

MICROSCOPIA 3D POR BARRIDO ORBITAL Y MODULACIÓN RADIAL

3D MICROSCOPY BY ORBITAL RADIALLY MODULATED SCAN

C. Zaza^a, M. Gabriel^{a,b}, L. C. Estrada^{a,b,*}

a Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires,
b IFIBA-CONICET, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina.

Recibido: 03/01/18; aceptado: 06/04/18

En este trabajo presentamos la implementación de un novedoso método de microscopía 3D basado en el barrido orbital de un haz de excitación alrededor de la estructura de interés. Esta tecnología es capaz de producir imágenes tridimensionales de estructuras en movimiento con resolución nanométrica y en pocas decenas de milisegundos. Dado que la intensidad de luz emitida por un objeto fluorescente depende fuertemente de la distancia entre el haz de excitación y la superficie del mismo, modulando la distancia haz-objeto, y conociendo el perfil del haz de excitación, es posible recuperar la forma del objeto de interés a partir la señal de fluorescencia colectada. El método de nSPIRO (nanoScale Precise Imaging by Rapid beam Oscillation) utiliza la oscilación rápida (en los milisegundos) de una haz de luz enfocado alrededor del objeto para obtener una respuesta oscilatoria cuya amplitud depende únicamente de la distancia a la superficie del objeto. En este trabajo mostramos simulaciones numéricas que permiten evaluar el alcance y las limitaciones del método, mostramos su implementación en un microscopio por absorción de dos fotones, y finalmente lo aplicamos al estudio de raíces de *Arabidopsis Thaliana* en condiciones fisiológicas.

Palabras clave: microscopía, fluorescencia, seguimiento de partículas individuales.

In this work, we present an alternative imaging method based on the orbital scanning of a laser excitation beam around the object of interest. This technology is capable of producing tridimensional images of fluorescent structures with nanometrical resolution in a few milliseconds. The method relies on the fact that when the excitation beam is near a fluorescent object, the emitted light from the object depends on the distance between its surface and the excitation beam. By modulating the distance between the beam and the object and taking into account the nonlinearity of the excitation intensity profile, it is possible to obtain an oscillating response whose amplitude depends only on the distance to the surface of the object. Given the fact that the excitation beam is always near the structure of interest, it is possible to measure moving specimens. Here, we present tridimensional reconstructions of *Arabidopsis Thaliana* roots which are $\sim 50 \mu\text{m}$ in length and $\sim 5 \mu\text{m}$ in diameter.

Keywords: microscopy, fluorescence, single particle tracking.

I. INTRODUCCIÓN

Muchos de los estudios que componen el conocimiento que se tiene hoy en día sobre los mecanismos biológicos que subyacen las funciones celulares fueron desarrollados en dos dimensiones bajo la hipótesis fuerte de que el comportamiento bidimensional *in vitro*, reproduce el comportamiento tridimensional *in vivo*. Poco tiempo hizo falta para detectar que el cambio dimensional afecta notoriamente la morfología celular, la diferenciación celular¹, el metabolismo de algunas drogas, y la expresión de genes y proteínas, entre otras importantes funciones^{1,2}. Trabajos recientes han demostrado que el crecimiento celular en tres dimensiones reduce significativamente las diferencias entre los cultivos celulares y los tejidos vivos^{3,4,5}. Por todo esto, uno de los grandes desafíos del último tiempo en el área de las microscopías se centra en el desarrollo de técnicas que permitan obtener una visualización de micro(nano)-objetos en tres dimensiones. En este marco nacen las microscopías en tres dimensiones. Para un resumen actual del estado del arte en algunas de las microscopías en 3D puede consultarse la referencia citada⁶.

Por citar solo un ejemplo, uno de los métodos que se utilizan más habitualmente para visualizar un objeto en tres dimensiones (3D) están basados en la adquisición secuencial de imágenes tomadas en distintos planos del objeto de interés y una posterior reconstrucción computacional de la estructura. Este

proceso es, en general, extremadamente lento dado que necesita de varias imágenes del mismo objeto. Para obtener estas imágenes, las técnicas más comúnmente utilizadas son: a partir de una cámara, o bien con un microscopio de barrido. En los microscopios el barrido, el movimiento del haz sobre la muestra se realiza utilizando dos espejos. El cambio en la posición de los espejos se traduce en un movimiento de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo del haz de excitación. De este modo, el haz recorre líneas horizontales sucesivas de manera de cubrir toda el área de interés. Este tipo de barrido, si bien es por lejos de los más habituales para reconstruir una imagen, presenta limitaciones importantes cuando lo que se pretende visualizar se encuentra en movimiento. En este tipo de barridos, la eficiencia definida como la razón entre el tiempo que el haz de excitación se encuentra sobre el objeto de interés y el tiempo total del barrido, es muy pobre y decrece aún más en el caso de querer obtener una imagen tridimensional. Para sobrepasar estas limitaciones, en este trabajo implementamos nSPIRO (nanoScale Precise Imaging by Rapid beam Oscillation) en el microscopio por absorción de dos fotones construido en el Laboratorio de Electrónica Cuántica, DF-FCEyN-UBA.

