



Tumor vessel

Normal vessel

100  $\mu\text{m}$ 

## Distinguir vasos sanguíneos cerebrales y tumorales en tejidos profundos mediante la microscopía multifotónica

La microscopía convencional de excitación por dos fotones (2PE) usa normalmente la luz láser en la región NIR-I (de 700 a 950 nm) como fuente de luz excitadora, lo que limita la profundidad en el procesamiento de imágenes de alrededor 500  $\mu\text{m}$ . A diferencia de la luz NIR-I, la luz NIR-II (de 1000 a 1700 nm) proporciona una atenuación de la luz más reducida en los tejidos biológicos. La luz NIR-II también es capaz de penetrar con mayor profundidad a fin de excitar los fluorocromos durante el procesamiento de imágenes del tejido in vivo. Por otra parte, la autofluorescencia inducida por la luz NIR-II es mucho más baja que la de la luz NIR-I. Esto permite mejorar la relación entre señal y ruido de fondo en las imágenes 2PE.

El microscopio de excitación multifotónica FVMPE-RS de Olympus está equipado con un sistema láser infrarrojo de impulsos InSight DS que permite la obtención de

imágenes multifotónicas mediante una excitación de 680 a 1300 nm. A continuación, se exponen dos aplicaciones de procesamiento de imágenes profundas in vivo que se benefician del uso de un microscopio de excitación multifotón con la luz NIR-II.

### 1. Puntos excitables de polímeros conjugados por NIR-II destinados al procesamiento de imágenes de dos fotones del cerebro profundo a través de un cráneo intacto [1]

La microscopía 2PE a través de un cráneo intacto de ratón plantea un desafío debido a la fuerte dispersión inducida por el hueso del cráneo. Para superar este desafío, se han desarrollado puntos de polímeros conjugados monocatenarios (CPdots), los cuales se excitan por la luz NIR-II. Estos puntos se dotan de fluorescencia brillante en la región NIR-I (pico a  $\approx 725$  nm y rendimiento cuántico de  $20,6 \pm 1,0$  %) para un procesamiento de imágenes 2PE del cerebro profundo in vivo en un cerebro de ratón intacto. Para ello, se usó el microscopio FVMPE-RS de Olympus, equipado con un sistema láser afinable ultrarrápido; se capturaron imágenes 2PE del cerebro del ratón bajo una excitación de 800, 1040 y 1200 nm. Este sistema permitió una sintonización de la longitud de la onda en el láser según nuestro criterio y sin la dificultad de un sistema complejo. La excitación de 1200 nm condujo a una mayor profundidad de imagen y mejor relación entre la señal y el ruido de fondo. Además, se generó una reconstrucción 3D de la red de vasos sanguíneos del cerebro dotada de una gran profundidad vertical de 400  $\mu\text{m}$  a través del cráneo intacto.

