



La **biofotónica** y tu **salud**

La biofotónica es la ciencia encargada del uso de la luz en aplicaciones biológicas y médicas para estudiar procesos orgánicos de manera no invasiva con el fin de conocer cómo éstos son afectados por la luz; así como para el diagnóstico y tratamiento de ciertas enfermedades. Presentamos una breve introducción a la biofotónica centrándonos en tres aplicaciones que estamos desarrollando en el INAOE: 1) terapia fotodinámica, 2) pinzas ópticas y, 3) visualización de vasos sanguíneos con moteado láser.

El Sol ha influenciado la evolución de la vida en la Tierra, y no es sorpresa que los animales y las plantas hayan desarrollado una variedad de respuestas fisiológicas a la radiación solar.

La luz enfocada por el ojo humano en la retina activa señales eléctricas en los conos y bastones que el cerebro interpreta como imágenes, para disfrutar así de las bellezas del universo. Al incidir en nuestra piel, la luz inicia reacciones químicas que permiten la síntesis de la vitamina D, importante para la asimilación del calcio en los huesos.

La humanidad ha tomado conciencia de los efectos benignos de la luz desde hace más de tres milenios; ya los antiguos egipcios, chinos e indios la utilizaban para tratar diferentes enfermedades, como psoriasis, raquitismo y vitíligo. Más recientemente, se ha utilizado la luz como un tratamiento estándar para ictericia neonatal (alta bilirrubina); hoy la terapia fotodinámica sirve para tratar diferentes condiciones médicas, como cáncer de piel, pulmón, cerebro o esófago, entre otros.

El uso de los fotones en el estudio de procesos biológicos y médicos se conoce como biofotónica, la cual ha logrado un tremendo impacto en la comprensión de los fenómenos moleculares para tener un mejor entendimiento y tratamiento de diversas enfermedades.



En particular, una técnica biofotónica conocida como fototerapia de baja potencia (LLLT, por sus siglas en inglés) ha crecido de manera impresionante en los últimos años. LLLT se ha utilizado para estudiar la activación celular, reducción de dolor, tratamiento de herpes, inflamación, promoción de cicatrización de tejidos y nervios, y rejuvenecimiento de la piel, entre otros. Sin embargo, a pesar de muchos resultados positivos *in vitro*, el uso de LLLT en modelos animales y ensayos clínicos controlados es controversial, principalmente por dos razones: 1) aún no se entienden completamente los mecanismos bioquímicos subyacentes de los efectos positivos; y 2) existe una gran variedad de parámetros de iluminación que pueden influir críticamente, como longitud de onda de la luz, densidad de energía, razón de flujo de energía, estructura del pulso de luz y razón de repetición de la dosis. Todo esto ha dado lugar a un gran número de resultados contradictorios (positivos y negativos). Pero a pesar de todo, esta técnica sigue extendiendo sus horizontes





y eventualmente los obstáculos que limitan su implementación serán eliminados.

Hacer una revisión completa de la biofotónica, incluso de LLLT, es imposible en un espacio tan corto, por lo que sólo nos concentraremos en tres aplicaciones biofotónicas: 1) terapia fotodinámica, 2) pinzas ópticas

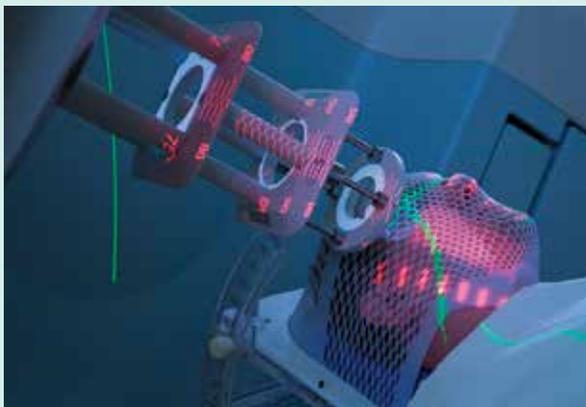
para biomoléculas, y 3) medición del flujo sanguíneo con moteado láser. La selección de estas aplicaciones está basada en nuestra experiencia e interés por desarrollarlas en México y por su potencial impacto en la salud de la población.

