

Microscopía Brillouin

Brillouin Microscopy

María Ángeles Giménez Gimeno, MSc^{1*}; Laura Trávez Valiente, MSc²; Galadriel Giménez Calvo, PhD²

1: Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España.

2: Hospital Nuestra Señora de Gracia, Zaragoza, España.

*magimenezgimeno@gmail.com

Recibido: 23 de junio del 2025

Aceptado: 14 de agosto del 2025

Publicado: 14 de octubre del 2025

Financiación: Ninguno de los autores declaran tener financiaciones.

Declaración de Conflictos de Intereses: Ninguno de los autores declaran tener conflictos de intereses.

Relevancia: La microscopía Brillouin representa un avance significativo en el estudio de la biomecánica corneal, al ofrecer un análisis tridimensional y no invasivo de la viscoelasticidad del tejido, con aplicaciones diagnósticas prometedoras.

Resumen: El estudio de la biomecánica corneal permite la detección de alteraciones en la estructura de la córnea facilitando el diagnóstico de patologías como el queratocono y otras ectasias. Las técnicas de aplanación forzada son ampliamente utilizadas, pero no permiten calcular la elasticidad del tejido. El reciente desarrollo de la microscopía Brillouin (MB) permite estimar la viscoelasticidad del tejido corneal mediante el cambio de frecuencia de la luz que lo atraviesa, obteniéndose un mapa tridimensional de toda la córnea sin contacto directo.

Otras aplicaciones de esta tecnología abarcan desde el diagnóstico de distrofias corneales a la evaluación post cirugía refractiva corneal. Sin embargo, las fluctuaciones de su precisión en función del estado de hidratación de la córnea y el tiempo requerido para su uso suponen las principales limitaciones de este método. Una combinación de tomografía de coherencia óptica y MB parece orientar el futuro de la investigación de la biomecánica corneal.

Esta revisión bibliográfica pretende proporcionar una recopilación de las principales funciones de esta técnica en el ámbito de la oftalmología y la optometría clínica. Para ello, se identificaron 681 estudios, siendo seleccionados 211 documentos correspondientes a los cinco últimos años, de los cuales 183 pertenecían a artículos científicos, 27 a revisiones y 1 a revisión sistemática, utilizando los buscadores y bases de datos Cochrane, Scopus, PubMed, Dialnet, SciELO y Web of Science, con palabras clave como "Brillouin microscopy", "Brillouin spectroscopy", "corneal biomechanics", "mechanical anisotropy" y "corneal cross-linking". Finalmente, de los artículos seleccionados se recopilieron 24 que comprendían los aspectos más relevantes para la elaboración de este trabajo.

Palabras clave: Biomecánica corneal, Microscopía Brillouin, Queratocono.

Relevance: Brillouin microscopy represents a major advance in the investigation of corneal biomechanics, enabling three-dimensional, non-invasive assessment of tissue viscoelasticity and showing considerable potential for diagnostic applications.

Abstract: The study of corneal biomechanics enables the detection of structural alterations in the cornea, facilitating the diagnosis of pathologies such as keratoconus and other ectatic disorders. Forced-applanation techniques are widely used; however, they do not allow for the direct assessment of tissue elasticity. The recent development of Brillouin microscopy (BM) provides a means to estimate the viscoelastic properties of corneal tissue by detecting frequency shifts

in light as it traverses the cornea, thereby generating a three-dimensional, non-contact map of the entire structure.

Beyond its application in ectasia detection, this technology has also been investigated for the diagnosis of corneal dystrophies and the evaluation of post-refractive surgical outcomes. Nevertheless, variations in measurement accuracy due to corneal hydration status, as well as the time required for data acquisition, remain key limitations. A multimodal approach combining optical coherence tomography with BM appears to represent a promising direction for future research in corneal biomechanics.

The aim of this literature review is to provide a comprehensive overview of the main applications of this technique in the fields of ophthalmology and clinical optometry. A total of 681 studies were initially identified, of which 211 documents published within the last five years were selected: 183 original research articles, 27 narrative reviews, and 1 systematic review. The databases consulted included Cochrane, Scopus, PubMed, Dialnet, SciELO, and Web of Science. Search strategies employed keywords such as "Brillouin microscopy," "Brillouin spectroscopy," "corneal biomechanics," "mechanical anisotropy," and "corneal cross-linking." Ultimately, 24 of the selected articles were analyzed in detail, covering the most relevant aspects for the preparation of this paper.

Keywords: Corneal biomechanics, Brillouin microscopy, Keratoconus.