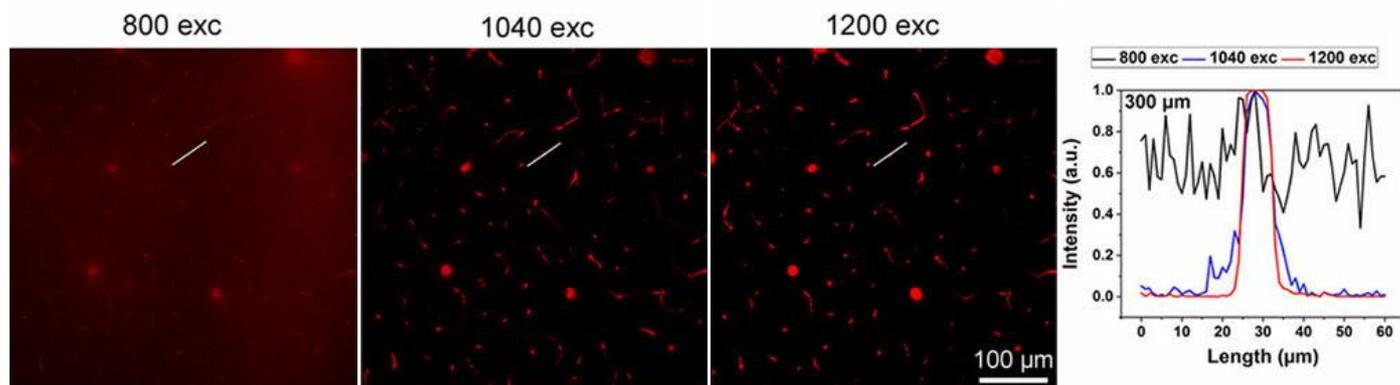


Figura 1. Imágenes 2PE de vasos sanguíneos cerebrales en un ratón inyectado con puntos de polímeros conjugados (CPdots), adquiridas en la misma microcolumna cortical (a una profundidad de 300  $\mu\text{m}$ ) durante la excitación del láser de femtosegundos a 800, 1040 y 1200 nm. La emisión fue adquirida entre 660 y 750 nm. Cada fotograma fue capturado a 3,22 s. Todas las imágenes comparten la misma barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . Se trazaron los perfiles de intensidad de la línea 2PE a través de los vasos sanguíneos en cada fotograma. Derechos de autor 2019 por Wiley-VCH.

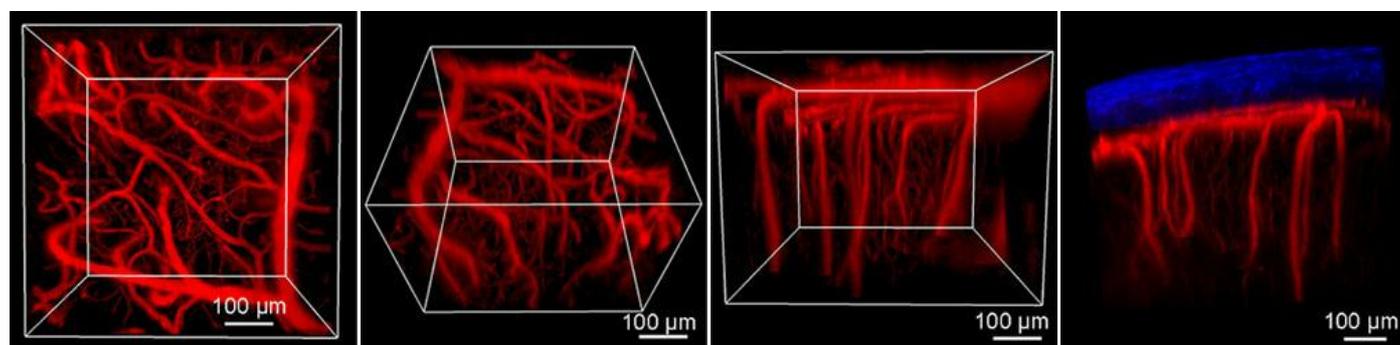
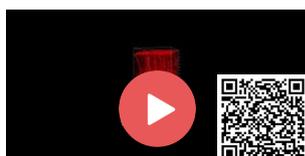


Figura 2. Imágenes 2PE, reconstruidas en 3D, provenientes de los vasos sanguíneos cerebrales de un cráneo intacto. Excitación por segunda generación armónica (SHG, de color azul): 950 nm. Excitación para 2PE: 1200 nm. Las emisiones fueron adquiridas entre 455 y 500 nm a partir de la SHG y entre 660 y 750 nm a partir de los vasos sanguíneos. Cada fotograma fue capturado a 3,22 s. Derechos de autor 2019 por Wiley-VCH.

