

# Integração de técnicas de microscopia óptica não linear em uma plataforma multimodal para aplicações biológicas

**Palavras-Chave:** Microscopia Óptica, Óptica não linear, Materiais Biológicos.

**Autores(as):**

**MARIA LUIZA CARREIRA LIMA, IFGW – UNICAMP**

**SARAH CARDOSO MACHADO, IB – UNICAMP**

**Dr<sup>a</sup>. ALINE SIQUEIRA-BERTI, IB – UNICAMP**

**Me. ANTONIO THIAGO PEREIRA CAMPOS, FÍSICA - UFC**

**PROF. Dr. HERNANDES FAUSTINO DE CARVALHO (ORIENTADOR), IB – UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO

Há uma necessidade crescente na comunidade biomédica pelo desenvolvimento de novas técnicas minimamente invasivas que possibilitem a visualização de interações celulares e morfologia tecidual em tempo real sem a necessidade de marcadores com resolução subcelular para a análise de processos metabólicos e patológicos. As técnicas de microscopia óptica são atualmente as únicas ferramentas capazes de fornecer essas características, destacando-se como essenciais para avanços na compreensão diversos processos biológicos.

Nas últimas duas décadas, a microscopia óptica não linear (NLOM), incluindo *Two-Photon Excitation Fluorescence* (TPEF), *Second Harmonic Generation* (SHG) e a *Third Harmonic Generation* (THG), tem sido amplamente utilizada no estudo de materiais biológicos. Estas técnicas, empregadas no presente trabalho, oferecem vantagens significativas, são minimamente invasivas e não destrutivas, além de possuírem alta profundidade de penetração tecidual. A NLOM também proporciona capacidade de seccionamento óptico 3D intrínseco com resolução subcelular, podendo ser aplicada tanto em amostras marcadas quanto não marcadas<sup>1</sup>.

Os processos ópticos não lineares ocorrem predominantemente em regimes de alta intensidade. Esses fenômenos ópticos não lineares exigem coincidência temporal e espacial de dois ou mais fótons, uma condição que se tornou mais facilmente realizável com o desenvolvimento de lasers pulsados de femtossegundos e picossegundos. Esses avanços tecnológicos permitiram a observação e o estudo dos efeitos não lineares em diversos materiais biológicos ao mesmo tempo preservando a viabilidade tecidual e celular.

Em termos de polarização, os processos lineares resultam em uma polarização linear que é diretamente proporcional ao campo elétrico aplicado  $\vec{P}_L = \epsilon_0 \chi^{(1)} \cdot \vec{E}$ . Por outro lado, os processos não

lineares dependem de outras potências do campo elétrico  $\vec{P}_{NL} = \varepsilon_0 \left[ \chi^{(2)} : \vec{E}\vec{E} + \chi^{(3)} : \vec{E}\vec{E}\vec{E} + \dots \right]$ . Quando a intensidade do campo elétrico é suficientemente alta, mas ainda dentro do limite do breakdown óptico do material, a polarização total pode ser descrita como uma série convergente que é a soma das contribuições da polarização linear e não linear  $\vec{P} = \vec{P}_L + \vec{P}_{NL} = \varepsilon_0 \left[ \chi^{(1)} \cdot \vec{E} + \chi^{(2)} : \vec{E}\vec{E} + \chi^{(3)} : \vec{E}\vec{E}\vec{E} + \dots \right]$ <sup>1</sup>.

Onde a susceptibilidade de primeira ordem  $\chi^{(1)}$  é responsável pelos fenômenos ópticos lineares observados no cotidiano, tais como espalhamento, refração e absorção. A susceptibilidade de segunda ordem  $\chi^{(2)}$  está relacionado ao processo SHG, Sum Frequency Generation (SFG) e Difference Frequency Generation (DFG). Adicionalmente, a susceptibilidade de terceira ordem  $\chi^{(3)}$  está ligado aos processos TPEF, THG, Stimulated Raman Scattering (SRS) e Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS).