Recuadro 1. La energía de la luz

La energía del fotón está dada por la fórmula $E_{\text{fotón}} = hc/\lambda$ ($h = 6.63 \times 10^{-34}$ Joules/seg es la constante de Planck; $c = 3 \times 10^8$ m/s es la velocidad de la luz en el vacío; λ es la longitud de onda de la luz). Típicamente, λ es medida en nanómetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9}$ metros) o micrómetros ($1 \mu\text{m} = 10^{-6}$ metros). Por ejemplo, la longitud de onda de la luz violeta es de 400 nm o 0.4 μm , mientras que la de la luz roja es de 600 nm o 0.6 μm . Un fotón tendrá más energía mientras más pequeña sea su longitud de onda, como en los rayos ultravioleta (UV) y los rayos X. Por el contrario, tendrá menos energía si su longitud de onda es más grande, como en el infrarrojo (IR) u ondas de radio.

Es común medir la energía de los fotones en electronvolts (eV), y para convertirla de Joules a eV, sólo se divide $E_{\text{fotón}}$ por la carga del electrón ($e = 1.6 \times 10^{-19}$ Coulombs). Así, por ejemplo, los rayos UV tienen energías que van desde ~5 a 1000 eV; los rayos X, mayores a 1000 eV. Por el contrario, la energía del IR va desde ~0.001 a 1 eV y las microondas y ondas de radio son menores a 0.001 eV. La luz visible tiene energías de ~1 a 5 eV.

Los fotones de alta energía pueden ser dañinos para la salud, como veremos más tarde.



Interacción de la luz y la materia

La luz posee una naturaleza dual, es decir, se comporta como ondas (radiación electromagnética) y como partículas o corpúsculos (fotones), dependiendo del tipo de experimento de estudio. Los efectos que la radiación ocasiona en las células o tejidos dependen de ciertas propiedades de la luz; por ejemplo, su energía (véase el Recuadro 1). Para abordar las distintas aplicaciones de la biofotónica, nos centraremos en la naturaleza corpuscular de la luz y en los distintos rangos del espectro: de las ondas de radio, microondas y el infrarrojo (IR), pasando por la luz visible, al ultravioleta (UV) y los rayos X.

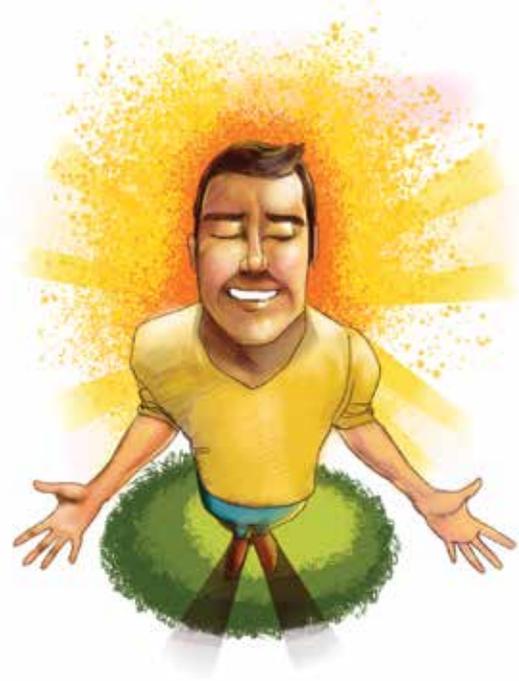
Los fotones incidentes en tejido pueden ser reflejados, absorbidos o esparcidos. Los fotones reflejados nos permiten ver sólo la capa más superficial de la piel o los tejidos. Los fotones esparcidos eventualmente escaparán en forma de luz reflejada difusa, la cual puede llevar valiosa información del tejido. En el caso de fotones absorbidos, su energía se transfiere al tejido y puede excitar electrones de las moléculas del tejido hasta altos niveles de energía y, en consecuencia, se puede obtener: 1) disipación de calor; 2) fluorescencia, fosforescencia, formación de radicales o inducción de reacciones químicas; o 3) ionización de las moléculas.