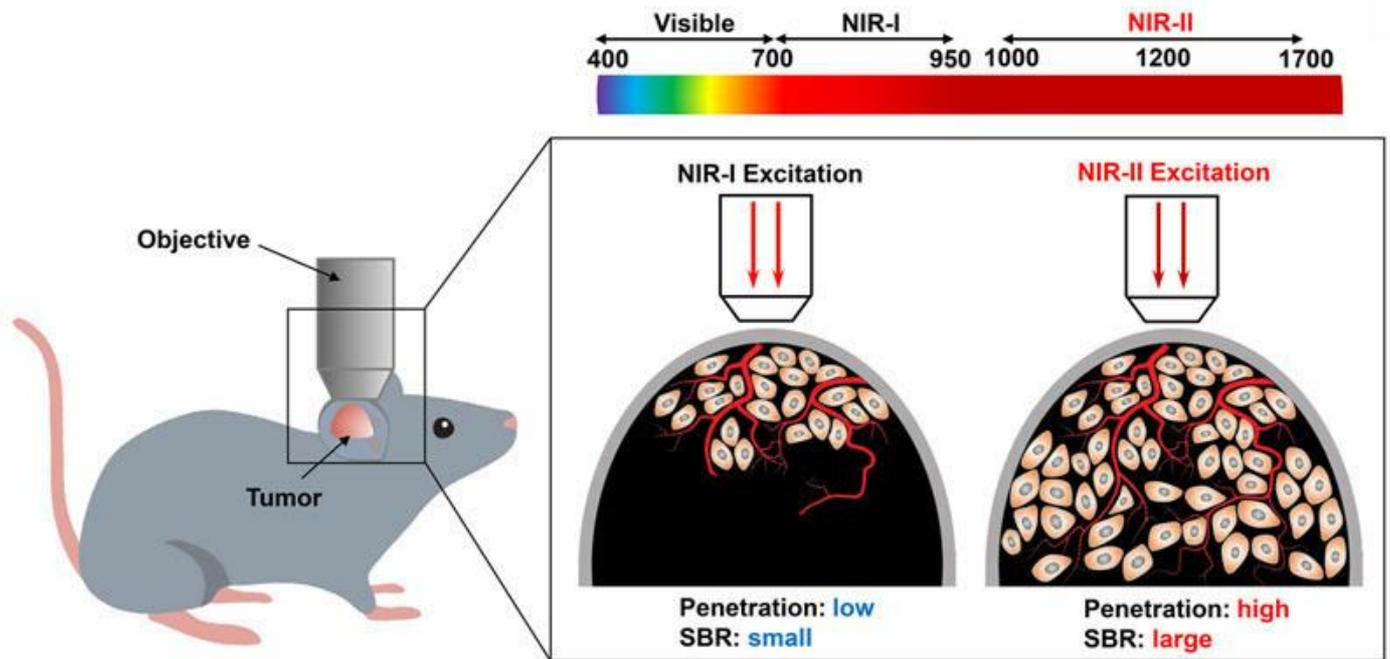


Video: distinguishing-cerebral\_movie01(2)\_720.mp4

Video 1. Imagen 2PE, reconstruida en 3D, proveniente de los vasos sanguíneos cerebrales marcados por CPdots. Excitación: 1200 nm. Emisión: 660–750 nm. Derechos de autor 2019 por Wiley-VCH.

## 2. La microscopía intravital por dos fotones mediante la excitación NIR-II distingue los vasos sanguíneos cerebrales y tumorales profundos [2]

El procesamiento de imágenes de fluorescencia intravital, destinado a la morfología y dinámica de la vasculatura en el cerebro y los tumores con una gran profundidad de penetración y una óptima relación entre señal y ruido de fondo (SBR), es ideal para el estudio y la teranóstica de las enfermedades y cánceres vasculares. Fluorocromo de alto brillo, a través de la emisión NIR inducida por agregación, dedicado a la microscopía 2PE intravital con la excitación de luz NIR-II para cerebros y tumores. Debido a la capacidad de penetración profunda de la luz NIR-II y el alto brillo del fluorocromo, se pudieron adquirir imágenes de vasos sanguíneos provenientes de tejidos profundos (cerebro y tumores).



Esquema 1. Ilustración esquemática del procesamiento de imágenes de fluorescencia por dos fotones en tumor in vivo mediante excitación NIR-I y NIR-II. Derechos de autor 2019 por Wiley-VCH.