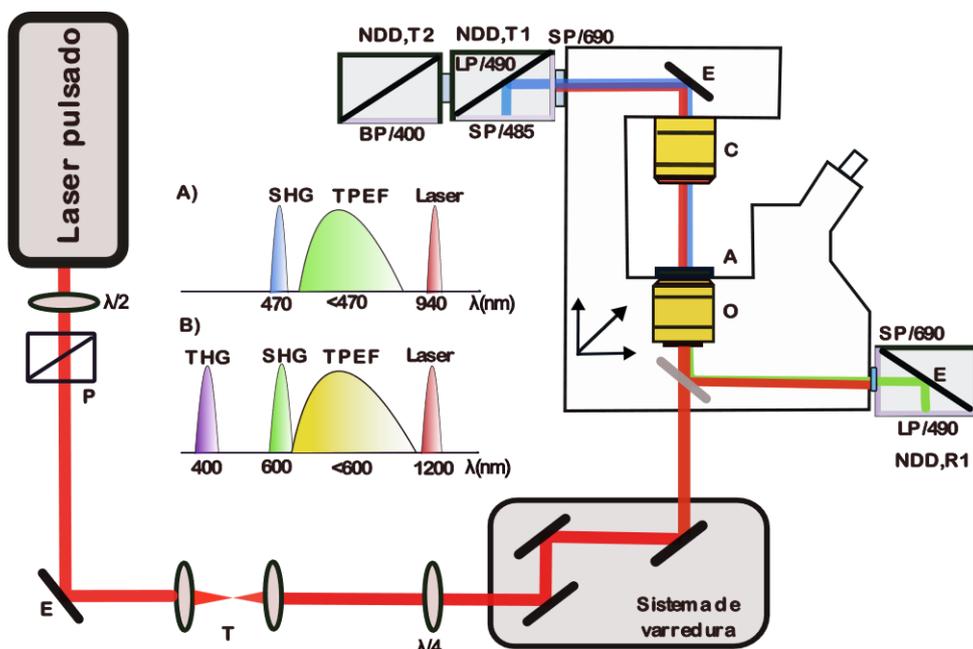
A técnica SHG é um processo coerente e elástico em que dois fótons de mesma frequência  $\omega$  são convertidos em um fóton com o dobro da frequência  $2\omega$ , ou metade do comprimento de onda de excitação. Este processo ocorre apenas em estruturas que não possuem simetria de inversão e que apresentam uma organização espacial dos dipolos elétricos característica da suscetibilidade de segunda ordem  $\chi^{(2)}$ . Na biologia, o sinal SHG é gerado de maneira específica e seletiva em fibras de colágeno tipo I e II, miosina e microtúbulos<sup>2</sup>. Essa seletividade tem aberto caminho para pesquisas biomédicas utilizando microscopia SHG, sendo aplicada em diversos estudos, entre eles, câncer<sup>3</sup>, fibrose<sup>4</sup>, divisão celular<sup>5</sup>, envelhecimento da pele<sup>6</sup>, entre outros.

O processo THG é um fenômeno coerente e elástico, no qual três fótons de mesma frequência  $\omega$  são convertidos em um único fóton com o triplo da frequência  $3\omega$ , ou com um terço do comprimento de onda de excitação. O sinal de THG é sensível a variações locais na susceptibilidade de terceira ordem, índice de refração e dispersão. Essa técnica possui contraste aprimorado em interfaces e inhomogeneidades ópticas de tamanho comparável ao foco do feixe<sup>7</sup>. Tais características têm sido utilizadas para mapear gotículas de lipídios<sup>7</sup>, estruturas mineralizadas e materiais absorvedores<sup>8</sup>, o que tem possibilitado a obtenção de imagens morfológicas de tecidos biológicos e pequenos organismos.

O objetivo deste trabalho é integrar as técnicas de TPEF, SHG e THG em uma única plataforma de microscopia óptica. Essa integração visa permitir a exploração simultânea de corpos lipídicos, matriz extracelular e componentes endógenos autofluorescente, bem como de marcadores fluorescentes exógenos. A plataforma de microscopia óptica será utilizada para realizar observações em tempo real de diferentes tipos de tecidos, proporcionando uma análise detalhada e precisa de estruturas biológicas e seus processos dinâmicos.