Los orígenes de nSPIRO se remontan al 2004 cuando Kis-Petikova y Gratton introdujeron la técnica de seguimiento de partículas únicas por barrido orbital⁷. Más de 10 años después nace el método nSPIRO^{8,9} que si bien está íntimamente ligado al concepto de

* lestrada@df.uba.ar

seguimiento de partículas por barrido orbital descrito en 7 hace uso de dos nuevos conceptos: la **modulación orbital** y la **modulación radial** del haz de excitación. Sin pretender hacer aquí una descripción detallada de la teoría detrás del método, en lo sucesivo haremos una muy breve presentación de las ideas principales para luego hacer hincapié en los resultados obtenidos.

II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Seguimiento de partículas por barrido orbital

La descripción detallada del principio de funcionamiento del método puede encontrarse en la literatura citada^{8,9} y está fuertemente ligada al concepto de seguimiento de partículas individuales por barrido orbital⁷ que a continuación describiremos brevemente.

En un experimento de seguimiento de partículas por barrido orbital, dos espejos galvanométricos se utilizan para controlar la posición del láser de excitación sobre la muestra. Alimentando los espejos con funciones senoidales de amplitud y fase relativa correcta, es posible realizar barridos circulares del haz de excitación alrededor del objeto que se quiere seguir (llamaremos “órbita” a este barrido circular). El objeto a seguir debe emitir algún tipo de señal en respuesta a la excitación recibida. Para hacer una descripción más sencilla del método, en lo sucesivo supondremos que se trata de un objeto fluorescente (la técnica puede aplicarse análogamente monitoreando la señal de segunda armónica, el *scattering* del objeto, entre otras señales). Una descripción esquemática del principio de funcionamiento del método de seguimiento por barrido orbital se muestra en la Fig. 1. Si la partícula (círculo amarillo en la Figura 1) se encuentra centrada con respecto a la órbita que realiza el haz de excitación (la órbita está indicada en línea roja), la señal de fluorescencia medida a lo largo de la órbita será la misma en todos los puntos (para todos los ángulos) y, por lo tanto, la intensidad a lo largo de la órbita será constante (Fig.1a). En cambio, si la partícula está desplazada del centro de la órbita, la intensidad de fluorescencia medida a lo largo de la órbita tendrá un máximo para el ángulo en el que se encuentra desplazada la partícula y la intensidad se verá modulada (Fig.1b).

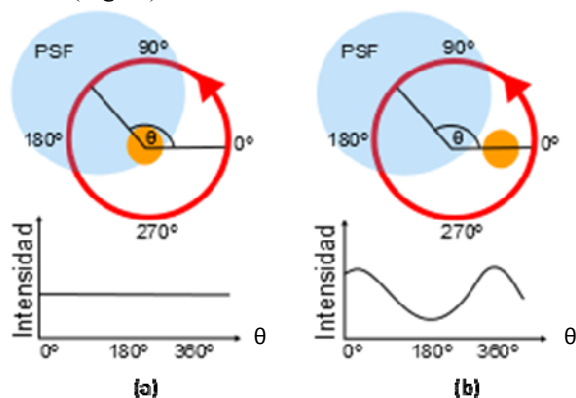


Figura 1: Seguimiento de una partícula a partir de un barrido orbital del haz de excitación. (a): La partícula centrada en la órbita da lugar a una intensidad medida constante a lo largo de la órbita. (b): La partícula desplazada respecto del centro de la órbita da lugar a una modulación en la intensidad. Midiendo la intensidad a lo

largo de la órbita es posible determinar la posición de la partícula.

Como ya describimos, la modulación de la señal de fluorescencia aumenta cuanto más lejos del centro de la órbita se encuentra la partícula (considerando siempre a la partícula dentro de la órbita), de modo que es posible definir una magnitud que relacione la amplitud de la modulación de la intensidad de fluorescencia medida con la distancia de la partícula al centro de la órbita. Llamamos a esta magnitud **modulación orbital de la fluorescencia**. Mientras que la amplitud de la modulación orbital da información sobre la distancia partícula-centro de la órbita, la fase (el ángulo) indica la dirección en la cual se encuentra desplazada la partícula. Siguiendo la deducción detallada en^{8,9}, una aproximación a primer orden de la función de modulación orbital puede expresarse como:

$$\text{mod}(\theta) \approx 4 \frac{Ar}{w_0^2} = kr \quad (1)$$

donde A es el radio de la órbita que realiza el haz de excitación, w_0 el tamaño de la cintura del haz enfocado (o PSF en la Fig. 1) y r es la distancia de la partícula al centro de la órbita. Como se desprende de la ecuación 1, la modulación orbital es lineal con la distancia de la partícula a la órbita. De este modo, la modulación orbital de la señal medida a lo largo de una órbita, permite determinar la posición de la partícula con una resolución temporal determinada por el tiempo que le toma al haz hacer una órbita completa, típicamente pocos milisegundos. Luego, re-centrando la nueva órbita en la posición encontrada para la partícula en la órbita anterior es posible determinar la trayectoria de la partícula en dos e incluso en tres dimensiones como ha sido demostrado previamente^{10,11}.

