores asociados (INAOE) Luis Raul Berriel Valdos Eduardo Tepichin Rodriguez Carlos Gerardo Treviño Palacios

Integrantes (CIO)
Daniel Malacara Hernandez
Daniel Malacara Doblado
Zacarias Malacara Hernandez
Elder de la Rosa Cruz
Gabriel Ramos Ortiz