

FLUORESCENCIA POR ABSORCIÓN DE DOS FOTONES: CARACTERIZACIÓN Y CALIBRACIÓN DE UN MICROSCOPIO.

M. G. Capeluto, M. C. Marconi, E. Luzzi, M. G. Crespo

Laboratorio de Electrónica Cuántica. Departamento de Física.
Facultad de Cs. Exactas y Naturales-UBA
Ciudad Universitaria. Pabellón 1. C1428 EHA. Bs. As.

maga@df.uba.ar

Se presenta el desarrollo de un microscopio de fluorescencia por absorción de dos fotones. Se describe el sistema implementado compuesto por el mecanismo de barrido, conformación de la señal y adquisición de imágenes. Se presentan también resultados preliminares en imágenes obtenidas para muestras de calibración. Estas imágenes muestran una resolución lateral mejor que $1\ \mu\text{m}$.

We present the development of a two photon absorption fluorescent microscope. We describe the system composed by the scanning mechanism, the network signal and image acquisition. We present images obtained with calibration samples. These images show a lateral resolution better than $1\ \mu\text{m}$.

1. Introducción

Desde que Denk⁽¹⁾ introdujo el microscopio de fluorescencia por absorción de dos fotones, surgieron numerosos trabajos demostrando que ésta es una herramienta que ofrece una excelente técnica no invasiva para la adquisición de imágenes de muestras orgánicas^(2,3).

Este método de adquisición de imágenes es de gran interés por sus características únicas y su relativa simplicidad. Está basado en la excitación de un colorante mediante dos fotones en un mismo proceso de absorción. Así la longitud de onda de la luz que se utiliza para excitar debe ser el doble que la necesaria para realizar excitación de un fotón.

Es posible excitar a la molécula de colorante mediante la absorción de dos fotones. En este caso, el colorante absorbe simultáneamente dos fotones, siendo la energía de cada uno de ellos insuficiente para causar la transición al estado excitado. Al decaer, la molécula emite un fotón de igual longitud de onda que en la transición normal pero esta vez es más energético que el de excitación.

La absorción de dos fotones ocurre cuando dos fotones, se encuentran simultáneamente en el mismo volumen de absorción. Para que esto suceda, se debe excitar con una fuente de alta potencia, concentrando al haz en un pequeño volumen. Esto se logra entrocando al haz de un láser de Ti:Za pulsado con un objetivo al límite de la difracción.

Como la longitud de onda de excitación debe ser el doble de la necesaria para la absorción normal, en general se utilizan para excitar longitudes de onda en el infrarrojo, obteniéndose alta penetración en tejidos biológicos ($\sim 400\ \mu\text{m}$)⁽⁴⁾. Esta es una de las

ventajas más importantes frente a la microscopia confocal en la cual se utilizan para excitar longitudes de onda en el UV y en el espectro visible. Además el IR cercano, resulta ser menos nocivo para células vivas y permite excitar a fluoróforos cuya transición del estado fundamental al primer estado excitado se encuentra en el ultravioleta. Como ventaja adicional, al no ser necesario el uso de radiación UV, está la posibilidad de reemplazar toda la óptica de cuarzo por óptica regular.

Como la probabilidad de absorción depende de la intensidad de excitación correspondiente a la de un fotón al cuadrado, la excitación se produce sólo en el punto focal en donde la potencia es lo suficientemente alta. Este volumen es típicamente de pocos μm^3 . Como consecuencia, la fluorescencia sólo proviene del punto de enfoque, en contraste con la microscopia confocal en donde la fluorescencia proviene también de las regiones fuera del foco y es filtrada por la apertura confocal. Como consecuencia, se obtiene menor daño en las muestras, menor blanqueo del colorante y mejor relación señal ruido.

Debido a las ventajas mencionadas anteriormente, la microscopia de fluorescencia de dos fotones, permite obtener secciones ópticas de una muestra biológica, sin necesidad de realizar los cortes físicos de la misma (característica por la cual con la microscopia óptica convencional se pudo obtener imágenes tridimensionales revolucionando al campo de microscopias de fluorescencia) y sin el uso de la apertura confocal. En este caso, el uso de longitudes de onda en el IR, para obtener imágenes 3D de mayor profundidad que en la microscopia de fluorescencia confocal.