Hasta ahora, en esta descripción, se consideró el caso donde las dimensiones del objeto a seguir son pequeñas comparadas con las del haz enfocado (aproximación de objeto puntual). Un caso más general sería considerar un objeto cuyo tamaño es comparable al del haz de excitación. Consideremos por simplicidad un objeto de sección circular, en este caso la función de modulación orbital puede expresarse como:

$$\text{mod}(\theta) \approx 4 \frac{(A-a)}{w_0^2} r_{CM} \quad (2)$$

donde al igual que antes A es el radio de la órbita que realiza el haz de excitación, w_0 el tamaño del haz enfocado, r_{cm} es la posición del centro de masa del objeto y a es el radio del objeto. La deducción detallada de estas expresiones está dada en la referencia citada⁸.

Determinación de la forma de un objeto

En el caso de objetos “grandes”, esta idea se puede extender a la de determinar la distancia relativa de la superficie del objeto al centro de la órbita. Esto se puede lograr realizando una órbita de radio variable como se muestra esquemáticamente en la Fig. 2. En este caso, el haz del láser realiza alrededor del objeto una órbita de radio variable entre un valor mínimo y uno máximo (curva roja de la Fig. 2).

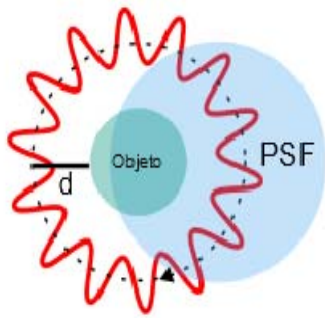


Figura 2: Objeto de radio a , dentro de una órbita de radio medio A con una variación radial de ΔA . El parámetro d es la distancia desde el radio medio a la superficie del objeto de interés.

Supongamos primero un ángulo fijo del haz de excitación. En ese caso, el movimiento radial del haz producirá una variación de la intensidad de luz colectada como consecuencia del acercamiento y alejamiento del haz a la superficie del objeto. Como consecuencia de esto, la intensidad de fluorescencia tendrá una respuesta que dependerá de la distancia local del centro del haz a la superficie del objeto. Es de esperar que cuando la iluminación se aproxima a la superficie del objeto, la intensidad de luz colectada aumente mostrando un patrón de modulación que dependa de la distancia local a la superficie del objeto. Con este efecto en mente definimos una nueva magnitud a la que llamaremos **modulación radial de la fluorescencia**⁸ que nos permitirá cuantificar la distancia de la superficie del objeto a la órbita. La modulación radial se define como el cociente entre la derivada espacial de la intensidad y la intensidad medida como se muestra en la expresión 3:

$$\text{mod}_r = \left| \frac{\Delta I}{I} \right| \approx \left| \frac{\partial I}{\partial r} \frac{\Delta A}{I} \right| \quad (3)$$

Para ganar intuición sobre esta nueva magnitud, en la Figura 3 se muestra la modulación radial calculada (curva verde) en función de la distancia de la órbita media a la superficie del objeto, utilizando la expresión 3. En la figura se muestran conjuntamente el perfil de intensidad experimental del haz de excitación (curva azul en Fig. 3), y su derivada espacial (curva roja en la Fig. 3), que fueron las utilizadas para el cálculo de la modulación radial.

Un resultado interesante que se desprende de la Fig. 3 es la relación lineal de la modulación con la distancia a la superficie del objeto. Este resultado es el que permite para cada punto de la órbita, determinar la distancia a la superficie del objeto. Un esquema de este procedimiento puede verse en la Fig. 4.

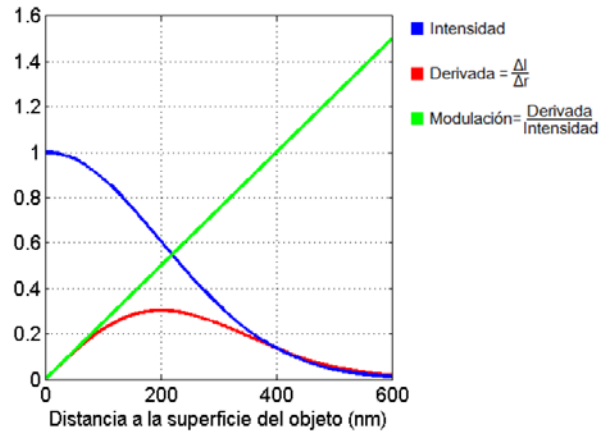


Figura 3: Perfil de intensidad de iluminación típico (azul), su derivada espacial (rojo) y la modulación radial calculada como el cociente de las dos anteriores (curva verde).

Una vez determinadas las distancias en n puntos a lo largo de la órbita, estos se interpolan para obtener la forma del objeto en ese plano. El número de puntos en los cuales se interpola dependerá de la cantidad de oscilaciones con la que realicemos la órbita (Fig. 4).