La disipación de calor puede producir la desnaturalización de proteínas, proceso que básicamente implica el rompimiento de las largas cadenas de aminoácidos y, por lo tanto, que las proteínas pierdan su funcionalidad. Los fotones de alta energía, como la radiación UV o los rayos X, pueden ionizar a las moléculas e iniciar procesos fotoquímicos que tendrán efectos secundarios no deseados, como pueden ser alteraciones en el ADN de las células. Asimismo, la exposición al UV puede provocar reacciones inflamatorias manifestadas como enrojecimiento de la piel y, si la exposición es excesiva, inclusive podría producir cáncer. Afortunadamente, nuestra piel ha evolucionado para protegernos del

sol. Las células dañadas morirán por apoptosis (proceso biológico de muerte celular programada) y si una gran cantidad de células sufre daños, los efectos aparecerán días después como despellejamiento. En este caso, las células iluminadas activan señales de alarma mediante una cascada de reacciones moleculares y las células dañadas son reparadas o reemplazadas.

La radiación visible es altamente esparcida y generalmente no es absorbida fuertemente por el tejido, pero sí por ciertos componentes del mismo, como la sangre (hemoglobina) y la melanina (pigmento que da el color a la piel). Por el contrario, la radiación IR no es fuertemente esparcida, pero es fuertemente absorbida por el agua (principal componente de tejidos suaves), lo que produce la sensación de calor cuando estamos bajo el sol. Es decir, en general, la luz visible es altamente esparcida y la luz IR es altamente absorbida. Esto deja sólo una pequeña ventana en el espectro que puede penetrar los tejidos hasta varios milímetros. Esta región es conocida como ventana óptica (véase la Figura 1).

Los efectos más interesantes en términos de información relevante para el diagnóstico médico son la fluorescencia (natural o inducida) y, en menor grado, la fosforescencia, que permite identificar diferentes componentes celulares activados en el estudio de distintos procesos moleculares. La fluorescencia natural



de algunas proteínas o pequeñas moléculas (como triptófano, NADH, verde fluorescente y muchas más) se ha empleado exitosamente para marcado nuclear, de pared celular, proteínas, lípidos y ADN, entre otras, para detección de células cancerígenas, detección de mutaciones en el ADN, o determinación de procesos moleculares que permiten un mejor entendimiento de las enfermedades y los procesos biológicos en general.

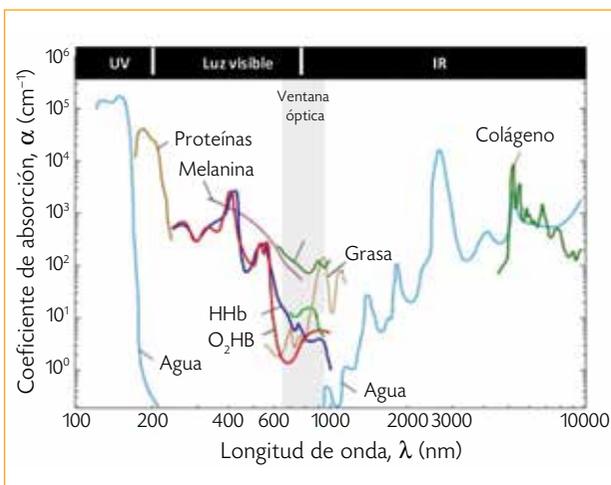


Figura 1. Espectro de absorción de la luz por parte de los principales componentes de la piel. La piel absorbe fuertemente el UV y el IR. La ventana óptica (entre rojo e infrarrojo cercano) es una región donde tanto la absorción como el esparcimiento de la luz son mínimos, lo que permite una mayor penetración de la luz.

Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica (PDT) fue descubierta accidentalmente hace más de 100 años cuando Oskar Raab y su asesor de doctorado, Hermann von Tappeiner, de la Universidad de Munich, encontraron que paramecios (microorganismos acuáticos) teñidos con acridina naranja (ahora usada como marcador fluorescente de ADN) murieron cuando fueron colocados en una zona muy iluminada. Posteriormente, encontraron que la acridina naranja se vuelve tóxica bajo iluminación visible. Con base en esto, Von Tappeiner propuso la PDT para tratar carcinoma de piel. Sin embargo, esta terapia fue prácticamente olvidada pese a que otro pionero de la PDT, Niels Ryberg Finsen, obtuvo el premio



Nobel de Medicina en 1903. La PDT fue redescubierta en la década de 1970 por varios investigadores estadounidenses que usaron derivados de hematoporfirina combinada con luz roja para tratar cáncer de vejiga en animales y humanos. A partir de entonces, la PDT se ha consolidado como una terapia para la destrucción selectiva de células malignas sin los terribles efectos secundarios de la quimioterapia.

