



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN  
MICROSCOPIO ÓPTICO PARA LA  
TÉCNICA DE FOTOACTIVACIÓN  
BIFOTÓNICA CON FORMACIÓN DE  
IMÁGENES CONFOCALES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**Química**

PRESENTA:

**Mariana Mejía Reza**

Ciudad de México, 2023





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



# Índice general

<b>Agradecimientos</b>	<b>I</b>
<b>Resumen</b>	<b>III</b>
<b>Introducción</b>	<b>VII</b>
0.1. Llegando a una microscopía de superresolución. . . . .	VIII
0.2. Microscopía multifotónica. . . . .	XI
0.3. <i>PALM</i> , Photoactivated localization microscopy . . . . .	XII
0.3.1. Objetivo . . . . .	XIV
<b>1. Microscopía Óptica</b>	<b>1</b>
1.1. Microscopía de luz transmitida . . . . .	2
1.1.1. Rayos paraxiales . . . . .	2
1.2. Fluorescencia . . . . .	3
1.3. Microscopía de Campo Amplio. . . . .	3
1.4. Microscopía Confocal. . . . .	5
1.5. Microscopía de dos fotones . . . . .	7
1.5.1. Teoría de la absorción bifotónica . . . . .	7
1.5.2. Hiperlocalización del volumen de excitación . . . . .	10
1.6. Láseres . . . . .	11
1.7. Moléculas con índices de absorción bifotónicos elevados. . . . .	12
<b>2. La superresolución</b>	<b>19</b>
2.1. Difracción . . . . .	22

2.2. Formación de imágenes . . . . .	24
2.3. La superresolución . . . . .	26
<b>3. Construcción de un microscopio para la formación de imágenes tipo PALM por fotoactivación bifotónica.</b>	<b>31</b>
3.1. Requerimientos . . . . .	31
3.2. Diseño General . . . . .	32
3.2.1. Espejos . . . . .	32
3.2.2. Espejos o ventanas dicróicas. . . . .	33
3.2.3. Lentes . . . . .	33
3.3. Caminos de excitación. . . . .	37
3.3.1. Monofotónico . . . . .	37
3.3.2. Bifotónico . . . . .	39
3.4. Microscopio . . . . .	43
3.5. Camino de detección . . . . .	45
3.6. Un primer acercamiento . . . . .	47
<b>Conclusiones</b>	<b>51</b>
<b>Anexo</b>	<b>53</b>
.1. Protocolo de uso: . . . . .	53
.2. Láser de Titanio: Zafiro . . . . .	53
.3. Alineación del camino de detección del arreglo Confocal . . . . .	54
.4. Experimento . . . . .	55

# Agradecimientos

---

A mi familia. Pilares de mi vida. Todo mi amor y admiración para ustedes.

Al Dr. Jorge Peón, mentor y cómplice. Siempre faltarán palabras para expresarlo todo, pero, pues...lo que sea que suene.

A mis compañeros de laboratorio, los que siguen cerca y los que ya están lejos. Que hacen que anhele cada día del laboratorio. Que llenan mi vida de risas, ciencia y aventuras (de las buenas o de las que dan sustos).

A Mayte, Óscar y Aranza. Guardianes de los cachitos de mi corazón. Siempre estoy incompleta hasta que regresan a mí y me vuelven a unir.

A Frida, Rafaelo, Celso y Tomás. Fieles compañeros de desveladas y fieles aliados de sueños.

Se agradece al CONACyT por el apoyo económico a través del proyecto Ciencia de Frontera 2019-51496. De la misma manera, a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, programa PAPIIT por el apoyo económico otorgado al proyecto IG200621. También se agradece por los recursos de supercómputo de la UNAM otorgados en el proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-210.



# Resumen

---

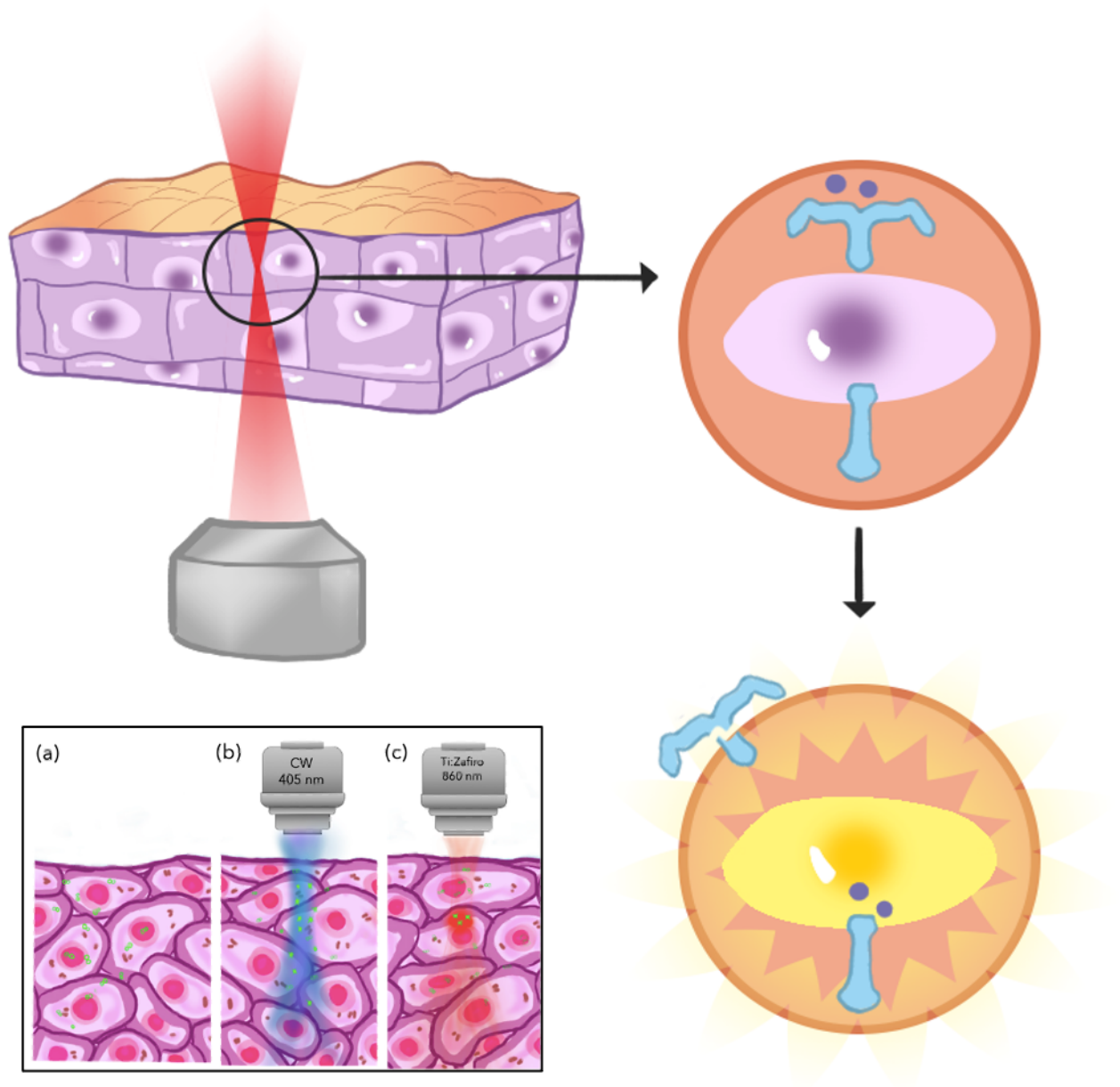
Se presentan las bases teóricas y el diseño experimental de un microscopio de fluorescencia confocal capaz de fotoactivar y fototransformar sondas moleculares mediante un proceso de excitación bifotónico para obtener una microscopía de fotoactivación (*Photoactivated Localization Microscopy, PALM*) bifotónica. A diferencia de la microscopía de fluorescencia convencional, la microscopía de fotoactivación se basa en la formación in situ de las moléculas que serán responsables de las señales de emisión. La formación y localización de emisores (fluoróforos) individuales resultan en imágenes con resolución a nivel de moléculas individuales. El diseño del esquema de fotoactivación por excitación bifotónica tiene dos componentes principales: el diseño óptico y el diseño molecular.