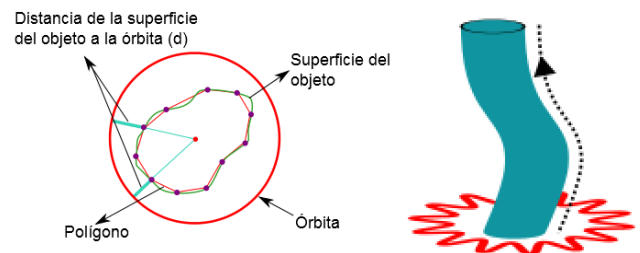


Figura 4: (Panel izquierdo) Reconstrucción de la forma de un objeto obtenida a partir de las oscilaciones del haz de excitación. La curva roja es la órbita promedio realizada con el haz de excitación. La curva verde es el objeto de interés y forma desconocida. En este ejemplo se varía el radio de la órbita en 11 puntos a lo largo de la misma (puntos violetas). A partir de estos se interpola un polígono que representa la forma aproximada del objeto en el plano. (Panel derecho): Reconstrucción de la forma de un objeto en 3D. En este caso una vez determinada la forma del objeto en un plano, la órbita se desplaza en la dirección del objeto.

Hasta aquí se tiene que, por un lado, midiendo la modulación orbital es posible determinar la posición de pequeñas partículas mientras estas se mueven y, en el caso de objetos más grandes, permite obtener la posición de su centro de masas. Por otro lado, variando el radio de la órbita se puede obtener información de la distancia de la superficie del objeto a la órbita promedio.

La generalización de este concepto a tres dimensiones es sencilla. Primero se determina la forma del objeto en el plano de enfoque del haz con el procedimiento descrito anteriormente. Luego, se cambia el plano de enfoque en la dirección del eje del objeto y se repite el procedimiento obteniendo un nuevo polígono como se muestra esquemáticamente en la Fig. 4b. La secuencia de polígonos obtenidos permite reconstruir la forma del objeto en 3D como ya fue demostrado en los trabajos fundacionales^{8,9}.

Un resultado central detrás de este método es que el objeto de interés puede estar en movimiento sin que esto afecte la determinación de su forma. Dicho de otro modo, el barrido orbital permite determinar la posición del centro de masas del objeto y seguirlo en función del tiempo. De este modo, si el objeto se mueve, el sistema se mueve con el objeto de manera de mantenerlo siempre centrado con la órbita lo cual permite su medición sin ningún artefacto asociado al movimiento.

Estudio de la performance del método

Antes de pasar a la implementación experimental de nSPIRO y con el objetivo de comprender las limitaciones y rangos de validez del método, se realizaron simulaciones numéricas partiendo de los casos más simples y variando parámetros del experimento.

En una primera etapa se realizaron simulaciones de la intensidad medida a lo largo de la órbita y se calculó la función de modulación orbital en los límites de objetos pequeños (partículas de decenas de nanómetros) y objetos grandes (estructuras de cientos de nanómetros). Los cálculos fueron realizados a partir de códigos propios escritos en entorno MATLAB. En todos los casos simulados, los pasos a seguir fueron los siguientes: Primero se definió un objeto de estudio (partícula u objeto de una geometría y tamaño determinado) y un radio de la órbita realizada por el haz de excitación, A . Suponiendo un objeto que emita isotrópamente, a partir de la distribución espacial de intensidad colectada al orbitar alrededor del objeto, se calculó la intensidad promedio (o intensidad DC) que se mediría a lo largo de una órbita completa en función de la distancia del objeto al centro de la órbita, r . En la Fig. 5 se muestran las curvas obtenidas considerando un objeto puntual y órbitas de diferentes radios (en el rango $A=0.6w_0$ a $A=1.2w_0$). La Figura 5 muestra que, para cada valor del radio de la órbita (cada color en el gráfico), el máximo de intensidad ocurre cuando el objeto está a una distancia $r \sim A$. En otras palabras, el máximo de intensidad se corresponde con el centro del haz enfocado pasando por encima del objeto de interés. Para las órbitas más pequeñas ($A = 0.6w_0$ y $A = 0.8w_0$), puede verse que la intensidad alcanza valores máximos relativos más grandes. Esto se debe a que en el límite de tamaño de la órbita mucho más chico que el tamaño del haz enfocado ($A \ll w_0$), el objeto de interés estará siempre iluminado, lo cual impone un límite al mínimo radio de órbita utilizable en el experimento.

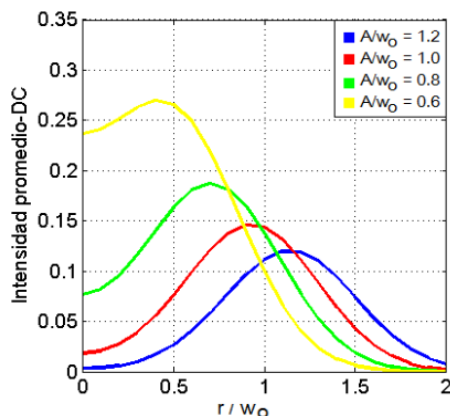


Figura 5: Intensidad promedio medida a lo largo de la órbita en función de la coordenada adimensional r/w_0 donde r es la distancia objeto-centro de la órbita y w_0 es el tamaño de la cintura del haz. Los diferentes colores representan órbitas de distinto tamaño.