## METODOLOGIA

Figura 1- Sistema experimental.  $\lambda/2$ : Placa de meia de onda, P: Polarizador, E: Espelho, T: Telescópio,  $\lambda/4$ : Placa de um quarto de onda. O: Objetiva, A: Amostra, C: Condensador, SP: ShortPass, BP: BandPass, LP: LongPass. A) Diagrama do sinal SHG e TPEF excitado com comprimento de onda 940 nm. B) Diagrama do sinal THG, SHG e TPEF no comprimento de onda de excitação em 1200 nm.



As técnicas TPEF, SHG e THG foram obtidas

utilizando um microscópio confocal LSM 780-NLO Zeiss invertido Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss AG, Alemanha) no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC), localizado na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo. Para excitar as amostras biológicas, foi utilizado o sistema Chameleon Discovery NX (Coherent Inc., Santa Clara, Califórnia), que possui duas saídas de laser: um feixe de 100 fs com taxa de repetição de 80 MHz, sintonizável no comprimento de onda de 660 a 1320 nm, integrado com um pré-compensador de dispersão de velocidade de grupo (GDD), e outro feixe de 140 fs com taxa de repetição de 80 MHz e comprimento de onda fixo em 1040 nm.

O laser foi direcionado por um conjunto de espelhos até a entrada do microscópio e focalizado por uma objetiva de imersão a óleo EC Plan-Neofluar 40x/1.3 (Carl Zeiss AG, Alemanha). Todas as imagens de TPEF e SHG foram obtidas simultaneamente, utilizando um comprimento de onda de excitação de 940 nm, enquanto o sinal THG foi excitado com um comprimento de onda de 1200 nm. O sinal SHG foi coletado no modo transmitido por um condensador de 0.55 NA-WD 26 mm (Carl Zeiss AG, Alemanha) e detectado no detector non-descanned transmitido (NDD,T) após passar por um cubo de filtro contendo um filtro SP/485. O sinal de fluorescência TPEF foi obtido no modo refletido no detector non-descanned (NDD,R), passando por um cubo de filtro contendo um espelho (Carl Zeiss, 1512-461) e um filtro LP/490.

O THG foi adquirido excitando a amostra com comprimento de onda de excitação de 1200 nm, usando o mesmo caminho óptico do sinal SHG, substituindo apenas o filtro SP/485 por um filtro bandpass BP/400-20. Todas as imagens foram adquiridas com resolução espacial de 1024x1024 pixels (215x215  $\mu\text{m}$ ), com duração por pixel de 3,15  $\mu\text{s}$  e tempo total de varredura de 7,75 s.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 2, destacamos os resultados obtidos no microscópio NLO usando as técnicas TPEF/SHG/THG em diferentes tecidos biológicos. Os sinais TPEF e SHG evidenciam, respectivamente, a morfologia do tecido através da autofluorescência e proteínas estruturais, como fibras de colágeno e miosina. Enquanto isso, o sinal THG fornece informações sobre núcleos e estruturas ricas em lipídeos, como a membrana plasmática. O SHG é particularmente útil para fornecer informações sobre a matriz extracelular sem a necessidade de marcadores, proporcionando insights valiosos em estudos relacionados à tumorigênese/metástase<sup>3</sup>, fibrose<sup>4</sup> e fotoenvelhecimento da pele<sup>6</sup>.