El diseño óptico consiste en dos partes principales, los caminos ópticos para los láseres de fototransformación bifotónica y de excitación de los emisores individuales, y el camino de detección de las señales emitidas. Los caminos ópticos de excitación consisten en láseres para la toma de imágenes (de 405, 485 y 365 nm) y el láser de 875 nm para obtener una excitación bifotónica y una subsecuente fotoactivación. El láser para la excitación bifotónica es un láser de titanio-zafiro infrarrojo sintonizable. El camino de detección es un arreglo confocal, donde la luz fuera del área focal del objetivo del microscopio es bloqueada por un filtro espacial llamado *pinhole* (apertura micrométrica).

El diseño de la sonda molecular utilizada consiste en una antena receptora a dos fotones y un fluoróforo fotoliberable. La posibilidad de una excitación bifotónica da como consecuencia una fotoactivación híperlocalizada que puede dar pie a una nueva variación a la técnica de microscopía de superresolución *PALM*.

Los fluoróforos utilizados para la técnica tipo *PALM* convencional son diseñados para fotoactivarse de manera monofotónica. La absorción monofotónica tiene una dependencia lineal con la intensidad de la luz, por lo tanto, esta fotoactivación se puede observar en toda





**Fig. 1:** Fotoactivación bifotónica. *Recuadro:* (a) Un tejido teñido desactivado o antes de cualquier tipo de irradiación. (b) Irradiación por una fuente que es absorbida linealmente, la absorción es monofotónica y la probabilidad de que ésta ocurra se da en todo el volumen confocal ya que tiene una dependencia normal con la intensidad del láser. (c) Irradiación por un láser de 860 nm, la absorción es bifotónica y esta solo ocurre en el punto focal del objetivo ya que el fenómeno de absorción bifotónica tiene una dependencia no lineal con la intensidad de láser. Al alejarse del área focal ocurre un decaimiento exponencial en la probabilidad de que la molécula pueda absorber dos fotones con ello, la formación de los fluoróforos solo ocurre en el punto focal del sistema, el cual puede tener profundidad variable.

---

el área de iluminación del láser. Cambiando el diseño molecular para tener una absorción bifotónica, la fotoactivación se vuelve híperlocalizada ya que a diferencia de la absorción monofotónica ( $I_{\text{señal}} \propto I_{\text{láser}}$ ), la absorción bifotónica tiene una dependencia cuadrática con la intensidad de la luz de excitación ( $I_{\text{señal}}^2 \propto I_{\text{láser}}^2$ ). Como consecuencia, la existencia de una probabilidad de que ocurra una absorción de dos fotones solo es factible en el punto (o volumen) focal del objetivo o donde el láser está enfocado (es decir, la zona con mayor intensidad). Este control espacial puede resultar en una fotoactivación con una variación en profundidad, es decir, un *PALM* tridimensional.

En esta tesis se propone y presenta un nuevo diseño óptico para una microscopia de fluorescencia de dos fotones capaz de fotoactivar y foto-transformar sondas moleculares mediante un proceso bifotónico para lograr una microscopia de superresolución *PALM* a profundidad y dimensión variable (mostrado en la figura 1).



# Introducción

---

En 1665, Robert Hooke publicó *Micrographia*- el primer libro de microscopía en el mundo. En el presentó su microscopio compuesto, descrito e ilustrado en el prefacio de su libro. Este microscopio, compuesto de una lámpara de aceite y tres lentes, se volvería el predecesor del microscopio moderno. *Micrographia* postuló una serie de teorías de distintos campos, así como descripciones y dibujos de distintas especies y objetos. Observó la estructura porosa de un corcho y le apodo a los poros células. Aunque estos no podían, en un sentido biológico, ser denominados como “células” el término perduró y ahora este se deriva del uso que Hooke le dio originalmente. El libro fue increíblemente influyente y demostró, por primera vez, lo que un microscopio podía hacer por la ciencia[1].

La microscopía, o bien, la imagen generada por un microscopio es resultado de fenómenos de refracción en un sistema de lentes que resulta en el aumento de una imagen;el fenómeno de difracción define la resolución en una imagen microscópica [2]. Aunque Hooke introdujo el microscopio y la microscopía al mundo, los cimientos de la microscopía de luz fueron establecidos dos siglos después por Ernst Abbe. Él demostró que la difracción de la luz por el espécimen y la apertura numérica de la lente del objetivo determinaba la resolución de la imagen creada. Abbe incluso definió las condiciones necesarias para diseñar una lente cuya resolución fuera limitada solo por efectos de difracción (en lugar de estar afectada por aberraciones cromáticas y esféricas) y estableció el papel que el objetivo y la apertura numérica del microscopio tendrían sobre su resolución.

Aunque hayan ya pasado muchos años desde Hooke y su lámpara de aceite y tres lentes, los límites establecidos por Abbe han perdurado y han propiciado la búsqueda y desarrollo de nuevas técnicas para romper la barrera de difracción y crear la microscopía de “superresolución”.

## 0.1. Llegando a una microscopía de superresolución.

La difracción es un fenómeno que ocurre cuando un campo electromagnético incide sobre una apertura. El campo incidente que logra pasar a través de la apertura es el campo difractado. Como dicha propiedad es intrínseca a todas las ondas, superar la barrera de difracción fue considerado imposible por mucho tiempo, no obstante, el desarrollo de novedosas técnicas basadas en la interconversión de sondas moleculares ha permitido romper el límite de resolución que en principio lo dictan los fenómenos de interferencia (creados a su vez por la difracción), mejorando la resolución espacial por un orden de magnitud mayor al límite previo. Estas técnicas han permitido obtener perspectivas clave en procesos biológicos en escalas moleculares y celulares antes inalcanzables [3].