En la Fig. 6 se muestra la función de modulación orbital en función de la distancia objeto-centro de la órbita para distintos radios de la órbita (línea continua) junto con la aproximación a primer orden que se presentó en la expresión 1 (línea punteada). Se observa que, independientemente del radio de órbita utilizado, la modulación orbital crece muy rápidamente hasta una distancia aproximada de $r \sim 0.5w_0$ a partir de la cual la modulación tiende asintóticamente a un valor límite. La región de crecimiento rápido es la que permite una determinación precisa de la posición del objeto. Para distancias mayores a $0.5w_0$ la determinación de r (y por lo tanto de la posición del objeto) disminuye en precisión. Un resultado importante que se desprende de la Fig. 6 y que a priori parece contra intuitivo es que cuanto mayor es el radio de la órbita, mejor es la determinación de la posición del objeto. Esto se debe a que cuanto más grande es el tamaño de la órbita mayor es la pendiente de la función de modulación, lo que aumenta la sensibilidad del método para determinar la posición de la partícula. Lo mismo sucede al disminuir el tamaño de la cintura del haz. Este resultado pone una condición importante al momento de diseñar el experimento. Dado que no se puede reducir la cintura del haz más allá del límite de difracción, para mejorar la localización de la partícula es conveniente trabajar con radios de órbitas “grandes” (del orden de $A/w_0 \sim 1$).

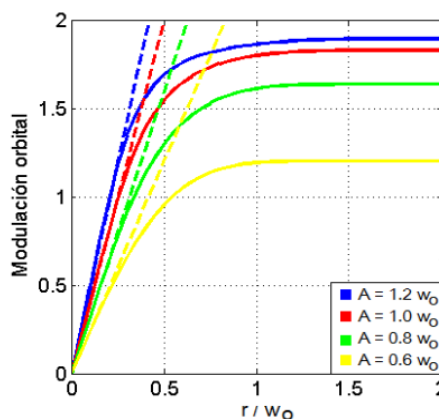


Figura 6: Resultados representativos de la modulación orbital, en función de la coordenada adimensional r/w_0 donde r es la distancia objeto-centro de la órbita y w_0 es el tamaño de la cintura del haz en el límite de objetos pequeños. En línea continua se muestra el resultado utilizando la expresión exacta y en línea punteada la expresión aproximada. Los diferentes colores representan órbitas de distinto tamaño.

Hasta aquí analizamos la capacidad del método para localizar objetos pequeños. En una segunda etapa se simuló objetos cuyo tamaño era una fracción apreciable del tamaño del haz enfocado. Realizando el mismo procedimiento descrito anteriormente se simuló la intensidad generada y a partir de esta se calculó la modulación orbital para objetos de tamaño a

(donde el radio del objeto es del orden de las centenas de nanómetros) y para diferentes radios de órbita en función de la posición del centro de masas del objeto (r_{cm}) con respecto al centro de la órbita. Los resultados se pueden observar en las figuras 7 y 8, donde al igual que antes la línea continua es el resultado de aplicar la expresión exacta y la línea punteada la expresión aproximada (de la ecuación 2).

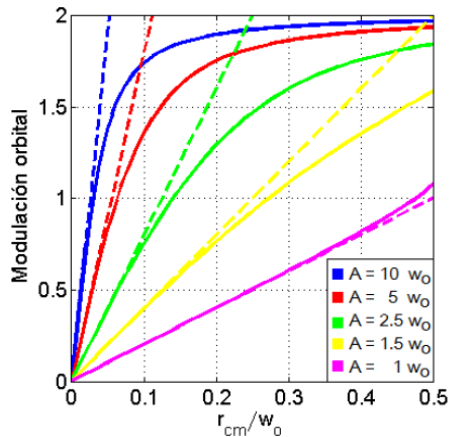


Figura 7: Simulaciones numéricas realizadas para objetos grandes de la modulación orbital en función de la coordenada adimensional r_{cm}/w_0 , donde r_{cm} es la distancia desde el centro de masa del objeto al centro de la órbita. En línea continua se muestra el resultado utilizando la expresión exacta y en línea punteada la expresión aproximada. Los diferentes colores representan órbitas de distinto radio, y tamaño de objeto fijo $a = w_0/2$.

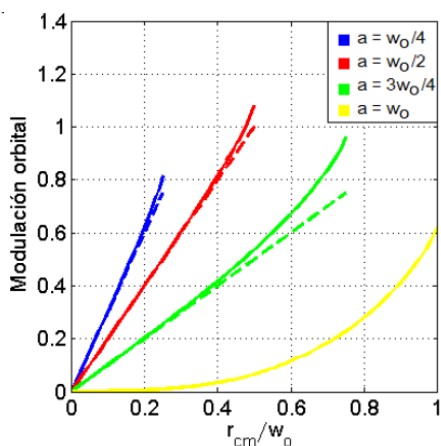


Figura 8: Modulación orbital en función de la coordenada adimensional r_{cm}/w_0 donde r_{cm} es la distancia desde el centro de masa del objeto al centro de la órbita, en el límite de objetos grandes. En línea continua se muestra el resultado utilizando la expresión exacta y en línea punteada la expresión aproximada. Los diferentes colores representan distintos tamaños de objetos para un radio de órbita fijo $A = w_0$.