2. Desarrollo experimental

El microscopio opera en el modo de iluminación desde arriba, y barrido del plano objeto mediante un único haz enfocado al límite de la difracción sobre la muestra. En la figura 1, se muestra un esquema del mismo.

Un láser de Ti:Za, es dirigido por un espejo controlado por un motor a través de un telescopio. El telescopio agranda el tamaño del modo del haz sobre un objetivo de microscopio, el cual lo enfoca sobre una platina motorizada sobre la cual se encuentra la muestra fluorescente. El espejo dichroico que se encuentra en el camino óptico entre el telescopio y el objetivo, tiene la doble función de re-dirigir al haz sobre el objetivo y reflejar sólo la luz de excitación, permitiendo que la fluorescencia llegue al sistema de detección. La fluorescencia es colectada mediante un microscopio formado por una lente y el mismo objetivo que se usa para enfocar al haz de excitación y la dirige hacia el sistema de detección.

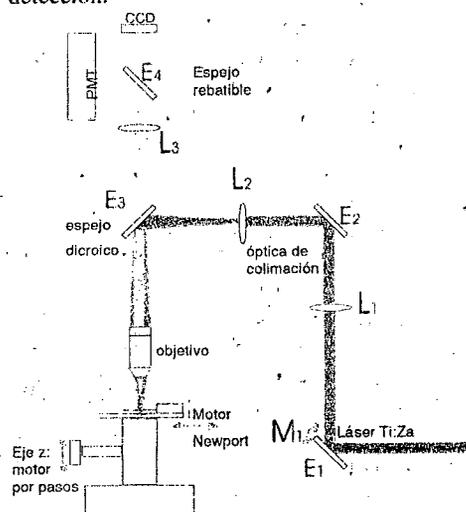


Figura 1: Esquema del microscopio de fluorescencia por absorción de dos fotones.

La medición consiste en realizar un barrido del haz sobre la muestra y, simultáneamente, tomar el registro de la intensidad de fluorescencia punto a punto y una referencia de la posición del haz. Luego se coordinan las mediciones para realizar un mapa de intensidades constituyéndose así la imagen de fluorescencia. El microscopio está compuesto por:

- Fuente de excitación.
- Sistema óptico de alineación y enfoque.
- Sistema de barrido.
- Sistema de detección y adquisición de datos
- Procesado de las mediciones.

a) Fuente de excitación

Como fuente de excitación se utiliza un láser pulsado de Ti:Za mode locking cuya longitud de onda es 800nm (IR cercano), su potencia media es de 0,5-0,4W y emite pulsos con una repetición de 80MHz y un ancho de pulsos del orden de los 50fs.

b) Sistema óptico de alineación y enfoque

El haz del Ti:Za, es dirigido hacia el microscopio mediante una serie de espejos. Alternativamente, se puede utilizar un láser de 532 nm seleccionándolo con un espejo rebatible para obtener imágenes de fluorescencia por absorción de un fotón y por reflexión.

El láser ingresa al microscopio por el espejo E_1 (figura 1), mediante el cual es dirigido a través de un telescopio (lentes L_1 y L_2 , hacia un objetivo de microscopio cuya función es enfocar el haz sobre la muestra.

La función del telescopio es hacer que el modo del haz sea lo más grande posible en el objetivo del microscopio, de tal forma que este pueda ser enfocado al límite de la difracción.

Entre el telescopio y el objetivo, se coloca un espejo dichroico (E_3) que tiene alta reflectividad para 800nm y reflectividad despreciable para el visible.

Una vez enfocado el haz sobre la muestra, la fluorescencia es colectada mediante un microscopio conformado por el objetivo de microscopio y la lente L_3 ; ahora, el espejo dichroico resulta transparente para las longitudes de onda de fluorescencia, que en general se encuentran en el visible. El microscopio, enfoca a la fluorescencia en un fotomultiplicador o alternativamente, seleccionando con espejo rebatible (E_4), en un fotodiodo o en una CCD.