La PDT involucra la administración local o intravenosa de un agente fotosensibilizador (PS) no tóxico, el cual se absorbe por las células en contacto o se distribuye por el torrente sanguíneo a todo el cuerpo. En las células cancerígenas no se desecha tan rápido como en las células sanas debido a una diferenciación metabólica. El exceso de PS es filtrado por el riñón y desechado a través de la orina. Después de un par de días, se ilumina la zona afectada (con mayor concentración del PS) con luz cuya longitud de onda corresponde a una banda de absorción del PS (véase la Figura 2). Bajo iluminación, el PS 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 radiativamente 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 oxí-

geno molecular O_2 es el triplete, y cuando reacciona con el PS 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 y 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 PDT exitosa son: una apropiada oxigenación, buena distribución del PS y suficiente penetración de la luz.

La PDT puede ser empleada en la eliminación de microorganismos como bacterias, específicamente en aplicaciones dentales y otros problemas de la cavidad oral. En el caso de hongos, se ha tratado *Candida albicans*, el hongo más común responsable de infecciones oportunistas, así como con dermatofitos, causantes de infecciones en la piel. La PDT ha sido aceptada por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de Estados Unidos para su uso en cáncer de piel, endobronquial, estómago, vejiga, mamas y lesiones en cavidad bucal, entre otros.

Las ventajas de la PDT sobre tratamientos estándar contra el cáncer son múltiples: mínimos efectos secundarios para los pacientes, como hipersensibilidad a la luz, dolores de cabeza temporales o hinchazón, que desaparecen al cabo de unos días. En México ha habido intentos aislados de estudiar la PDT, pero sin mucho éxito hasta el momento. Una razón que podría explicar este aparente fracaso es su multidisciplinariedad, que involucra la participación de químicos, físicos y médicos. Difundir e implementar la PDT en hospitales mexicanos es nuestro gran reto.

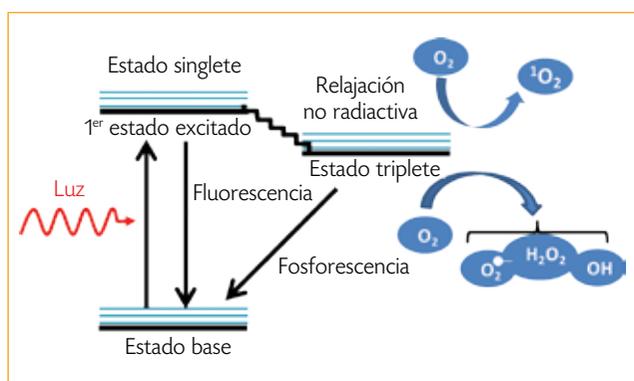


Figura 2. Fotoactivación de colorantes en la PDT. La iluminación con luz roja excita (mayor penetración de la luz en el tejido) al colorante. Mediante transferencia de energía al estado triplete de la molécula, ésta puede reaccionar con oxígeno o moléculas que contienen oxígeno para generar especies altamente reactivas (1O_2 , O_2^- , OH y H_2O_2) que destruyen todo tipo de células.

Pinzas ópticas

La manipulación de materia con luz fue demostrada experimentalmente por primera vez por Ashkin en 1970 en los Laboratorios Bell de Estados Unidos. Las pinzas ópticas permiten la manipulación tridimensional de microobjetos (orgánicos e inorgánicos) mediante un haz de luz fuertemente enfocado. Los objetos son atraídos hacia el foco de la lente por medio de fuerzas

gradientes y al mismo tiempo empujadas fuera de esta zona por presión de radiación. Para un confinamiento tridimensional, la fuerza gradiente debe ser mayor a la fuerza de presión de radiación, lo cual se logra usando objetivos de microscopio de alta apertura numérica (por ejemplo, un 100x). Una descripción básica de los principios físicos de operación de las pinzas ópticas se puede encontrar en las lecturas adicionales.

La habilidad de confinar objetos biológicos sin dañarlos y además manipularlos para estudiarlos en combinación con otras técnicas microscópicas, como fluorescencia, confocal o Raman, se convierte en una herramienta muy poderosa en el entendimiento de los procesos moleculares y celulares. Las pinzas ópticas permiten medir y ejercer fuerzas menores que las obtenidas con un microscopio de fuerza atómica, así como producir microdeformaciones de manera no invasiva.