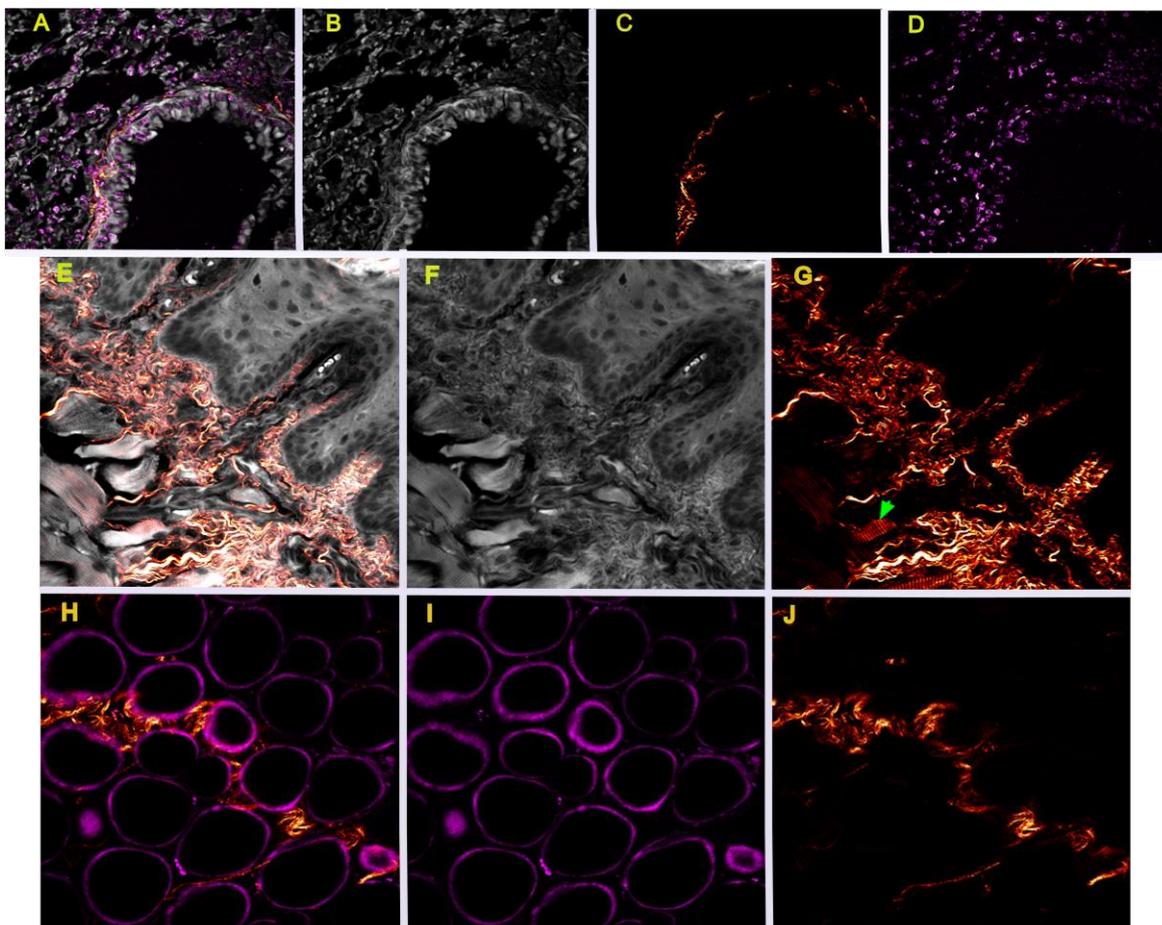


Figura 2- Corte de tecido do pulmão de camundongo: (A) Imagens sobrepostas dos sinais TPEF+SHG+THG (B) Morfologia do tecido com a técnica TPEF (C) Fibras de colágeno visualizadas com a técnica SHG (D) Núcleos das células marcado com hematoxilina visualizadas com a técnica THG. Corte de língua de camundongo (E) Imagens sobrepostas das técnicas TPEF+SHG (F) Morfologia do tecido usando a técnica TPEF – Epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, lâmina própria constituída de tecido conjuntivo (G) Fibras de colágeno e miosina (indicado pela seta verde) usando a técnica SHG. Corte de tecido adiposo de camundongo (H) Imagens sobrepostas dos sinais SHG+THG (I) Interface de adipócitos (membrana) usando a técnica THG (J) Fibras de colágeno usando a técnica SHG. As cores magenta, cinza, vermelho hot são pseudo cores.