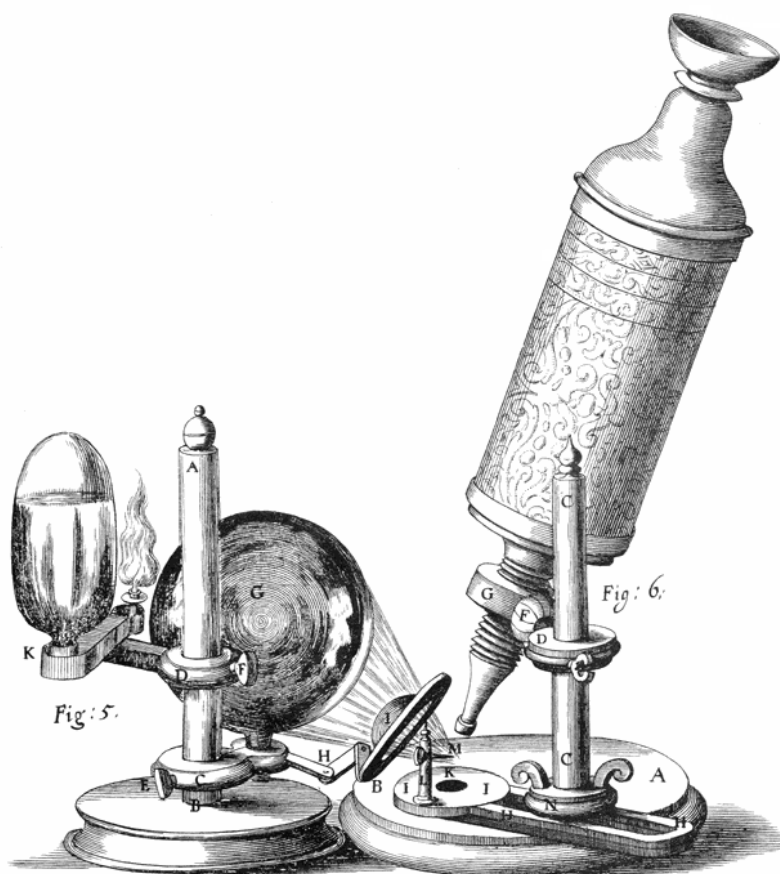
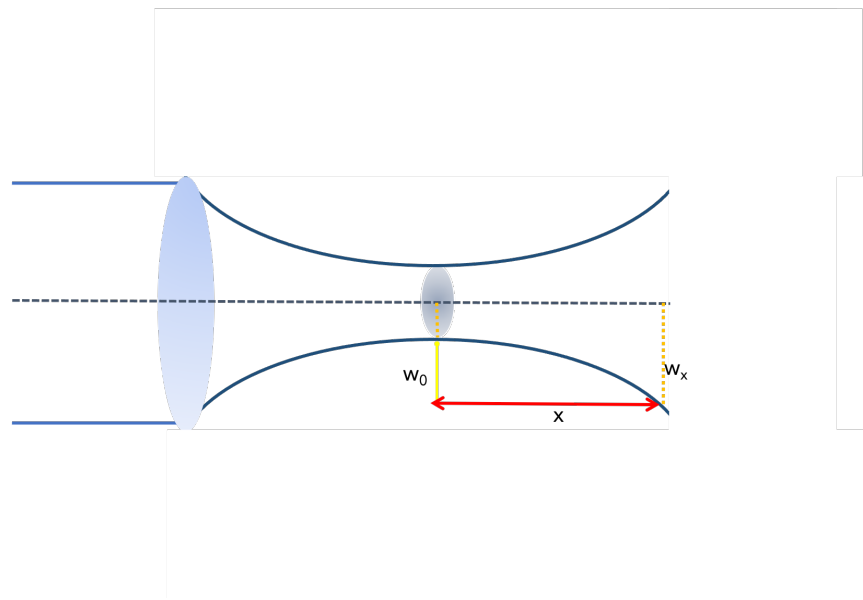


Fig. 2: El microscopio de Hooke así publicado en Micrographia.

Cuando la luz es enfocada por un objetivo del microscopio, la noción de convergencia de varios rayos de luz en un “punto focal” bien definido, falla debido a la dualidad *onda-*

*partícula* de la luz. En su lugar se tiene una “área focal” con un tamaño limite establecido por la difracción,  $w_0$ . El tamaño de esta área (*spot*) depende de la longitud de onda,  $\lambda$  y el radio del haz definido por el ángulo del cono de convergencia de la luz,  $w_x$ , según se indica en la ecuación 1 (que a su vez corresponde a la relación presentada en la figura 3). Para la ecuación, dicho ángulo a su vez es definido por la apertura numérica (AN) de la lente objetivo que se define como un número adimensional que caracteriza el rango de ángulos para los cuales el sistema recibe luz. El punto focal se puede disminuir usando longitudes de onda menores y objetivos con aperturas numéricas mayores, pero esta estrategia se ve frustrada al llegar a longitudes de onda  $< 350$  nm; ya que esta longitud de onda es incompatible para la imagenología de células vivas ya que estas longitudes corresponden al ultravioleta, el cuál daña el ADN de la células; y a que la apertura media del lente se ve técnicamente limitada a  $70^\circ$  [2, 4].

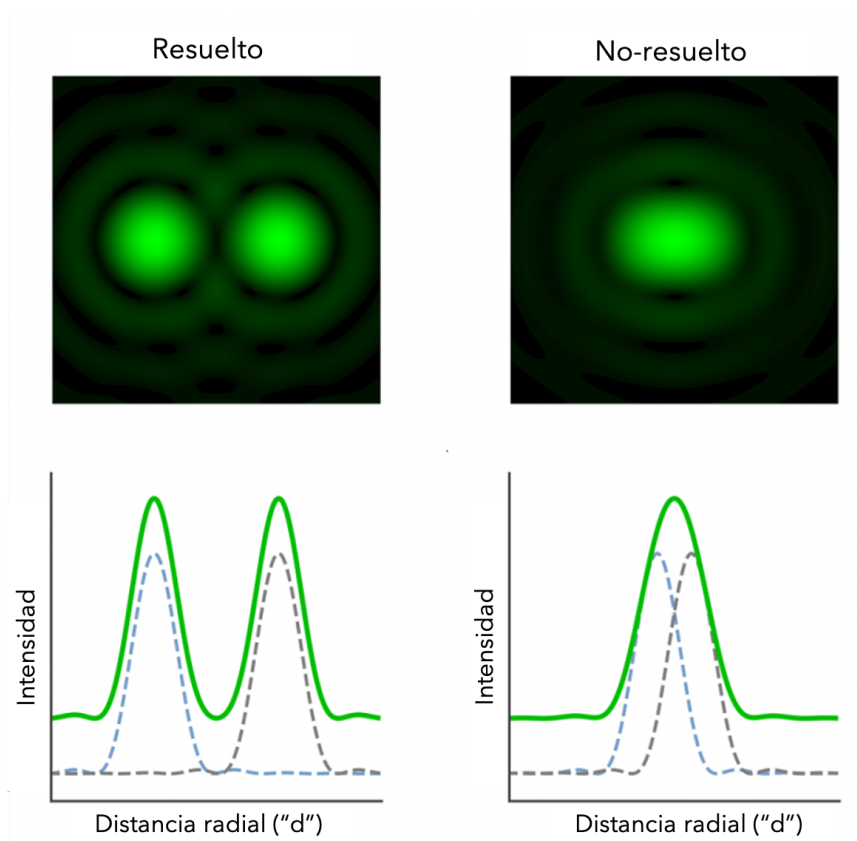


**Fig. 3:** Punto de enfoque de un sistema óptico.

$$w_0 \cong \frac{\lambda \cdot x}{\pi \cdot w(x)} \quad (1)$$

Algo similar ocurre en la muestra en si. Suponiendo que la muestra son dos puntos emisivos (por ejemplo, dos moléculas fluorescentes) lo que se observará en el plano focal que puede formar el objetivo son los perfiles de intensidades de ambos puntos. Poder distinguir entre estos perfiles de intensidades (spots) significa que ambos puntos están resueltos entre si, según se ilustra en la figura 4. El perfil de intensidad así producido por emisores individuales se le conoce como la función de dispersión de punto, FDP, del

microscopio- un patrón de interferencia bidimensional provocado por la convergencia de la luz producida por el objetivo cuya parte central se le conoce como discos de Airy [5, 6]. Como consecuencia, se tienen dos puntos emisivos separados por una distancia,  $d$ , que es menor al ancho de la FDP y por lo tanto aparecerán como un solo perfil de intensidad, es decir, dejarán de estar resueltos entre sí [7]. La mayoría de los componentes moleculares de las estructuras subcelulares son más pequeñas que los límites de difracción y por lo tanto son difícil de resolver.