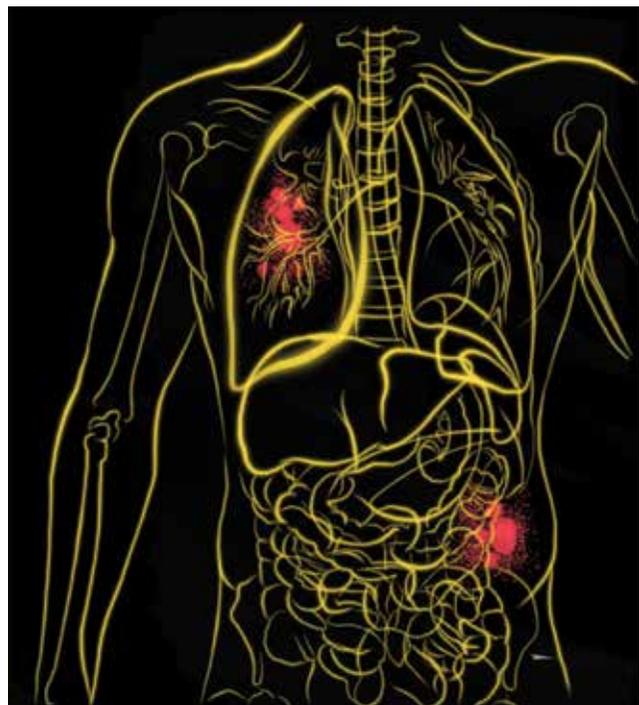
Las pinzas ópticas se han usado en el estudio de la dinámica molecular (tanto lineales como rotatorias), motores moleculares como el sistema actina-miosina, el estudio de flagelos de bacterias, entre una gran variedad de aplicaciones. Se ha podido observar cómo una molécula de ARN polimerasa se mueve a través de un templete de ADN complementario de ARN. Asimismo, se han utilizado en el estudio de proteínas de membranas, incluyendo la adhesión celular de proteínas, como los receptores lambda en *Escherichia coli* y receptores de transferinas. Se ha confirmado, además, que la manipulación con pinzas ópticas de células neuronales estimula la secreción de factores de crecimiento neuronal, lo cual abre la posibilidad, por ejemplo, de conexiones neuronales y, con ello, posibles curas a ceguera, parálisis y muchas enfermedades degenerativas del cerebro.

Un problema de salud que afecta a la población del sur de México es la malaria o paludismo. Éste se transmite por la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles*. La detección del paludismo implica la tinción, detección proteica o técnicas moleculares, las cuales pueden ser lentas, de baja sensibilidad o caras. Los sistemas de pinzas ópticas de trampa doble se han empleado recientemente en la deformación controlada de células para el estudio de las propiedades viscoelásticas de las membranas. En particular, se han utilizado para estudiar la deformación de glóbulos rojos, ya sea

con la adhesión de partículas coloidales a la membrana y enfocando el láser a estas partículas, o bien, directamente con el láser sobre la célula. La deformación de un solo glóbulo rojo permite determinar si la célula está infectada a través de la dinámica viscoelástica de su estructura, así como detalles del proceso de parasitación. La detección toma sólo unos minutos, con alta sensibilidad y especificidad. Esta técnica puede extenderse a la identificación y caracterización de glóbulos blancos y células cancerígenas de diferentes tipos, con lo que se espera mejorar las técnicas de detección, diagnóstico de enfermedades como cáncer y aquellas provocadas por virus, para así repercutir en el tratamiento y la calidad de vida de los pacientes.

● Moteado láser

La sangre es un fluido altamente especializado que transporta los nutrientes y el oxígeno que nuestro cuerpo necesita para mantenerse sano, y por lo tanto es indispensable que el suministro de sangre sea el adecuado para el correcto funcionamiento de todos los órganos del cuerpo. Es bien sabido que diferentes enfermedades, como insuficiencia cardíaca, arterosclerosis, cardiopatías congénitas y angiopatías, entre otras,





pueden causar un suministro irregular de la sangre a los órganos; por ello, la medición del flujo sanguíneo proporciona información esencial para el diagnóstico de dichos padecimientos. Dado que los cambios en el flujo sanguíneo se pueden presentar en etapas iniciales de la enfermedad, una técnica al servicio de los médicos para medición de flujo sanguíneo de manera no invasiva, rápida y fiable, podría proveerles de nuevas opciones para un diagnóstico temprano. La medición del flujo sanguíneo no es una tarea sencilla, ya que la luz no penetra mucho dentro de los tejidos debido al fuerte efecto de esparcimiento y absorción, por lo que la medición del flujo sanguíneo es posible sólo en vasos sanguíneos relativamente superficiales, como en retina, piel o cerebro.