INTRODUCCIÓN

La córnea es un componente crucial de la potencia óptica total del ojo, ya que actúa como superficie refractiva primaria junto con la película lagrimal. Las anomalías o alteraciones en su morfología pueden causar profundos efectos en la formación de la imagen óptica. Los glicosaminoglicanos (GAG) y los proteoglicanos (PG) de la matriz extracelular, así como las láminas de colágeno del estroma, confieren a la córnea cualidades viscoelásticas. De este modo, la córnea es capaz de absorber y disipar energía en forma de calor cuando se deforma en respuesta a una carga externa (1).

Las propiedades biomecánicas de la córnea permiten cuantificar su viscoelasticidad y, por tanto, su implicación en la adaptación de lentes de contacto de ortoqueratología (2), en la predicción de resultados quirúrgicos y en el diagnóstico de enfermedades como el queratocono y otras ectasias. Las principales propiedades son la histéresis corneal (HC), que describe la capacidad de amortiguación viscosa de la córnea, y el factor de resistencia corneal (FRC), un indicador de la resistencia global de la córnea (1).

Durante las últimas décadas, la colaboración interdisciplinaria entre investigadores en ingeniería óptica, modelado biomecánico analítico e investigación clínica ha permitido ampliar nuestro conocimiento sobre la biomecánica corneal (2,3). Así pues, para su medición pueden utilizarse varios métodos in vivo. El más utilizado en la práctica clínica es el Ocular Response Analyzer® (ORA) (Reichert, Depew, NY), una tonometría

de aplanación bidireccional que utiliza un haz infrarrojo para registrar los cambios en un área central de 3 mm de la córnea producidos por un soplo de aire sobre la misma (4). Sin embargo, presenta limitaciones, ya que puede no detectar cualquier irregularidad más periférica, y aquellas de la superficie central pueden causar dispersión de la luz que distorsione la forma de la onda especular, haciendo que el instrumento confunda la respuesta tisular con una respuesta superficial (1).

Otro método unidimensional basado en la tonometría de aire es el Corvis ST® (Oculus, Wetzlar, Alemania), que ofrece un mayor nivel de detalle sobre la respuesta corneal mediante el uso de imágenes Scheimpflug de alta velocidad, y proporciona un valor denominado índice biomecánico corneal (IBC) que mejora la detección del queratocono. Sin embargo, al igual que el ORA, no mide la elasticidad corneal y carece de la capacidad de cartografiar tridimensionalmente la córnea (1).

Existen otros métodos como la elastometría de ondas superficiales por ultrasonidos (EOSU), la elastografía de coherencia óptica (ECO) y la elastografía por resonancia magnética (ERM), pero su aplicación a la cartografía de la superficie corneal es escasa debido a la falta de resolución adecuada y a la dificultad para determinar los límites de las lesiones corneales (1). Pese a los avances en la tecnología, como con la aparición de la tomografía de coherencia óptica de alta resolución (UHR-OCT) de 1 a 4 μm (5), debido a la necesidad de mejorar la sensibilidad de estos instrumentos y solventar sus limitaciones con la biomecánica corneal, la aplicación de la MB supone una alternativa de interés que merece un estudio detallado.

DISCUSIÓN

Microscopía Brillouin

El físico francés Lèon Brillouin (1889 – 1964) descubrió por primera vez en 1922 el concepto de ondas luminosas que interactúan con las ondas naturales dentro de un material. El campo de la MB se estableció hace aproximadamente 20 años, gracias al desarrollo de espectrómetros ópticos de alta resolución sin barrido. Se basa en el principio de dispersión de luz Brillouin (DLB), un proceso de dispersión inelástica en el que la luz interactúa con ondas acústicas de gigahercios a una frecuencia dada. Debido a esta interacción, la frecuencia de la luz dispersa sufre un desplazamiento de exactamente la frecuencia acústica Ω_B . La detección de dicho desplazamiento de frecuencia, denominado desplazamiento de frecuencia de Brillouin (DFB), y su forma de línea espectral puede proporcionar información valiosa sobre las propiedades viscoelásticas locales de las muestras biológicas (6).

Como método sin contacto, la MB es adecuada para la obtención de imágenes 3D in vivo e in situ de una amplia gama de sistemas biológicos, que pueden representar las estructuras de la muestra y ayudar a caracterizar la morfología tisular. Estos logros hacen de la MB una técnica prometedora en aplicaciones como el diagnóstico biomédico, la ingeniería de tejidos y la caracterización de materiales (6). Una de sus peculiaridades reside en la resolución espacial efectiva de las imágenes mecánicas ya que, a diferencia de la microscopía óptica de campo lejano, donde el límite de difracción de Abbe define las resoluciones espaciales longitudinales y transversales alcanzables cuando se conoce la configuración óptica, en la espectroscopía Brillouin la luz interactúa con fotones acústicos y, como resultado, la onda luminosa cambia de frecuencia o nivel de energía por pérdida o ganancia de energía fotónica a través de un proceso llamado formación o absorción de cuasipartículas (1,6).