**Fig. 4:** Discos de airy. La función de dispersión de punto típica de un microscopio. La figura muestra el traslape entre dos FDP. La distancia “ $d$ ” entre ellos determina si ambos están resueltos entre sí. [8]

Una de las técnicas más importantes que tratan de llegar a los límites de difracción (según la descripción de Abbe[2]) es la microscopía confocal. La microscopía confocal se centra en el uso de técnicas de separación espaciales, que eliminan luz proveniente de sitios fuera de foco, permitiendo un seccionamiento óptico y por lo tanto, lograr imágenes tridimensionales. Aunque esta técnica junto a la microscopía multifotónica facilitó una imagenología tridimensional esta no mejora la resolución óptica respecto al límite de difracción. En el mejor de los casos, estas técnicas tienen una resolución de aproximadamente 250 nm en el plano focal ( $xy$ ) y solo 500-800 nm en el eje óptico ( $z$ )[3].

Los microscopios de fluorescencia pueden detectar moléculas individuales si estas moléculas existen lo suficientemente separadas entre sí. Poder discernir sondas fluorescentes espectralmente distintas no está limitado por la difracción. Por lo tanto, es importante no confundir la resolución por la sensibilidad de detección al nivel de molécula individual ni con la medición de distancias entre diferentes sondas fluorescentes [8]. El problema radica en mejorar la habilidad de un microscopio en distinguir sondas fluorescentes iguales en regiones de alta densidad molecular. *Vencer el límite de resolución, por lo tanto, es mucho más preferible que vencer a la difracción*[9]. Se abundará en estos conceptos en secciones subsiguientes.

## 0.2. Microscopía multifotónica.

En la microscopía bifotónica se utilizan cromóforos orgánicos que pueden absorber dos fotones. A diferencia de la absorción monofotónica, la absorción bifotónica es un proceso no lineal respecto a la intensidad de la luz incidente ya que existe una relación cuadrática entre la intensidad de la luz de excitación y la probabilidad de un evento de absorción de dos fotones. Esta relación no lineal implica que la excitación de estos cromóforos decaerá de manera exponencial en áreas donde la intensidad del haz disminuye, por lo tanto, la excitación bifotónica sucederá solamente en el punto focal del microscopio (el volumen con el máximo de intensidad definido por el Rango de Rayleigh del sistema óptico [3]). Esta hiperlocalización de excitación le brinda su importancia a la microscopía multifotónica ya que da una microscopía que puede:

- Excitar fluoróforos de manera muy precisa y lograr una discriminación sobre las señales de emisión fuera del punto focal del objetivo.
- Reducir el fotodaño y fotoblanqueamiento (*Photobleaching*) de la muestra.
- Lograr una microscopía a distintas profundidades de las células o los tejidos.

El diseño de cromóforos con índices de absorción bifotónica importantes, como se verá más tarde, es un campo sumamente estudiado por el potencial que este tiene sobre el campo de la microscopía. El diseño de cromóforos y el control que se puede tener sobre sus estados electrónicos ha resultado en avances sumamente importantes en el área de microscopía. Este control logró circunvenir el límite de difracción y crear las primeras

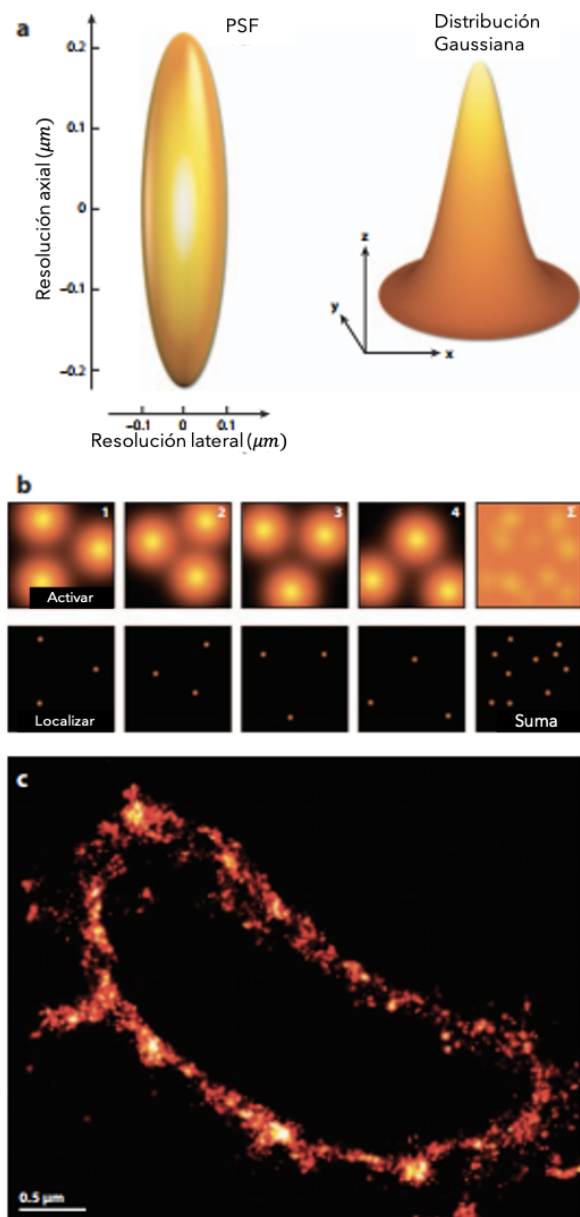


técnicas de superresolución (ver abajo). Cabe mencionar que en esta tesis no se esta replanteando la microscopia bifotónica, sino que se plantea una nueva tecnología basada en la fotoactivación de sondas mas que en su excitación bifotónica directa.

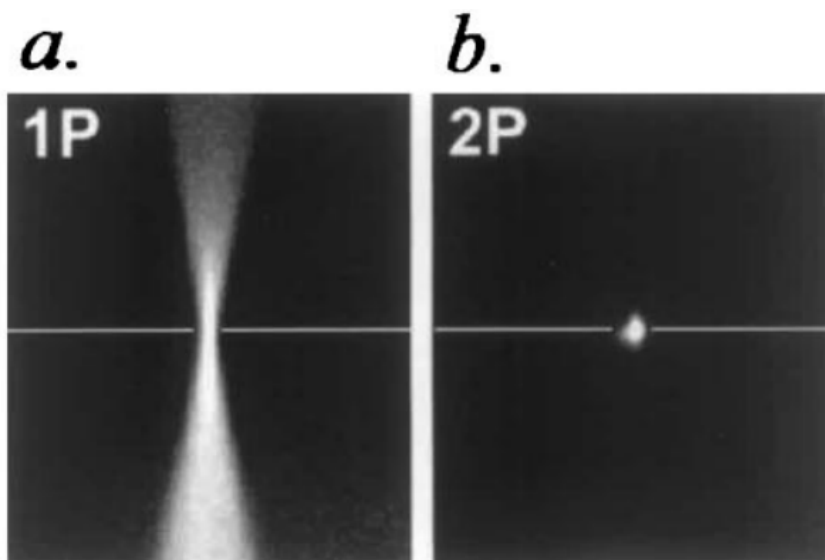
### 0.3. *PALM*, Photoactivated localization microscopy

La técnica *PALM* (por sus siglas en inglés *Photoactivated Localization Microscopy*) desarrollada por Eric Betzig en el 2006 responde a la limitación intrínseca de la microscopia óptica al combinar un modo de adquirir imágenes de manera secuencial con el encendido y apagado de fluoróforos individuales[10]. Esta toma de imágenes secuenciales donde los centros geométricos de las señales espaciales de cada fluoróforo producen una imagen final que depende sólo de la *precisión de localización del fluoróforo individual* resultando así en una imagen reconstruida que se conoce como superresolución.