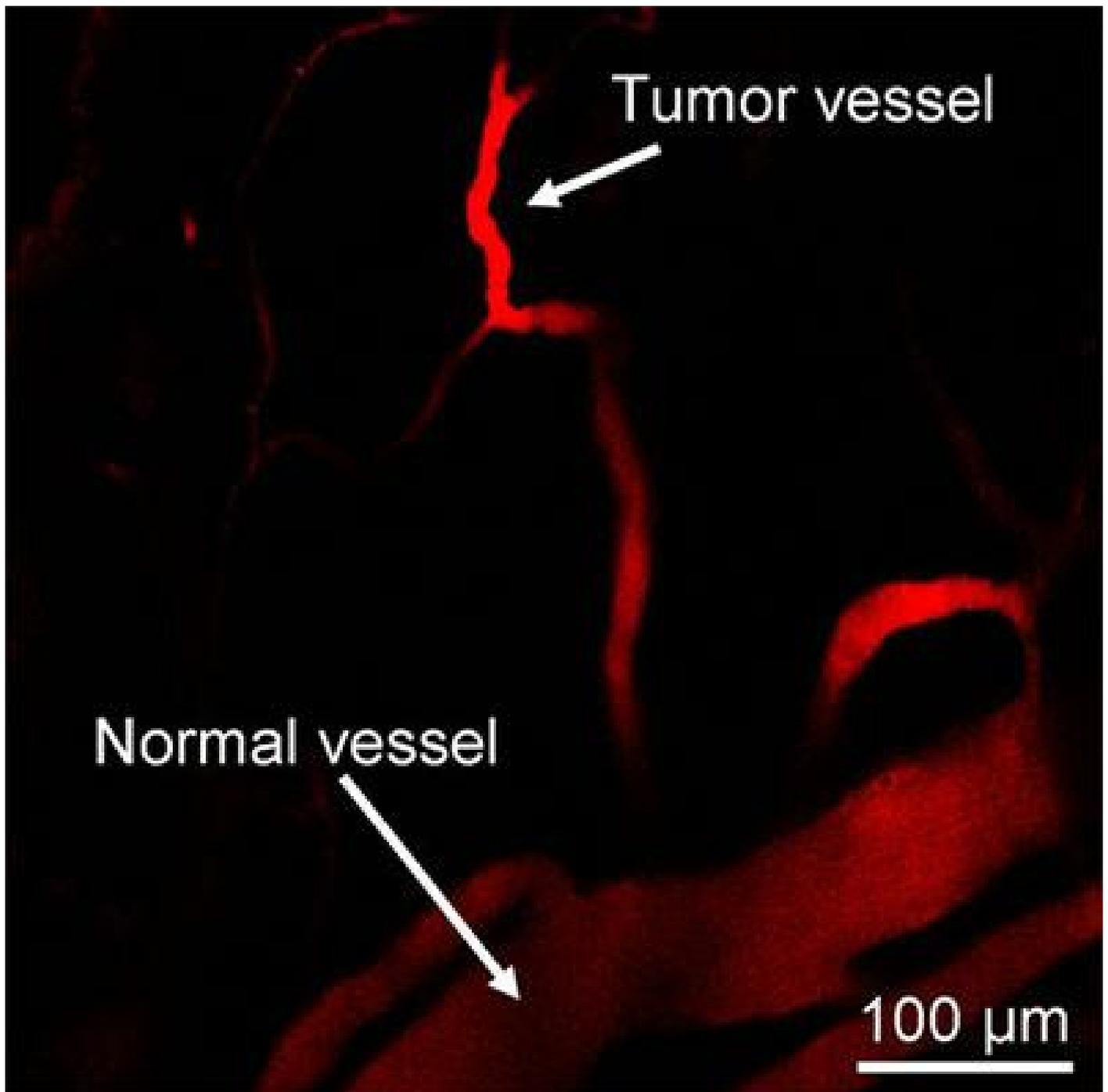


Figura 3. Imagen 2PF de vaso sanguíneo cancerígeno y vaso sanguíneo normal, marcados con el fluorocromo desarrollado. El vaso sanguíneo del tumor muestra un aumento de 2PE en comparación con el vaso normal. Excitación: 1200 nm. Emisión: 660–750 nm. Derechos de autor 2019 por Wiley-VCH.