El objetivo es de distancia de trabajo larga, para poder enfocar al haz en un volumen amplio, y apertura numérica grande, como para poder colectar la mayor cantidad de luz posible.

c) Sistema de barrido

El barrido del haz sobre la muestra se logra mediante tres motores por pasos para los tres ejes perpendiculares. El objetivo es barrer planos horizontales (xy) a distintas alturas (z = etc.).

Mediante el espejo E_1 controlado por un motor por pasos (M_1 , figura 1) se hace oscilar al haz sobre la muestra, constituyendo un barrido rápido unidimensional, para una de las direcciones horizontales. Para lograr que el motor por pasos realice un movimiento oscilatorio, se polariza con un generador de funciones (Hewlett Packard 33120A) y una fuente de tensión continua construida en el laboratorio. Las otras dos direcciones se logran

moviendo la platina del microscopio con un motor Newport (para la otra dirección horizontal) y un motor por pasos (para la dirección vertical). Ambos motores son controlados mediante la PC, por un controlador de movimientos Newport ESP 300.

Si se compone el movimiento del eje rápido y el barrido en el eje y lineal, se obtiene que el haz describe un movimiento aproximadamente senoidal sobre la muestra.

d) Sistema de detección y preparación de señales.

Como se mencionó anteriormente, la medición consiste en adquirir simultáneamente la intensidad de fluorescencia y una referencia de la posición del haz sobre la muestra.

La detección de la intensidad de fluorescencia se realiza con un fotomultiplicador (PMT) con respuesta espectral en el visible, con alta eficiencia cuántica y con baja corriente en oscuro.

Para realizar la detección de la referencia de posición del haz utiliza un sensor de posición por sombra. Este sensor consta de un diodo láser que ilumina a un fotodiodo en el cual se hace sombra con un filo adosado al eje del motor oscilante. La señal en el mismo sigue a la posición senoidal del espejo, de forma tal que se pueden localizar los extremos del barrido del eje rápido.

Ambas señales se adquieren simultáneamente con una placa contadora PCI 6602 National Instrument.

Típicamente, estas señales son de baja amplitud (del orden de pocos mV). Debido a que la placa sólo admite pulsos cuadrados de amplitud entre 2,5V y 5V, no se puede hacer una adquisición directa de las señales sino que hay que realizar un procesado previo conformándolas y amplificándolas.

Funcionamiento de la placa PCI 6602 en modo de contadora

La placa PCI 6602 es un Timing and digital I/O que se usa con el bus PCI de la computadora. Esta placa tiene ocho contadores con resolución de 8 bits y más de 32 líneas para configurar independientemente, TTL-CMOS compatible digital I/O. Es completamente configurable mediante soft y no requiere controladores DMA desde la PC. La mayoría de sus funciones son manejadas desde el NI-TIO, un sofisticado, state-of-the-art counter y digital I/O ASIC. La placa PCI 6602 tiene dos NI-TIO y tres relojes internos de 100kHz, 20MHz y 80 MHz.

Cada contador tiene tres entradas (Source, Gate, Up/Down) que se pueden usar

con señales externas o internas, y una salida (Out) para generar señales.

Existen múltiples formas de funcionamiento de los contadores. En este caso se elige adquirir almacenando continuamente en el buffer, puesto que el barrido continuo del plano objeto produce la llegada continua de los fotones al PMT y que se desea detectar la posición del motor en cada instante. Las mediciones con almacenado continuo en el buffer, generan una corriente de datos que es transferida a la PC mediante DMA o interruptores. Se pueden hacer múltiples mediciones simultáneas. Arriba de tres pueden ser transferidas por el DMA. El modo de interrupción es usado para transferir cualquier dato adicional. La tasa máxima de transferencia depende del sistema (PC).

Para realizar la medición se utiliza como SOURCE a la señal que se desea medir y como GATE una señal que indica cual es la ventana temporal en la que se cuentan los eventos.

La señal de GATE es una señal TTL para la cual se puede elegir la frecuencia y duty cycle. Cada periodo de la señal de GATE es una ventana temporal del contador. El contador mide entonces, cuantos flancos ascendentes de la señal de entrada (SOURCE) hay en cada periodo de GATE, por lo tanto, cada periodo representa un píxel. El resultado de la medición en cada periodo es almacenado en el Hardware Save Register en cada intervalo activo del GATE. El contador comienza a contar cuando es armado

Procesado de la señal de intensidad en el fotomultiplicador.