Las moléculas susceptibles a la fotoactivación son un objeto de interés por la diversidad e importancia de sus aplicaciones [11]. Directamente relacionado con esta tesis, es que dicha activación ocurra a través de un proceso óptico no lineal, ya que la dependencia a la intensidad fotónica para la ocurrencia de este evento da en consecuencia un proceso altamente controlado y localizado. En el área de microscopia, las moléculas susceptibles a la fotoactivación han sido cruciales en el desarrollo de técnicas de superresolución como *PALM*, sin embargo, ésta se sigue viendo limitada por la excitación poco discriminatoria de los eventos de fotoactivación cuando la fotoconversión se da por un proceso de óptica lineal. A pesar de que el haz de excitación cuente con una intensidad,  $I$ , la transición entre el estado basal y el estado excitado del fluoróforo se da en todo el volumen que atravieza el haz de luz de fotoconversión, imposibilitando un control espacial que pueda resultar en una microscopía de superresolución tridimensional. Con un diseño molecular que permita una absorción bifotónica por las sondas foto-transformables se podría lograr una fotoactivación altamente localizada y una microscopía de súper resolución en 3-D *in vivo*. Éste es el objetivo de la presente tesis.



**Fig. 5:** PALM: El conocimiento que la imagen de una molécula origina de un solo punto permite estimar el centro y, por tanto, las coordenadas axiales y laterales de esta misma (4a). Si esta molécula puede fotoactivarse, entonces es posible activar o “encender” una fracción de ellas, localizar su centro y subsecuentemente fotoblanquearlas o “apagarlas” (4b). Este procedimiento se repite las veces necesarias hasta que una imagen se pueda recrear de estas coordenadas (4c). Imagen adaptada de [12]



**Fig. 6:** Hiperlocalización de una excitación bifotónica. Existe una relación exponencial entre la excitación y la intensidad de la luz, asegurando que este proceso solo ocurra en regiones de alta intensidad. (a) Excitación monofotónica, dada en todo el volumen por donde atraviesa el haz de luz de fotoconversión (b) Excitación bifotónica, dada solo en el área focal del objetivo del microscopio. Imagen tomada de [13].

Es así como se ubica la importancia de la tesis a presentarse. La idea de una microscopía *PALM* en *3D* requiere de la implementación de un nuevo dispositivo óptico; es decir, un microscopio diseñado con un esquema de excitación bifotónico capaz de fotoactivar y transformar sondas moleculares y que opere en conjunción con un esquema tipo confocal para la formación de las imágenes. A continuación, se enunciarán puntualmente los requisitos para construir un microscopio con estas características y se presentara el microscopio construido. Por último, se redactó una guía para realizar este tipo de microscopía que servirá como un documento de consulta para futuros usuarios del nanoscopio de fluorescencia del Laboratorio de Espectroscopia Láser de la UNAM (ver Anexo A).

### 0.3.1. Objetivo

La construcción de un microscopio que pueda formar imágenes confocales o de campo amplio y lograr una microscopía con cromóforos fotoactivables por evento de absorción de dos fotones donde la construcción óptica del microscopio sea capaz de *fotoactivar* y *fototransformar* sondas moleculares que den origen a cromóforos individuales. Lo anterior dando pie a la posible formación de imágenes tridimensionales *PALM* con los fluoróforos así formados.

# Microscopía Óptica

---

Existen distintos tipos de microscopía de luz, desde la microscopía de contraste de fase donde las diferencias en índices de refracción en las distintas partes de la muestra provocan un desfase con las ondas de luz que iluminan la muestra y crean un contraste en la iluminación para formar una imagen hasta la microscopía polarizada donde la adición de dos polarizadores permiten únicamente el paso de luz polarizada para la formación de una imagen[14, 15]. Sin embargo, es difícil igualar el impacto y la sensibilidad que tiene la microscopía de fluorescencia en los campos de la biología y de las ciencias biomédicas[3, 16, 17].

La microscopía de fluorescencia se ha vuelto una herramienta indispensable ya que tiene atributos que otros tipos de microscopía carecen. Una gran cantidad de especímenes demuestran en sí auto fluorescencia al ser excitados a una longitud de onda específica—fenómeno el cuál ha sido explotado en ramas tan diversas como la botánica o la industria de materiales semiconductores [3]. El estudio de tejidos animales y patógenos, ha resultado en la innovación y síntesis de fluoróforos o sondas moleculares, las cuales pueden ser excitadas a longitudes de onda específicas y que emiten en longitudes de onda definidas. Estas pueden demostrar afinidades por organelos o sensibilidad ante procesos intracelulares (afectando su emisión y presencia), brindando así información importante sobre el sistema en el que se encuentra. La aplicación de fluoróforos a permitido la identificación de células y sus componentes con un grado de especificidad muy particular[16].

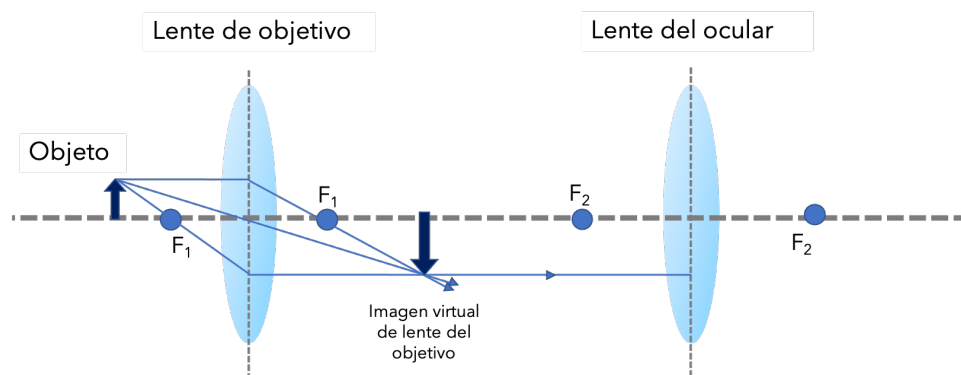
## 1.1. Microscopía de luz transmitida

El arreglo más sencillo de un microscopio se presenta en la figura 1.1. Esta, así como los esquemas a presentar están esbozados con la aproximación de rayos paraxiales. Al diseñar instrumentos ópticos es necesario determinar el camino de la luz con una mayor exactitud que la dada por la óptica Gaussiana. Esto puede hacerse por medio de análisis algebraico, tomando en cuenta términos de orden superior en términos de la expansión de la función característica o bien, se puede determinar la trayectoria del rayo con la ayuda de geometría elemental y la aplicación sucesiva de la ley de refracción. A esta última se le denomina *trazo de rayos* [18].