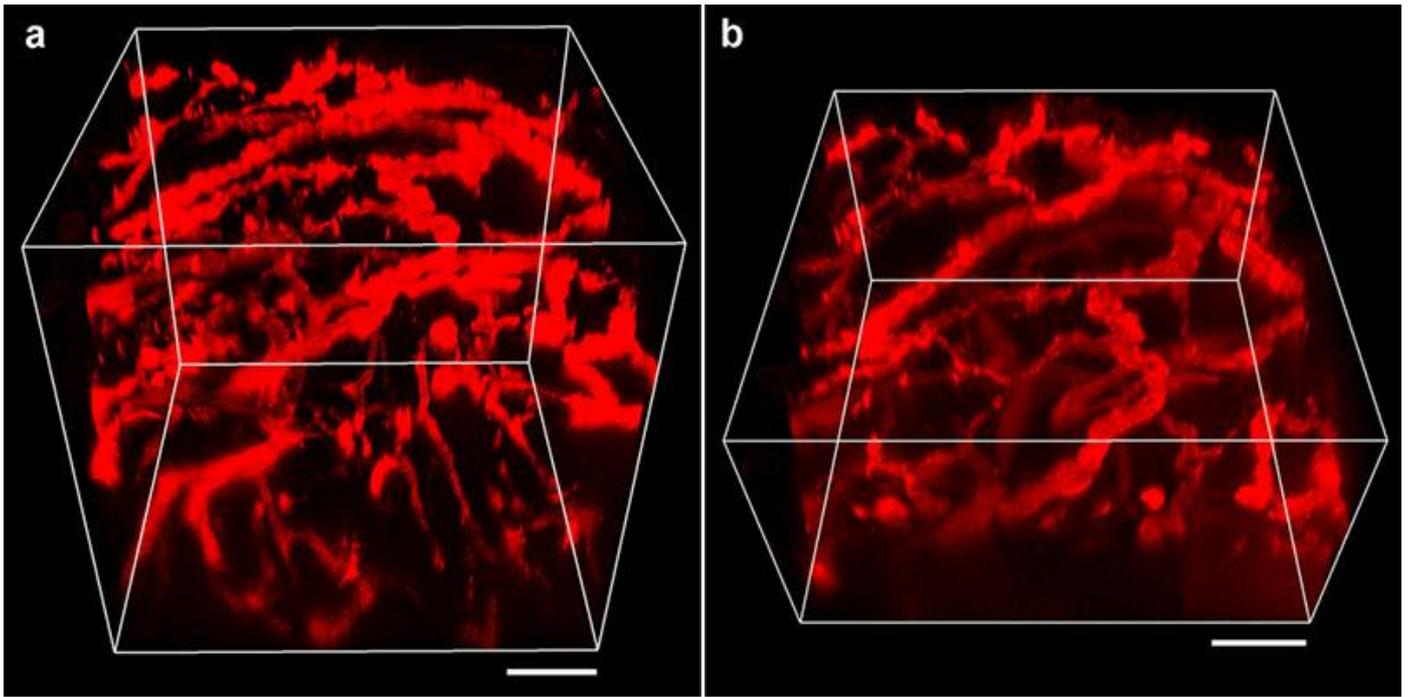


Figura 4. Imágenes 2PE, reconstruidas en 3D, de redes de vasculatura tumoral en el mismo tumor bajo excitación NIR-II (a) y NIR-I (b). Excitaciones: 1200 nm con NIR-II y 920 nm con NIR-I. Barras de escala: 100  $\mu$ m. Profundidad de imagen (a través de la piel): 500  $\mu$ m con excitación NIR-II y 300  $\mu$ m con excitación NIR-I. Derechos de autor 2019 por Wiley-VCH.

Referencias bibliográficas:

[1] [NIR-II Excitable Conjugated Polymer Dots with Bright NIR-I Emission for Deep In Vivo Two-Photon Brain Imaging Through Intact Skull](#) [Puntos de polímeros conjugados mediante excitación NIR-II con emisión brillante NIR-I para un procesamiento de imágenes por dos fotones en cerebro profundo in vivo a través de un cráneo intacto].