Según la naturaleza de la muestra biológica y la aplicación prevista, la configuración de la MB puede basarse en una sola fuente láser, como en la MB espontánea, o en múltiples láseres, como en la MB estimulada. En aplicaciones biomédicas se utilizan técnicas de dispersión espontánea de Brillouin, como la microscopía confocal, en la que la espectroscopía Brillouin se basa en la interferometría de barrido de etalón Fabry-Pérot para describir células vivas, fibras de colágeno, hidrogeles, biopelículas, la córnea y el cristalino (6).

Para lograr mediciones de MB de alta calidad, se deben

considerar: la longitud de onda del láser, la potencia, el ancho de banda espectral y las características de ruido.

En particular, se busca que las longitudes de onda dentro de la región de transparencia biológica (650 – 800 nm) sean ideales para evitar dañar la muestra. Además, cabe destacar que las señales de Brillouin son intrínsecamente débiles y requieren de un filtrado adicional de banda de Rayleigh para ser detectadas (6). Asimismo, se han desarrollado diferentes estrategias con seguimiento de movimiento in vivo para corregir los perfiles Brillouin desordenados a causa de artefactos provocados por el movimiento del paciente (7).

Aplicaciones

La principal aplicación de la MB es en el campo de la oftalmología, especialmente en la caracterización de la biomecánica corneal para el queratocono y otras ectasias que cursan clínicamente con un adelgazamiento y aumento de curvatura de la córnea. Las córneas sanas son mecánicamente fuertes gracias a las fibras de colágeno estromal densamente empaquetadas que mantienen la forma bajo la acción de la presión intraocular (PIO) hacia fuera. Por el contrario, las córneas con ectasia presentan una organización del colágeno alterada y un número reducido de entrecruzamiento de sus fibras que constituye un debilitamiento focal.

La MB representa un método excepcionalmente capaz de medir la pérdida de resistencia mecánica en estas córneas in vivo (6), con una probable independencia a los cambios de la PIO, así como a la hora de distinguir entre queratocono subclínico o precoz y queratocono normal, y monitorizar su progresión, resultando incluso mejor que cualquier métrica clínica de tomografía corneal como la de Scheimpflug (8 -11), lo que es de vital importancia para identificar córneas con riesgo de complicaciones postoperatorias como la ectasia iatrogénica tras cirugía refractiva láser (12).

El cross-linking corneal es el único tratamiento aprobado médicamente para mejorar las propiedades biomecánicas de la córnea y preservar su transparencia. Consiste en la interacción de riboflavina con luz ultravioleta A (UVA) a una longitud de onda de 365 nm, lo que induce la generación de especies reactivas de oxígeno y promueve la creación de nuevos enlaces cruzados de fibras de colágeno de la córnea mejorando así su rigidez. Mediante la microscopía tridimensional Brillouin, investigaciones recientes han estudiado los cambios de las propiedades biomecánicas tras cross-linking corneal en comparación con los de un láser de femtosegundo en el infrarrojo cercano, demostrando resultados muy similares, por lo que el láser supone una alternativa prometedora ya que permite reducir el riesgo

de daño endotelial (13). La MB ha permitido demostrar incluso que el cross-linking realizado sobre el colgajo LASIK en ectasias iatrogénicas genera un efecto de rigidez significativamente mayor que el aplicado bajo el colgajo tras la elevación del mismo (14). En este sentido, esta técnica ofrece, además, una mejor evaluación de la eficacia a largo plazo de estos procedimientos, debido a su sensibilidad a la anisotropía mecánica del estroma, incluso en córneas altamente hidratadas (14–18).

La hidratación no afecta únicamente a la transparencia, sino también a su módulo elástico ya que, cuanto más hidratado esté el tejido corneal, menor será su módulo elástico, lo que puede deberse a una alteración de la unión del colágeno a los PG y/o GAG basada en su interacción iónica (19). Estudios recientes han establecido que los cambios de frecuencia Brillouin están modulados por la concentración de agua, por lo que la MB también puede resultar beneficiosa para comprender el papel que desempeña la dinámica de fluidos en diferentes trastornos corneales como la Distrofia Endotelial de Fuchs, así como posiblemente para monitorizar los injertos corneales después de una queratoplastia endotelial con membrana de Descemet (DMEK) (20).