### 1.1.1. Rayos paraxiales

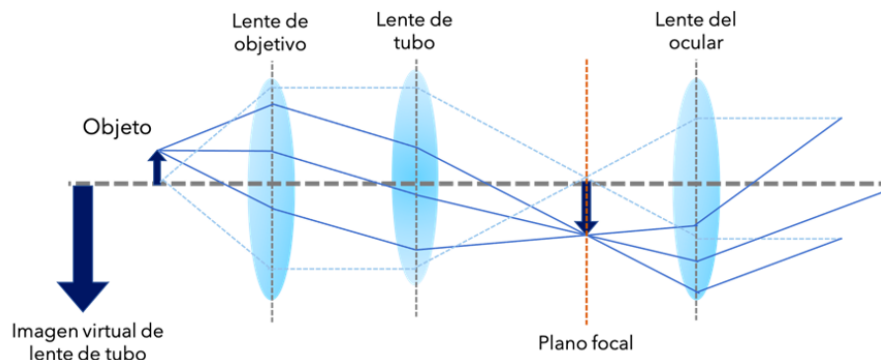
Si la inclinación de un rayo con respecto a su eje es suficientemente pequeña, los senos de varios ángulos pueden ser reemplazados por los ángulos en sí. Es decir:

$$\text{sen } \theta \approx \theta, \tan \theta \approx \theta, \cos \theta \approx 1 \quad (1.1)$$



**Fig. 1.1:** Microscopio de luz

La figura 1.1 muestra con gran simplicidad el esquema de trazado de rayos de un microscopio. El microscopio consiste en dos lentes biconvexas, la lente de objetivo y la lente ocular con distancias focales  $F_1$  y  $F_2$  respectivamente. El objeto se encuentra antes de  $F_1$  creando el aumento de éste cuando el par de lentes expande y reenfoca la imagen del objeto después de  $F_1$ . Del lado opuesto del lente, la figura 1.2 muestra otro tipo de arreglo que incluye una lente de tubo donde el objetivo forma una imagen al infinito



**Fig. 1.2:** Microscopio de luz

(imagen virtual del objetivo). Esta imagen virtual necesita una segunda lente (la lente de tubo) para formar la imagen del objeto antes de la lente del ocular. Este esquema ocupa objetivos cuyo diseño detallado contiene una llamada “corrección al infinito” que previene aberraciones ópticas al introducir otros elementos ópticos como polarizadores o iluminadores de epifluorescencia.

## 1.2. Fluorescencia

Este tema ya ha sido abordado en gran profundidad en una cantidad significativa de recursos dado que es un tema fundamental en una cantidad de campos, no solo en el tema de la microscopia [19, 20]. Brevemente, la fluorescencia consiste en la absorción de un fotón de cierta energía, la excitación electrónica a un estado superior y finalmente, la relajación en energía con la emisión de un fotón de menor energía (derivado del desplazamiento de Stokes). Estas transiciones moleculares se ilustran en el diagrama de Jablonski en la figura 1.3.

## 1.3. Microscopía de Campo Amplio.

Considerado el diseño básico de un microscopio de fluorescencia, el microscopio de campo amplio es una herramienta útil y simple para el estudio de sistemas celulares y distintos especímenes. El microscopio consiste en una fuente de excitación la cual es dirigida a la muestra por un espejo dicróico (este espejo es tal que permite la reflexión

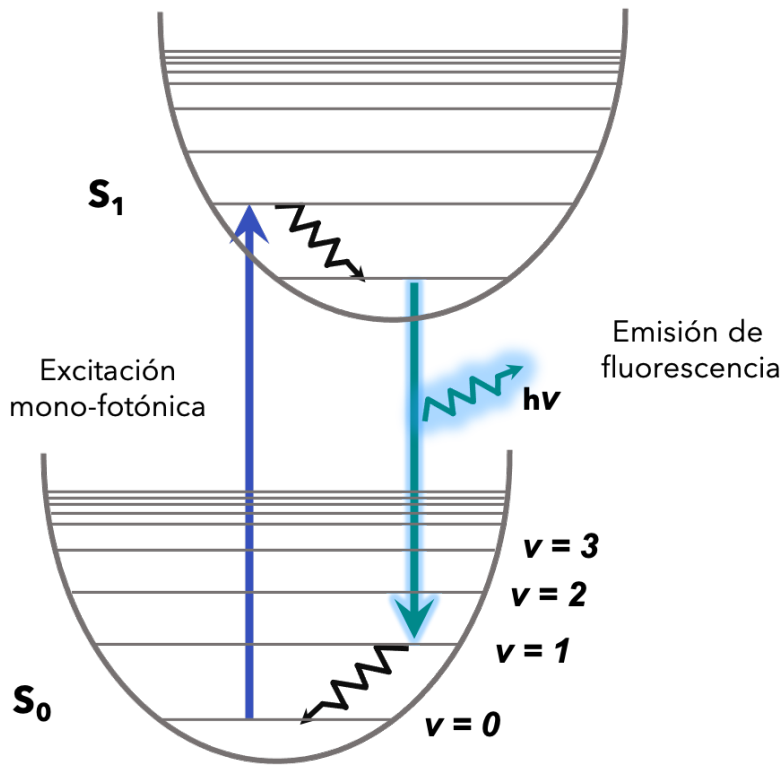


Fig. 1.3: Diagrama de Jablonski ilustrando el proceso de fluorescencia

total de la longitud de onda de excitación y la transmisión de la longitud de onda de emisión). Subsecuentemente, esta es enfocada por una lente auxiliar al plano focal anterior del objetivo (*backplane*); con ello, el objetivo colima (o re direcciona las trayectorias de los rayos de excitación para que lleguen a la muestra con trayectorias paralelas) [21]. La muestra es excitada por la fuente de excitación y emite una señal de fluorescencia que es captada por el mismo objetivo y llevada al detector para formar la imagen magnificada de la muestra (de acuerdo a la figura 1.4, donde en lugar de que se ocupen lentes oculares, se colocan detectores bidimensionales tipo CCD en éste plano focal). Una variación importante es la posibilidad de tener distintos campos de visión (o *field of view (FOV)*), ya sea por mover la muestra con ayuda de un nanoposicionador (sobre este se monta la muestra y ésta se mueve de forma automatizada y precisa) o bien, el espejo dicroico se monta sobre una pieza óptica automatizada y que puede moverse para direccionar el haz de excitación.

Es importante resaltar que, a pesar de la simplicidad del diseño, existe la proyección de la luz fuera de foco sobre el plano de imagen. Esto resulta en imágenes con poco contraste y una resolución espacial pobre.

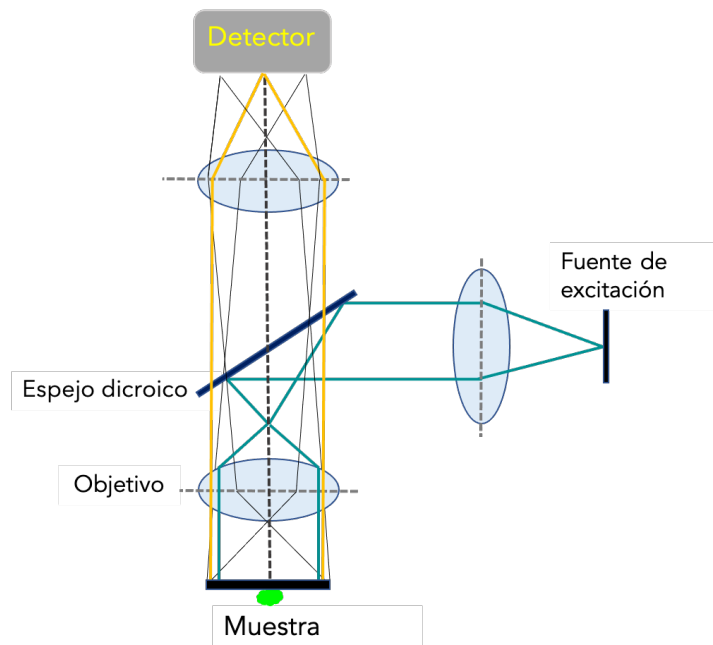


Fig. 1.4: Trazo de rayos de un microscopio de Campo Amplio

## 1.4. Microscopía Confocal.

Aunque la luz fuera de foco no presenta mucho problema en la toma de imágenes de muestras delgadas (aprox.  $20 \mu m$ ), la presencia de emisores en planos anteriores y posteriores al plano focal limita el tipo de muestra que puede ser observada con un microscopio de campo amplio. La microscopía confocal resuelve este problema [22].