Como se puede ver en la Fig. 7, para órbitas grandes ($A=10w_0$ y $A=5w_0$) la modulación es muy similar a la que se obtuvo para objetos pequeños (Fig 6). Un objeto “grande” en una órbita suficientemente grande, es una situación análoga al de un objeto “pequeño” en una órbita más chica. A medida que los radios de la órbita y del objeto se hacen más parecidos, la modulación orbital tiene una pendiente menor y la

función aproximada ajusta en un rango de distancias mayor. Si en vez de cambiar el radio de la órbita, cambiamos el tamaño del objeto (Fig. 8), se observa que la modulación sigue una tendencia lineal salvo para el caso en el cual el radio del objeto es igual al tamaño del haz enfocado (curva amarilla). Al igual que en el caso de objetos pequeños, el método localiza con mayor precisión (la pendiente es más grande) para objetos relativamente pequeños y órbitas grandes.

En conclusión, la modulación orbital permite determinar la posición de objetos pequeños (decenas de nanómetros) y objetos grandes (centenas de nanómetros) con una precisión que dependerá de los parámetros estudiados A , a , r , r_{cm} , y w_0 .

Hasta aquí estudiamos la localización en la posición del objeto. Si el objeto es pequeño, no tiene sentido hablar de su forma. Distinto es el caso si el tamaño del objeto y el tamaño del haz de iluminación se hacen comparables. En este caso, nos interesa no sólo determinar su posición sino también su forma. Para ello es necesario analizar el comportamiento de la modulación radial definida anteriormente. En la Fig. 9 se muestra la modulación radial calculada en función de la distancia de la superficie del objeto a la órbita d , (ver Fig. 4) para distintos porcentajes de variación del radio (ΔA).

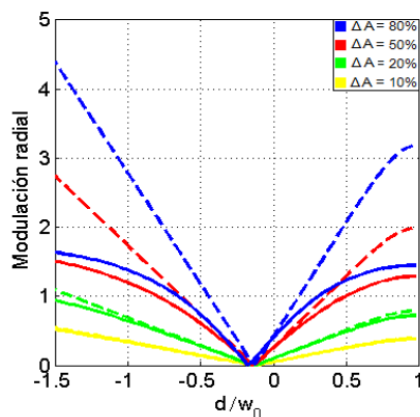


Figura 9: Modulación radial en función de la coordenada adimensional d/w_0 para distintos porcentajes de variación del radio, ΔA .

Se puede ver cómo, a medida que ΔA aumenta, la modulación radial calculada exactamente (línea continua) difiere de su versión aproximada (línea punteada). Para una órbita cuya variación del radio es del 10% se puede utilizar la expresión aproximada para calcular la modulación radial pero la sensibilidad del método será baja (puesto que la pendiente es chica). Estas simulaciones permiten determinar un criterio para la elección de ΔA . En nuestro caso concluimos que $\Delta A=20\%$ es un buen compromiso que permite utilizar la expresión aproximada con una buena sensibilidad. Para determinar el tamaño de órbita óptimo, éste puede calcularse como el tamaño del objeto más la distancia desde la superficie del objeto a la órbita, es decir $A=a+d$.

Otro resultado importante es estudiar cómo cambia la modulación radial para objetos de diferente tamaño. En la Fig. 10 se varió el tamaño del objeto por más de

un orden de magnitud ($a=0.1w_0$ para la curva azul y $a=4w_0$ para la magenta), sin embargo la modulación radial mantiene una tendencia lineal. Este resultado es central para la aplicación del método ya que demuestra que la modulación radial depende únicamente de la distancia de la órbita a la superficie del objeto (es independiente de su tamaño)

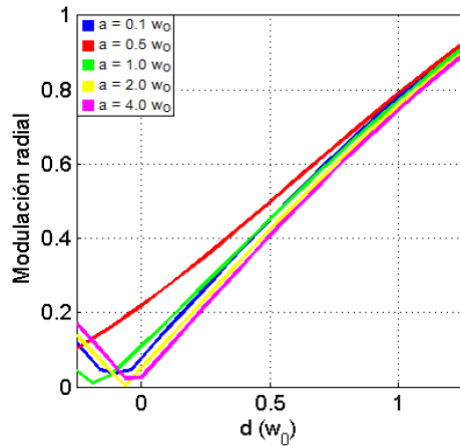


Figura 10: Cálculo de la modulación radial en función de la distancia a la superficie del objeto, d , para objetos de diferente tamaño a . Todas las curvas se calcularon para una variación del radio del 20%.

A partir de estos resultados se encontraron los parámetros para los cuales la función de modulación presenta un comportamiento lineal. Se determinó que el radio de la órbita más adecuado para trabajar es aquel que ubica el borde de la órbita a una distancia $\approx w_0/2$ de la superficie del objeto de estudio con un valor de modulación radial de aproximadamente el 20%.

III. MÉTODOS

Para aplicar nSPIRO es fundamental poder mover de manera arbitraria el haz de excitación. Esto se logra a partir del control de dos espejos galvanométricos para el movimiento en el plano XY, y de un posicionador piezoeléctrico para el movimiento en el eje Z. Esto permite generar órbitas circulares en los planos XY, XZ o YZ (que no son modos de barridos que en general vienen predeterminados en los microscopios comerciales) y, más importante, utilizar la posición calculada del objeto en un lazo de realimentación que determine la posición de la siguiente órbita para seguir al objeto. El resto del equipamiento consta de un microscopio de barrido convencional como puede ser un microscopio confocal o por absorción de dos fotones. La totalidad de los experimentos mostrados en este trabajo se realizaron en el microscopio por absorción de dos fotones ensamblado íntegramente en el Laboratorio de Electrónica Cuántica del DF-FCEN-UBA, e IFIBA-CONICET. El microscopio está montado alrededor de un cuerpo Olympus IX71 (Olympus, Japón). En la Fig. 11 se puede ver un esquema del microscopio utilizado.