Otra aplicación prometedora de la MB está relacionada con la presbicia causada por el endurecimiento del cristalino. La pérdida de la acomodación con la edad se compensa fundamentalmente con gafas o lentes de contacto, pero éstas no permiten restaurar la amplitud acomodativa, lo que ha llevado recientemente a un gran esfuerzo para desarrollar fármacos que se dirijan a la biomecánica del cristalino. En este sentido, la MB ha demostrado la capacidad de medir los cambios relevantes que ocurren en el cristalino y, por tanto, puede representar una herramienta fundamental para el desarrollo de fármacos en estudio (6, 21). Y más allá de los cambios estructurales debidos a la edad, la MB ha resultado también un método eficaz para la evaluación de los efectos a largo plazo de la lente de colámero implantable (ICL) sobre las propiedades biomecánicas y morfológicas del cristalino, concluyendo que no se ven alteradas significativamente (22).

Los avances en la espectroscopía Brillouin han facilitado incluso la investigación no destructiva de las propiedades biomecánicas de la retina que pueden verse afectadas por diversas enfermedades, lo que ha supuesto un reto, debido a su fragilidad y ubicación dentro del globo ocular. Así pues, la MB puede utilizarse para caracterizar la distribución de la rigidez de las capas de la retina y para diferenciar el tejido en diferentes condiciones según sus propiedades biomecánicas (23).

Ventajas y limitaciones

Además de su alta repetibilidad (24), la mayor ventaja de la MB, que comparte con otras técnicas de elastografía óptica, es que se trata de una técnica que permite la exploración cuantitativa de las propiedades de los materiales dentro de las células, tejidos y organismos. Pero, mientras que la MB aprovecha las fluctuaciones de densidad inherentes impulsadas térmicamente, otros métodos de elastografía óptica aplican externamente una deformación conocida a frecuencias dadas, lo cual tiene consecuencias importantes. La opción de elegir las frecuencias de excitación significa que la respuesta mecánica puede evaluarse en modo de cizallamiento y en escalas de tiempo más cercanas a las comúnmente utilizadas en técnicas no ópticas, como la nanoindentación (0,1 – 10 kHz), que está lejos de las frecuencias de gigahercios relevantes en la MB, que se traducen en una mayor resolución espacial subcelular, mientras que otras técnicas ópticas a menudo tienen dificultades para lograr una resolución incluso celular (6).

No obstante, el excesivo tiempo de adquisición, en comparación con otras técnicas de microscopía, su coste y su tamaño, constituyen un obstáculo importante para su adopción generalizada en la práctica clínica.

CONCLUSIONES

Con futuros avances que refuercen sus principales aplicaciones y solventen sus retos más importantes, como el elevado coste y el tiempo de adquisición de las imágenes, se espera que la MB integrada con inteligencia artificial permita generar protocolos para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de diversos trastornos, no solo del segmento anterior del ojo, mediante la evaluación de las propiedades viscoelásticas de la córnea, cruciales para comprender afecciones como el queratocono y para evaluar la viabilidad de la adaptación de ortoqueratología y los resultados de las cirugías refractivas, sino también de estructuras más internas de importante relevancia para la función visual, como el cristalino y la retina. Todo ello convierte a la MB en una tecnología muy prometedora para la oftalmología y la optometría clínica.