Existen dos principales diferencias entre el arreglo confocal y el arreglo de campo amplio; primeramente, la lente auxiliar en el arreglo confocal colima la luz de excitación para que sea enfocada por el objetivo hacia la muestra a diferencia del arreglo de campo amplio donde el objetivo colima la luz de excitación que fue enfocada por la lente auxiliar en el plano focal anterior o distal del objetivo. Por lo tanto, la excitación en el arreglo confocal ocurre en el punto focal del objetivo, no en toda la muestra (como en el arreglo de campo amplio) esto resulta en una consecuencia importante en el camino de detección. A diferencia del arreglo de campo amplio, el arreglo confocal tiene una apertura micrométrica (*pinhole*) que bloquea cualquier haz de emisión que no sea proveniente del área focal del objetivo. Esta “limpieza” óptica permite una microscopía a profundidad variable.

La resolución de un microscopio confocal de fluorescencia es significativamente mejor que un microscopio de epifluorescencia (campo amplio o *widefield*). Los microscopios



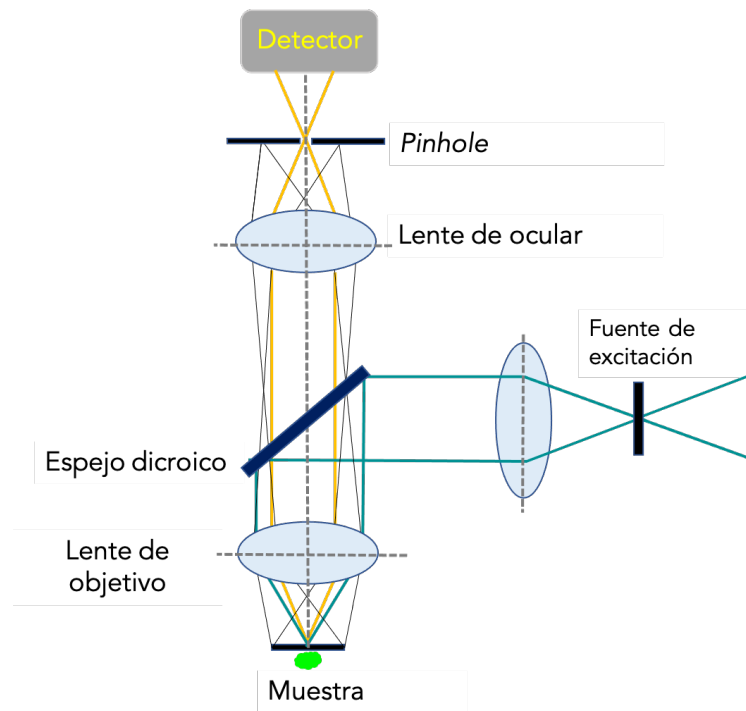


Fig. 1.5: Trazo de rayos de un microscopio de Campo Confocal

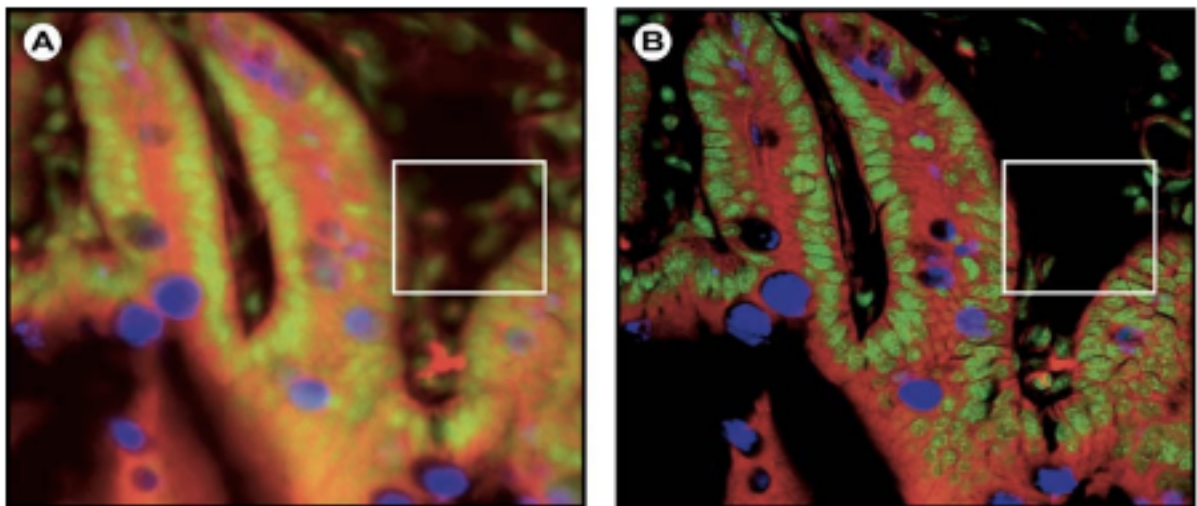


Fig. 1.6: Comparación de imágenes por arreglos de campo amplio (A) y confocal (B) . Imágenes de Campo Amplio (A) y Confocal (B) de riñón de ratón (tejido teñido). En la imagen de campo amplio se pueden apreciar los planos fuera de foco que interfieren con la imagen del plano focal; los colores de los organelos teñidos con distintas sondas fluorescentes aparecen mezclados. Por otro lado, se aprecia una mejora significativa en nitidez y contraste en la imagen confocal (B). Es notable la desaparición de la luminosidad que se origina en planos fuera de foco en el enmarcado blanco de las figuras. [23]

confocales tienen un foco efectivo 40% más pequeño ya que la habilidad de enfoque del lente de objetivo es usada dos veces: la primera para enfocar el haz de excitación a un foco sobre la muestra; y la segunda, con ayuda del lente de tubo de microscopio, para

enfocar la fluorescencia a un detector [24]. Con ello, a diferencia de un microscopio de epifluorescencia, un microscopio confocal ilumina y detecta de manera selectiva un punto espacial de la muestra. La detección espacial selectiva se logra por la apertura donde los fotones emitidos fuera del foco de la fuente de excitación son descartados; es decir, se logra una mejor resolución al eliminar fotones provenientes no solo de los planos superiores e inferiores al plano focal, sino fotones del *plano* focal que no se encuentren en el *punto* focal [24].

El arreglo confocal, a pesar de no poder vencer el límite de resolución redefinió los límites de la microscopía de fluorescencia y es el arreglo por excelencia para la microscopía de alta resolución espacial [25].

### 1.5. Microscopía de dos fotones

En 1931 Maria Göppert-Mayer predijo procesos de excitación multifotónicos [26], este efecto foto físico fue verificado 32 años más tarde por Kaiser y Garret [27]. La excitación bifotónica es un proceso donde un fluoróforo es excitado por la absorción simultánea de dos fotones. La microscopía bifotónica (MB) tiene 4 propiedades importantes:

1. Reduce enormemente el fotodaño celular y permite estudios in vivo.
2. Permite el estudio de especímenes turbidos con resoluciones inferiores a la micrométrica.
3. La MB permite una alta sensibilidad al producir la imagen ya que esta elimina la contaminación de la señal de fluorescencia por la luz de excitación dado que hay pocos fluoróforos con coeficientes de absorción bifotónica suficientemente alto.
4. Con la excitación por dos fotones, en general, se pueden iniciar reacciones fotoquímicas en un volumen del orden de un femtolitro en células y tejidos [28].