Las técnicas de medición de flujo sanguíneo han evolucionado a lo largo de los años y se han fundamentado en diferentes principios físicos. Algunas de estas técnicas son: ultrasonido Doppler, resonancia magnética, tomografía por emisión de positrones, láser Doppler y moteado láser. Esta última es una de las líneas de investigación que hemos desarrollado en los últimos años en nuestro grupo de trabajo.

El moteado láser consiste en lo siguiente: un objeto esparcidor de luz, como el vidrio esmerilado o el tejido biológico, es iluminado por luz láser. La luz esparcida es colectada por un sistema óptico sobre un detector de luz, por ejemplo, una cámara fotográfica. La luz colectada formará un patrón de interferencia sobre la imagen del objeto consistente de motas brillantes y oscuras, llamado patrón de moteado. Si el

objeto no se mueve, entonces un patrón de moteado estático es obtenido; pero si el objeto o las partículas dentro de él se mueven, como las células de la sangre que están circulando en los vasos sanguíneos, entonces el patrón de motas se mueve y ahora se obtendrá un patrón de moteado dinámico. Al tomar una fotografía del patrón de moteado, las zonas dinámicas del objeto se verán difuminadas, pero no en las zonas estáticas. Entre mayor sea la velocidad del objeto, mayor será el difuminado. En el lenguaje óptico, hacer la medición del difuminado significa medir el contraste local de la imagen de moteado. Esta tarea es llevada a cabo mediante procesamiento de imágenes. A partir de la imagen de contraste, es posible obtener una imagen de índice de perfusión, el cual es una medida de la velocidad del flujo sanguíneo. En la Figura 3 se observa una imagen de vasos sanguíneos en el dorso de un roedor y su correspondiente imagen de flujo sanguíneo, indicado en mapas de colores. Las zonas rojas indican mayor velocidad de flujo sanguíneo; mientras que el azul oscuro indica zonas de baja velocidad.

Esta técnica de medición de flujo sanguíneo se ha empleado en diferentes áreas de la medicina; por ejemplo, se ha utilizado para monitorear el ritmo cardíaco en humanos, estimar la profundidad del daño ocasionado por una quemadura, determinar el mapa de flujo sanguíneo en retina, medir la efectividad de la PDT en cáncer y en cerebro, por mencionar algunas aplicaciones.

A pesar de la popularidad que ha adquirido la interferometría de moteado (LSI, *Laser Speckle Imaging*)

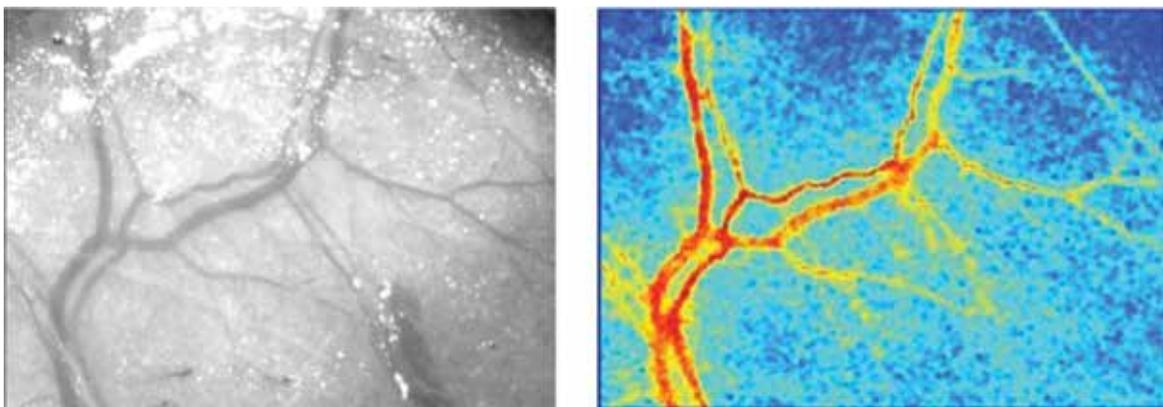


Figura 3. a) Imagen en blanco y negro de una red de vasos sanguíneos en la subdermis de un roedor; b) mapa de flujo sanguíneo correspondiente, obtenido con la técnica de moteado láser.