Si se mide la señal en el PMT, se observa que son pulsos negativos, de amplitud aproximadamente 70mV y de ancho aproximado 100ns. Para que estos pulsos puedan ser medidos con la contadora, deben ser positivos y con tensiones del orden de los 3V. Esta condición no es suficiente en el caso de la señal de intensidad debido a que espera que los fotones lleguen al PMT con altas frecuencias (del orden de los MHz).

El circuito eléctrico se debe diseñar de modo tal que el ancho de los pulsos conformados sea menor o igual que el ancho de los pulsos de corriente que genere el PMT.

Una vez que se procesan las señales con los circuitos eléctricos, se miden simultáneamente con la placa PCI 6602 en su funcionamiento como contadora.

Para esto se usan tres canales de la placa, el counter(0) y el counter(1) para medir la intensidad y la posición respectivamente y el counter(2) como generador de gate,

e) Procesado de las mediciones

La placa PCI 6602 en su funcionamiento como placa contadora, mide cuántos flancos ascendentes de pulsos cuadrados hay en cada período de la señal de gate. En particular, en este trabajo se eligió como señal de gate una señal TTL con duty cycle de 50%.

La medición consiste en adquirir simultáneamente la intensidad de fluorescencia y una referencia de la posición del haz sobre la muestra durante el barrido de todo un plano. Como resultado de medir con la placa PCI 6602 se obtienen dos vectores que se corresponden temporalmente y tienen la información de todo el plano: uno de intensidad y el otro con las referencias de la posición.

Esta manera de medir no traerá ninguna consecuencia relevante en la adquisición de la señal de intensidad puesto que los pulsos son mucho más angostos y más frecuentes que la señal de gate, por lo tanto el error será a lo sumo uno en varias centenas de cuentas de intensidad.

En cambio sí será notable en la medición de la referencia de posición. Debido a que los pulsos de esta señal son mucho más anchos y menos frecuentes que los del gate, al medir sólo los flancos ascendentes, lo que verdaderamente se estará midiendo es un flanco desplazado hacia atrás en medio ancho de pulso de la señal conformada respecto al máximo de la señal verdadera, cuando en realidad lo que se quiere medir es la posición de los máximos y mínimos. O¹ servir que un flanco en un período de gate, representa un uno en el vector de mediciones.

Para solucionar este problema se necesita también medir el ancho de pulso de la señal. Para esto se utiliza un cuarto canal de la contadora (counter (3)), con una subrutina incluida en el software del microscopio que mide anchos de pulso. Esta subrutina es un ejemplo prediseñado de LabView, que mide cuántos pulsos de una TTL de 20 MHz entran en el pulso a medir. Como consecuencia, este programa servirá si el ancho de pulso es mucho mayor que $0,05 \mu s$. En el caso de la señal de posición, que no tendrá una frecuencia mayor a 10 Hz ésta condición, está ampliamente superada.

Una vez medido mediante la PC el ancho de los pulsos y las señales, se realiza el procesado de las mediciones para conformar a la imagen.

Conformar a la imagen significa que, dado el vector de intensidades, el vector de referencia de posición y el semiancho de los pulsos, hay que armar una matriz donde cada sitio represente una posición del plano y el valor numérico de cada sitio una intensidad. Como se

adquirieron simultáneamente la posición y la intensidad, cada máximo y mínimo de la posición (extremo de barrido) delimita en el vector de intensidad un barrido, que es una columna de la matriz. Por lo tanto se necesita:

- Calcular a partir del vector de flancos ascendentes y el ancho de los pulsos, el vector que contenga la información de los máximos y los mínimos.
- Cortar al vector de intensidad en los máximos y los mínimos y armar la matriz.

Para el cálculo del vector que tiene la información de los máximos y los mínimos, se considera que los mínimos se encuentran en el punto medio entre los máximos. Como consecuencia, si se calcula el vector de flancos ascendentes y los puntos medios entre flancos ascendentes, se obtiene como resultado un vector desfasado hacia atrás en medio ancho de pulso de señal conformada. Por lo tanto, para obtener el vector de máximos y mínimos basta con sumarle a cada flanco y punto medio, medio ancho de pulso.