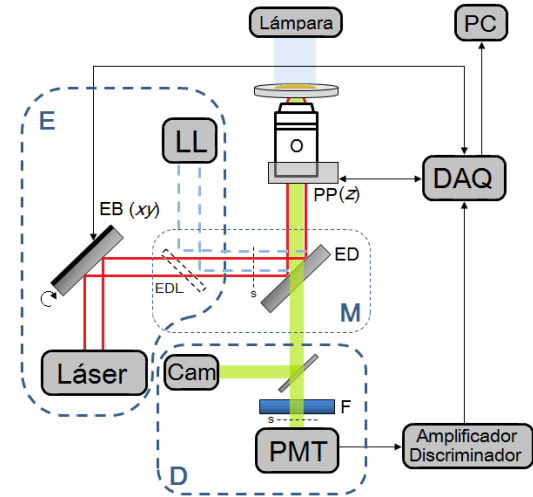


Figura 11: Esquema general del microscopio construido.

El haz de excitación proviene de un láser infrarrojo pulsado de Titanio Zafiro (Ti:Za) sintonizable en el rango 760nm – 840nm, con pulsos de 100fs de ancho, 80MHz de repetición y 300mW de potencia media (KMLabs). La lente objetivo (O) está montada sobre un posicionador piezoeléctrico (Physik Instrumente) (PP) que permite recorrer una distancia máxima de 100 μm en dirección perpendicular al plano de la muestra. Los espejos galvanométricos (EB) y el piezoeléctrico son controlados con una tarjeta DAQ de IOTech (Measurement Computing, Norton MA). Los espejos galvanométricos y el posicionador piezoeléctrico imponen la velocidad máxima de barrido. El principal límite viene dado por el piezoeléctrico que tiene una frecuencia de respuesta máxima del orden de los 100 Hz, mientras que los espejos galvanométricos alcanzan una frecuencia de kHz. Las mediciones fueron recolectadas y analizadas utilizando el programa comercial SimFCS (UC Irvine, USA).

Evaluación experimental del rendimiento del método

Para confirmar las predicciones teóricas, se realizaron experimentos sobre una muestra patrón de nanopartículas de oro de 40 nm de radio fijadas sobre un cubreobjetos. Se midió la modulación radial para órbitas de entre 80 y 400 nm de radio.

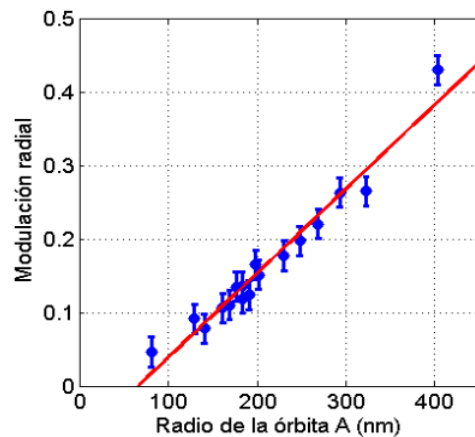


Figura 12: Modulación radial determinada experimentalmente para una nanopartícula esférica de 40 nm

de radio fijada sobre un cubreobjetos, en función del radio de la órbita que realiza el haz de excitación. En rojo se grafica un ajuste lineal.

La Fig. 12 representa la calibración del instrumento y permite determinar la distancia a partir de la medición de la modulación radial. Adicionalmente del ajuste puede extraerse el radio de la nanopartícula, que en este caso corresponde a (45 ± 15) nm. Este resultado coincide con el dato del fabricante que asegura un radio nominal de 40 nm (TedPella). La modulación radial obtenida experimentalmente es lineal con el radio de la órbita y por lo tanto con la distancia a la superficie de la nanopartícula como se desprende de las simulaciones mostradas anteriormente.

IV. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA

Para completar el trabajo, aplicamos nSPIRO a la determinación de la forma de raíces de *Arabidopsis Thaliana*. *Arabidopsis Thaliana* es uno de los modelos más utilizados en plantas y además tiene la particularidad de ser autofluorescente por absorción de dos fotones, cualidad que lo hace muy interesante para trabajar en nuestro microscopio ya que no hace falta marcar exógenamente la muestra. Las muestras fueron facilitadas por el Dr. M. Ricardi del Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias. La raíz principal tiene un largo de unos pocos milímetros y sobre ella crecen pelos radiculares que tienen un tamaño del orden del micrón⁸. Aplicamos nSPIRO y obtuvimos a partir de la medición de la función de modulación radial la forma que se muestra en la Fig. 13. En la Fig.13a se muestra una imagen confocal de una raíz de *Arabidopsis Thaliana*, indicando con una flecha el pelo radicular estudiado. La Fig.13b muestra la reconstrucción de la forma a partir de la secuencia de polígonos obtenidos indicando en colores la intensidad de la señal medida (colores más cálidos corresponden a intensidades más altas). En la Fig.13c puede observarse la misma reconstrucción vista desde otro plano. A partir de esta reconstrucción se calculó el tamaño del pelo obteniendo un valor de $8.8 \mu\text{m}$ en la sección cercana a la raíz, de $4 \mu\text{m}$ en el borde, y un valor mínimo $0.5 \mu\text{m}$ en la región central.