[2] [NIR-II-Excited Intravital Two-Photon Microscopy Distinguishes Deep Cerebral and Tumor Vasculatures with Ultrabright NIR-I AIE Luminogen](#) [Microscopía intravital por dos fotones mediante excitación NIR-II para distinguir vasos sanguíneos cerebrales y tumorales profundos con luminógeno AIE ultrabrillante por NIR-I].

Equipo de procesamiento de imágenes

Microscopio: Sistema FVMPE-RS

Objetivo: Objetivo de inmersión en agua 25X (XLPLN25XWMP2)

Comentario del Dr. Shaowei Wang

El microscopio multifotón FVMPE-RS de Olympus es una poderosa herramienta para el procesamiento de imágenes intravitales. El láser infrarrojo, impulsado por el sistema InSight DS, con longitudes de onda sintonizables de 680 a 1300 nm, es útil para diversas aplicaciones de procesamiento de imágenes de fluorescencia in vivo por dos fotones. Gracias al revestimiento óptico optimizado y al excelente objetivo dotado de una alta transmitancia en la región NIR-II, fue posible aplicar la microscopía intravital de dos fotones excitados por NIR-II con nuestros fluorocromos ultrabrillantes. La profundidad de la imagen y la relación entre señal y ruido de fondo mejoraron con la excitación por NIR-II.

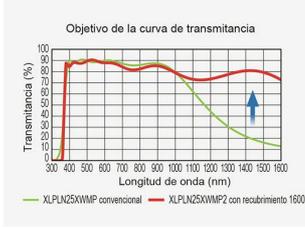


#### Reconocimientos

Esta nota de aplicación ha sido preparada con la ayuda de los siguientes investigadores:

Dr. Shaowei Wang, Departamento de Ingeniería Química y Biomolecular, Universidad Nacional de Singapur ([Página de presentación](#))

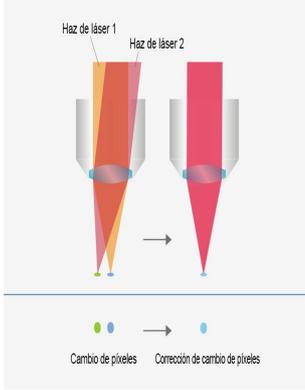
## ¿Cómo el microscopio FVMPE-RS facilitó nuestro experimento?



### Transmisión láser eficiente por NIR-II

Los espejos revestidos de plata de los escáneres ayudan a proporcionar más potencia láser a la muestra para obtener imágenes más brillantes. La transmisión en el infrarrojo cercano, en comparación con los espejos revestidos en aluminio, es especialmente ventajosa para experimentos de profundidad in vivo.

Los objetivos multifotón de Olympus y las ópticas del escáner tienen un revestimiento óptico que proporcionan una excelente transmisión de 400 nm a 1800 nm.



### Procesamiento de imágenes sencillo con alineación láser automatizada

La desviación del láser causada por la sintonización de la longitud de onda puede provocar una desalineación del haz de excitación, lo que reduce la calidad de las imágenes en los sistemas convencionales.

El FVMPE-RS mantiene una alineación láser precisa y cuatriaxial del rayo de excitación en la unidad del escáner. La posición y el ángulo del haz se ajustan automáticamente para mantener una potencia láser superior y un registro uniforme de los píxeles.

## Producto Relacionado



Microscopio de escaneo láser multifotón

### FVMPE-RS

- Resolución y contraste maximizados con objetivos TruResolution
- Creación de imágenes a alta velocidad con escáner resonante
- Excitación multifotón en IR extendido hasta 1300 nm
- Opción de triple escáner para estimulación multifotón y por láser visible
- Transmisión altamente eficiente con 1600 capas ópticas en objetivos dedicados a multifotones y unidad de escaneo
- Alineación automática en 4 ejes de los haces láser IR

Más información ► <https://www.olympus-lifescience.com/laser-scanning/fvmpe-rs/>