A detecção do sinal THG possibilita a observação de eventos como a formação da membrana celular de embriões do peixe-zebra (*Danio rerio*) durante o desenvolvimento embrionário<sup>5</sup>, bem como a visualização de gotículas de lipídios em hepatócitos<sup>7</sup>, entre outros fenômenos. Estudos mostraram que seções histológicas de tecidos corados com hematoxilina e eosina (H&E), onde a hematoxilina destaca os núcleos celulares e a eosina realça a matriz extracelular, podem ser reaproveitadas para a visualização dos sinais (TPEF, (SHG) e THG<sup>9</sup>. A coloração com H&E preserva as fibras de colágeno,

com o sinal TPEF derivado da fluorescência da eosina, enquanto o THG entra em ressonância com a hematoxilina, demarcando os núcleos celulares<sup>10</sup>.

As técnicas TPEF, SHG e THG podem ser obtidas simultaneamente em diferentes canais e quantificadas separadamente, proporcionando uma compreensão mais detalhada do tecido e fornecendo informações subjacentes à progressão de doenças. Essas técnicas emergem como uma alternativa complementar à técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E), considerada o "padrão ouro" na patologia. Em um estudo conduzido por Javier e colaboradores, a combinação das técnicas TPEF, SHG e THG possibilitou a obtenção de informações detalhadas sobre a interface entre o estroma e o epitélio, permitindo a diferenciação entre tecido ovariano normal e tecido cancerígeno<sup>9</sup>.

## CONCLUSÃO

As técnicas TPEF, SHG e THG são abordagens não invasivas especialmente valiosas no campo da biomedicina. Estas metodologias têm demonstrado um potencial promissor, devido sua capacidade de fornecer imagens detalhadas de estruturas biológicas, mantendo à integridade dos tecidos. O desenvolvimento e a aplicações dessas técnicas avançadas possuem o potencial de expandir significativamente nosso entendimento dos processos celulares e moleculares, além de contribuir para o avanço no diagnóstico e tratamento de diversas doenças.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adur, J., Carvalho, H. F., Cesar, C. L. & Casco, V. H. Nonlinear Microscopy Techniques: Principles and Biomedical Applications. in *Microscopy and Analysis* (2016). doi:10.5772/63451.
2. Campagnola, P. Second harmonic generation imaging microscopy: Applications to diseases diagnostics. *Anal Chem* (2011) doi:10.1021/ac1032325.
3. Keikhosravi, A., Bredfeldt, J. S., Sagar, A. K. & Eliceiri, K. W. Second-harmonic generation imaging of cancer. in *Methods in Cell Biology* (2014). doi:10.1016/B978-0-12-420138-5.00028-8.
4. Strupler, M. *et al.* Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Opt Express* (2007) doi:10.1364/oe.15.004054.
5. Olivier, N. *et al.* Cell lineage reconstruction of early zebrafish embryos using label-free nonlinear microscopy. *Science* (1979) **329**, (2010).
6. Yasui, T., Takahashi, Y., Ito, M., Fukushima, S. & Araki, T. Ex vivo and in vivo second-harmonic-generation imaging of dermal collagen fiber in skin: Comparison of imaging characteristics between mode-locked Cr:forsterite and Ti:Sapphire lasers. *Appl Opt* (2009) doi:10.1364/AO.48.000D88.
7. Débarre, D. *et al.* Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy. *Nat Methods* **3**, (2006).
8. Kazarine, A., Gopal, A. A. & Wiseman, P. W. Nonlinear microscopy of common histological stains reveals third harmonic generation harmonophores. *Analyst* **144**, (2019).
9. Yu, C.-H. *et al.* Molecular third-harmonic-generation microscopy through resonance enhancement with absorbing dye. *Opt Lett* **33**, (2008).
10. Adur, J. *et al.* Second harmonic generation microscopy as a powerful diagnostic imaging modality for human ovarian cancer. *J Biophotonics* **7**, (2014).