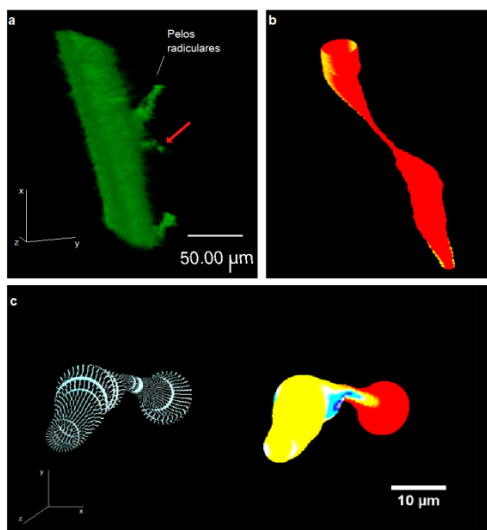


Figura 13: (a) Imagen confocal de una raíz de *Arabidopsis Thaliana*. La flecha indica el pelo radicular estudiado. (b)

Reconstrucción tridimensional por nSPIRO de un pelo radicular. (c) Vista alternativa de la reconstrucción tridimensional. A la izquierda se puede ver la forma del objeto a partir de las distancias medidas por nSPIRO. A la derecha se muestra la superposición de la forma con la intensidad de fluorescencia medida y mostrada en colores. Colores más cálidos indican mayor intensidad de fluorescencia.

V. CONCLUSIONES

En este trabajo implementamos experimentalmente una técnica óptica basada en el barrido circular de un láser alrededor de un objeto de interés lo cual permitió reconstruir su forma en tres dimensiones. nSPIRO utiliza la respuesta del objeto frente a su iluminación para calcular la distancia del centro del haz enfocado a su superficie. Puede utilizarse para la determinación de la forma de objetos micrométricos tanto en casos estáticos (objetos fijados) como dinámicos (objetos en movimiento). En el marco experimental, adaptamos un microscopio por absorción de dos fotones ensamblado íntegramente en el laboratorio para generar barridos circulares y de radio variable del haz de excitación. Realizamos simulaciones numéricas que permitieron estudiar la *performance* de la técnica como función de diferentes variables del experimento (tamaño del objeto, tamaño de la órbita y porcentaje en la modulación del radio). Este estudio permitió optimizar los parámetros experimentales para luego realizar las mediciones sobre las muestras. Se realizó una calibración del método utilizando como muestra patrón nanopartículas metálicas de forma y tamaño conocido. Finalmente, se aplicó la técnica al estudio de los pelos radiculares en muestras de *Arabidopsis Thaliana* en condiciones fisiológicas.

VI. REFERENCIAS

- 1 - Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW, "The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast." *Differentiation*, **70**(9-10):537-46 (2000).
- 2 - Pampaloni F., Reynaud E.G. and Stelzer E.H.K. "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue". *Nature reviews*, **8**(10), 839-45 (2007).
- 3 - Chiu C. "3D Cell-ECM dynamics revealed by innovative fluorescence microscopy methods". Tesis de doctorado en ciencias biológicas, Universidad de California. (2013).
- 4 - Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. "Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors." *Assay and Drug Development Technologies*. **12**(4):207-218 (2014).
- 5 - Fang Y, Eglen RM. "Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. Eglen RM, Klein J-L, eds." *Slas Discovery*. **22**(5):456-472 (2017).
- 6 - Whitehead L, McArthur K, Geoghegan N, and Rogers K. "The reinvention of twentieth century microscopy for three-dimensional imaging", *Immunology and Cell Biology* **95**, 520-524 (2017).
- 7 - Kis-Petikova K. and Gratton E. "Distance measurement by circular scanning of the excitation beam in the two photon microscope". *Microsc. Res. Tech.*, **63**, 34-49 (2004).

- 8 - Lanzano L., Digman M.A., Fwu P., Giral H., Levi M. and Gratton E. "Nanometer scale imaging by the modulation tracking method". *J. Biophotonics* **4(6)**, 415-424, (2011).
- 9 - Lanzano L. and Gratton E. "Measurement of distance with the nanoscale precise imaging rapid beam oscillation method". *Microsc. Res. Tech.* **75(9)**, 1253-64, (2012)
- 10- Levi V, Ruan Q, Gratton E. "3-D Particle Tracking in a Two Photon Microscope: Application to the Study of Molecular Dynamics in Cells." *Biophysical Journal*; **88** (4):2919-2928. (2005).
- 11- M. Gabriel, J. Moya-Díaz, L. I. Gallo, F. D. Marengo and L. C. Estrada, "Single particle tracking of internalized metallic nanoparticles reveals heterogeneous directed motion after clathrin dependent endocytosis in mouse chromaffin cells". *Methods Appl Fluoresc.* **6** (1), (2018).