REFERENCIAS

1. Loveless BA, Moin KA, Hoopes PC, et al. The Utilization of Brillouin Microscopy in Corneal Diagnostics: A Systematic Review. *Cureus*. 2024 Jul 30.
2. Zhang PP, Zhang XY, Li XF, et al. Analyzing corneal biomechanical response in orthokeratology with differing back optic zone diameter: A comparative finite element study. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2025 Jul 1 [cited 2025 Jun 23];48(4).
3. Lan G, Twa MD, Song C, et al. In vivo corneal elastography: A topical review of challenges and opportunities. *Comput Struct Biotechnol J*. 2023 Jan 1;21:2664.
4. Ramirez-Miranda A, Mangwani-Mordani S, Arteaga-Rivera JY, et al. Importance and use of corneal biomechanics and its diagnostic utility. *Cirugia y Cirujanos*. 2023 Nov 1;91(6):848–57.
5. Han SB, Liu YC, Mohamed-Noriega K, et al. Advances in Imaging Technology of Anterior Segment of the Eye. *J Ophthalmol*. 2021.
6. Kabakova I, Zhang J, Xiang Y, et al. Brillouin microscopy. *Nature Reviews Methods Primers*. 2024 Dec 1;4(1).
7. Zhang H, Asroui L, Randleman JB, et al. Motion-tracking Brillouin microscopy for in-vivo corneal biomechanics mapping. *Biomed Opt Express*. 2022 Dec 1;13(12):6196.
8. Nair A, Ambekar YS, Zevallos-Delgado C, et al. Multiple Optical Elastography Techniques Reveal the Regulation of Corneal Stiffness by Collagen XII. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2022 Nov 1;63(12):24.
9. Esporcatte LPG, Salomão MQ, Lopes BT, et al. Biomechanical diagnostics of the cornea. *Eye and Vision*. 2020 Dec 1;7(1):1–12.
10. Zhang H, Asroui L, Tarib I, et al. Motion-Tracking Brillouin Microscopy Evaluation of Normal, Keratoconic, and Post-Laser Vision Correction Corneas. *Am J Ophthalmol*. 2023 Oct 1;254:128–40.
11. Randleman JB, Zhang H, Asroui L, et al. Subclinical Keratoconus Detection and Characterization Using Motion-Tracking Brillouin Microscopy. *Ophthalmology*. 2024 Mar 1;131(3):310–21.
12. Seiler TG, Geerling G. Brillouin Spectroscopy in Ophthalmology. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2023 Mar 8;240(6):779–82.
13. Iriarte-Valdez CA, Wenzel J, Baron E, et al. Assessing UVA and Laser-Induced Crosslinking via Brillouin Microscopy. *J Biophotonics*. 2025 May 1.
14. Zhang H, Roozbahani M, Piccinini AL, et al. Depth-dependent analysis of corneal cross-linking performed over or under the LASIK flap by Brillouin microscopy. *J Cataract Refract Surg*. 2020 Nov 1;46(11):1543.
15. Webb JN, Zhang H, Roy AS, et al. Detecting mechanical anisotropy of the cornea using brillouin microscopy. *Transl Vis Sci Technol*. 2020;9(7):1–11.
16. Heisterkamp A, Wenzel J, Iriarte C, et al. Techniques for In Vivo Assessment of Corneal Biomechanics: Brillouin Spectroscopy and Hydration State - Quo Vadis? *Klin Monbl Augenheilkd*. 2022 Dec 9;239(12):1427–32.
17. Lopes BT, Elsheikh A. In Vivo Corneal Stiffness Mapping by the Stress-Strain Index Maps and Brillouin Microscopy. Vol. 48, *Current Eye Research*. Taylor and Francis Ltd.; 2023. p. 114–20.
18. Eltony AM, Shao P, Yun SH. Measuring mechanical anisotropy of the cornea with Brillouin microscopy. *Nat Commun*. 2022 Dec 1;13(1).
19. Komninou MA, Seiler TG, Enzmann V. Corneal biomechanics and diagnostics: a review. *Int Ophthalmol*. 2024 Dec 1;44(1):132.
20. Eltony AM, Clouser F, Shao P, et al. Brillouin Microscopy Visualizes Centralized Corneal Edema in Fuchs Endothelial Dystrophy. *Cornea*. 2020 Feb 1;39(2):168–71.
21. Ma Y, Cao J, Yu Y, et al. A Brillouin microscopy analysis of the crystalline lenses of Chinese adults with myopia. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2024 Oct 1;262(10).
22. Ma Y, Cao J, Yu Y, et al. Brillouin assessment of the crystalline lens in patients with high myopia after long-term implantable collamer lens V4c implantation. *Acta Ophthalmol*. 2024.
23. Ambekar YS, Singh M, Scarcelli G, et al. Characterization of retinal biomechanical properties using Brillouin microscopy. *J Biomed Opt*. 2020 Sep 26;25(9):090502.
24. Vinciguerra R, Palladino S, Herber R, et al. The KERATO Biomechanics Study 1: A Comparative Evaluation Using Brillouin Microscopy and Dynamic Scheimpflug Imaging. *Journal of Refractive Surgery*. 2024 Aug 1;40(8):e569–78.

ABREVIATURAS

- DLB: Dispersión de Luz Brillouin
- DMEK: Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty
- DFB: Desplazamiento de Frecuencia de Brillouin
- ECO: Elastografía de Coherencia Óptica
- EOSU: Elastometría de Ondas Superficiales por Ultrasonidos
- ERM: Elastografía por Resonancia Magnética
- FRC: Factor de Resistencia Corneal
- GAG: Glicosaminoglicanos