Una vez obtenido el vector con los extremos del barrido, se conoce cuales son los segmentos del vector de intensidad que corresponden a cada ida o vuelta del haz sobre la muestra en la dirección del eje rápido. La matriz de intensidades se arma ubicando a los segmentos invertidos o no según se trate de una ida o una vuelta.

3. Resultados

El microscopio se usó para obtener imágenes de calibración y muestras fluorescentes. En el primer caso usamos una regla de vidrio con líneas espejadas de $20 \mu m$ separadas $20 \mu m$ entre sí. Con esta muestra de calibración se trabajó haciendo reflejar el haz en cada segmento espejado. La imagen de la regla de calibración puede observarse en la figura 2a.

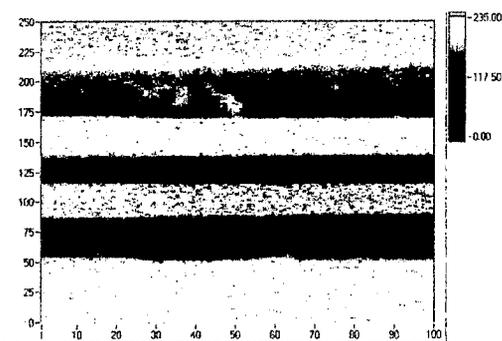


Figura 2a: Imagen de la regla de calibración obtenida por reflexión.

Es notorio que debido al movimiento senoidal

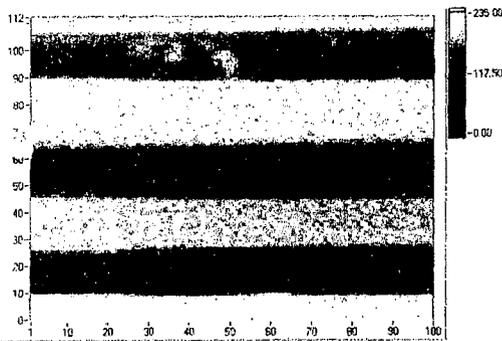


Figura 2b: Imagen corregida de la regla de calibración obtenida por reflexión

del haz sobre la muestra, la imagen aparece deformada en los extremos (superior e inferior de la imagen).

Esto se puede corregir a través de la curva de calibración. Con esta corrección la imagen que se obtiene es la que muestra la figura 2b. Midiendo la nitidez del borde de la franja espejada evaluamos que el microscopio tiene una resolución lateral de aproximadamente $1\mu\text{m}$.

También hemos realizado imágenes sobre muestras fluorescentes. La figura 3 muestra una imagen de fluorescencia por absorción de dos fotones obtenida en una muestra de cristales de Coumarina. Esto muestra la factibilidad de usar este instrumento para adquirir imágenes de alta resolución en muestras biológicas teñidas.

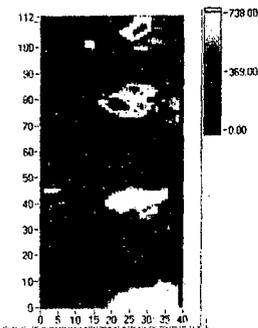


Figura 3: Imagen de fluorescencia de cristales de Coumarina obtenida por absorción de dos fotones. Las escalas de los ejes están en micrones.

4. Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con subsidio de la universidad de Bs. As. X216 y un subsidio de la ANPCyT PICT 03-6303. M.C.M. pertenece a la carrera de investigador de CONICET. M.G.C. es becaria del Proyecto UBA-Techint.

5. Referencias

1. Denk W., Strickler J., Webb WW. "Two photon laser scanning fluorescence microscopy". *Science*; **248**,73-6,1990
2. Häminen P.E., Soini E., Hell S. W. "Continuous wave excitation two-photon fluorescence microscopy" *Journal of Microscopy*. **176**, 222, 1994.
3. Ki Hean Kim, Christov Buehler, Peter T. C. So. "High- seed, two-photon scanning microscope". *Applied Optics*. **38**, 6004, 1999.
4. Daria V., Nakamura O. Palmes-Saloma C. y Kawata S. "Enhanced depth penetration in imaging of turbid biological samples by two photon fluorescence microscopy". *Jpn Journal Appl. Phys.* **37**, 959, 1998.