en el ambiente clínico, como toda línea de investigación aún enfrenta retos. Por ejemplo, se requiere de un modelo teórico más robusto que proporcione una expresión analítica para el tiempo de correlación de la luz que genera el moteado y su grado de difuminado, así como también debería de ser capaz de proporcionar información sobre la velocidad del flujo sanguíneo en vasos profundos. En el Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica justamente estamos desarrollando modelos teóricos y comparando sus predicciones en el laboratorio.

A manera de conclusión, podemos decir que la biofotónica ha tenido un tremendo impacto en la detección, el diagnóstico y tratamiento de enfermedades de manera no invasiva con mínimos efectos secundarios. La biofotónica es una ciencia multidisciplinaria que requiere el concurso de especialistas de varias ramas del conocimiento para poder hacer contribuciones de alto impacto. Desafortunadamente, esto no ha ocurrido en México y ése es el gran reto de la biofotónica en nuestro país.

Rubén Ramos García estudió la licenciatura en Física y Matemáticas en el Instituto Politécnico Nacional; la maestría en el Centro de Investigaciones en Óptica, y el doctorado en Física en el Imperial College of London. Desde 1997 es investigador en el Departamento de Óptica del Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica en Puebla. Sus áreas de interés son biofotónica, cavitación óptica y óptica no lineal de cristales líquidos. Es investigador titular "C"; miembro del Sistema Nacional de Investigadores, nivel II; miembro de la Academia Mexicana de Ciencias, e investigador asociado al Centro Internacional de Física Teórica (ICTP) en Trieste, Italia.
rgarcia@inaoep.mx

Teresita Spezzia Mazzocco estudió la licenciatura de Químico Fármaco Biólogo en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; cursó la maestría en Biotecnología en el Centro de Investigación en Ciencia Avanzada y Tecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, y el doctorado en el área de Biotecnología del Colegio de Posgraduados. Hizo una estancia doctoral en el Institute of Forest Botany, Section Molecular Wood Biotechnology, en Gottingen, Ale-

mania. Tiene experiencia docente en el Departamento de Ciencias biológicas de la Universidad de las Américas y en investigación en desarrollos biotecnológicos con empresas privadas. Actualmente realiza un posdoctorado en el Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica en el área de biofotónica.

terespezia@inaoep.mx

Julio César Ramírez San Juan estudió la licenciatura en Física en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México; la maestría y el doctorado en Ciencias en el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE) en Puebla; posteriormente realizó una estancia posdoctoral en el Beckman Laser Institute de la Universidad de California, Irvine. Su área de interés es la biofotónica, la cual desarrolla en el departamento de óptica del INAOE desde hace diez años. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores, nivel I.

jcram@inaoep.mx

Para saber más

- Boas, D. y A. Dunn (2010), "Laser speckle contrast imaging in biomedical optics", *Journal of Biomedical Optics*, 15:1-12.
- Dennis, E., G. Dolmans, D. Fukumura y R. Jain (2003), "Photodynamic therapy for cancer", *Nature Reviews Cancer*, 3:380-387.
- Greulich, K. (1999), *Micromanipulation by Light in Biology and Medicine: The Laser Microbeam and Optical Tweezers*, Basilea, Birkhäuser Verlag (Methods in Bioengineering Series).
- Ramírez San Juan, J., R. Ramos García, I. Guizar Iturbide et al. (2008), "Impact of velocity distribution assumption on simplified laser speckle imaging equation", *Optics Express*, 16:3197-3203.
- Spezzia Mazzocco, T., Ramos-García, R. y Ramírez-San Juan, J. C. (2015), "La terapia fotodinámica en las infecciones fúngicas", en Alejandra Paula Espinosa Taxis, Candelario Vázquez Cruz, Patricia Sánchez Alonso et al. (eds), *Temas selectos de microbiología médica y molecular*, Puebla, Dirección de Fomento Editorial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, pp. 41-46.
- Volke Sepúlveda, K., I. Ricárdez Vargas y R. Ramos García (2007), "Pinzas ópticas: las delicadas manos de la luz", *Ciencia*, 58(4):18-25.