#### 1.5.1. Teoría de la absorción bifotónica

La interacción luz-materia provoca una cantidad vasta de fenómenos, algunos con una mayor frecuencia de ocurrir que otros (la probabilidad en sí esta ligada con la intensidad

de la luz y las propiedades de esta). Uno de ellos es la absorción bifotónica cuya teoría fue desarrollada por Göppert-Mayer [29, 30]. Brevemente, la excitación electrónica se induce por una interacción entre el campo electromagnético y el momento dipolar molecular. El proceso se describe con la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo donde el Hamiltoniano contiene un término de interacción del campo con el dipolo eléctrico:

$$\vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} \quad (1.2)$$

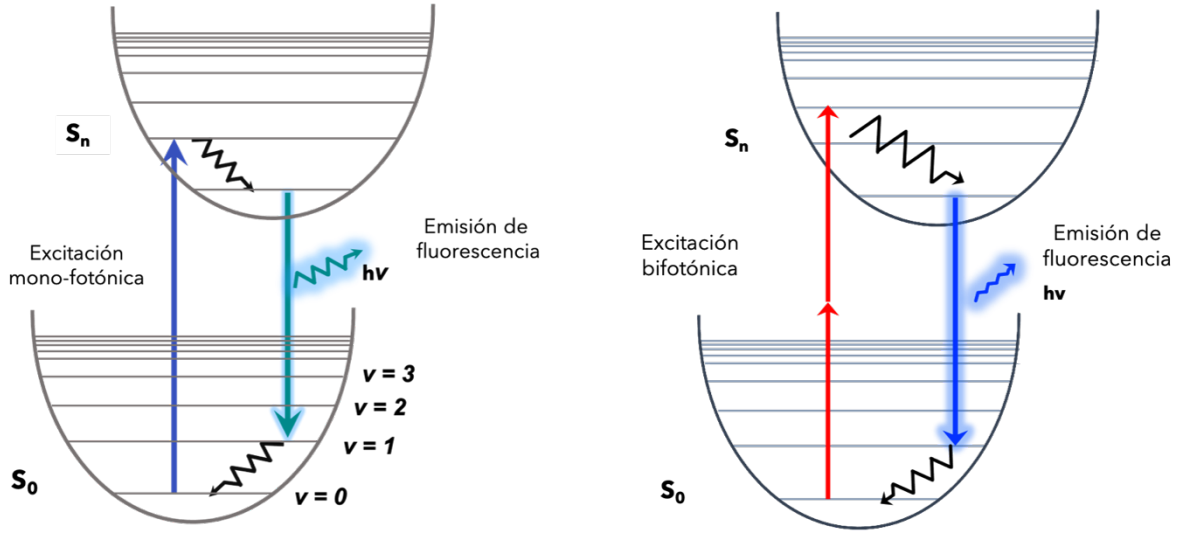
Donde  $\vec{E}_\gamma$  es el vector del campo eléctrico y  $\vec{r}$  es el operador posición. Esta ecuación se puede resolver usando la teoría de perturbaciones dependientes del tiempo. La aproximación de primer orden corresponde a una excitación monofotónica, y las transiciones multifotónicas son representadas por aproximaciones de orden superior. En el caso de la excitación bifotónica, la probabilidad de que ocurra una transición entre un estado basal  $|g\rangle$  y un estado final  $|f\rangle$  se da por la siguiente proporción:

$$P \sim \left| \sum_m \frac{\langle f | \vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} | m \rangle \langle m | \vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} | g \rangle}{\varepsilon_\gamma - \varepsilon_m} \right|^2 \quad (1.3)$$

Donde  $\varepsilon_\gamma$  es la energía fotónica asociada con el vector de campo eléctrico  $\vec{E}_\gamma$ , y  $\varepsilon_m$  es la diferencia energética entre un estado  $m$  y el estado basal. Es importante notar que el operador del dipolo tiene una paridad opuesta (la absorción de un fotón cambia la paridad del estado), y el momento de transición monofotónico  $\langle f | \vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} | i \rangle$  determina la paridad opuesta de los estados iniciales y finales cuando la absorción es lineal (monofotónica), sin embargo, el momento de transición bifotónico, al involucrar el producto de dos elementos matriciales con un estado virtual intermedio ( $i$ ),  $\langle f | \vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} | i \rangle \langle g | \vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} | i \rangle$ , permite transiciones entre estados con la misma paridad.

La excitación bifotónica de una molécula es un proceso de óptica no lineal que involucra la absorción simultánea de dos fotones cuya energía es suficiente para inducir una transición electrónica entre el estado basal y algún estado excitado. Una comparación entre una absorción monofotónica y bifotónica se muestra en la figura 1.7.

Como la excitación bifotónica depende cuadráticamente del flujo de fotones, la absorbancia de los 2 fotones sólo ocurre cerca del máximo de la función de dispersión puntual (FDP). La función de dispersión puntual describe la distribución de la luz en el plano focal. Es un patrón de interferencia bidimensional provocado por la convergencia de

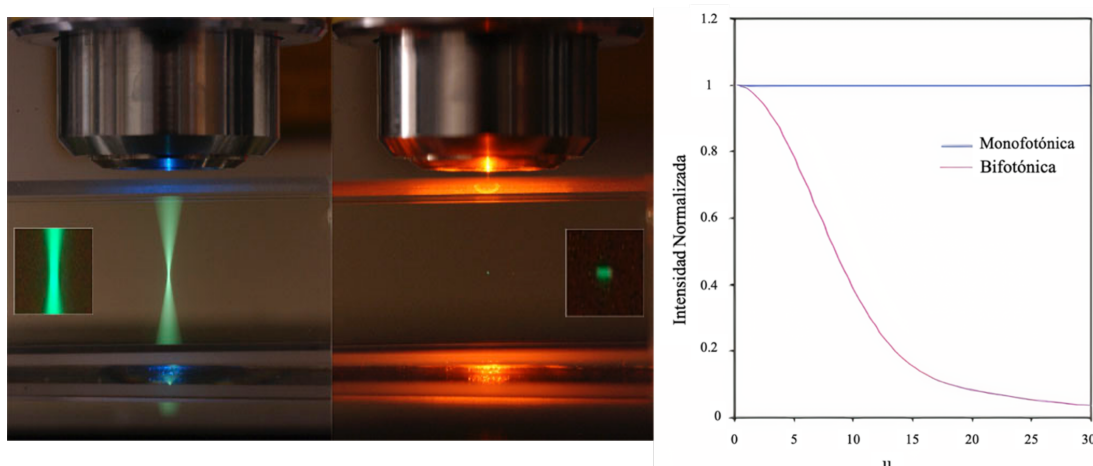


**Fig. 1.7:** El diagrama de Jablonski para excitaciones mono (izq) y bi (derecha) fotónica. Las excitaciones ocurren entre el estado basal  $S_0$  y los niveles vibracionales de un estado excitado. La excitación monofotónica ocurre por la absorción de un fotón. La transición ocurre entre estados con paridad opuesta, cumpliendo las reglas de selección. La excitación bifotónica ocurre por la absorción de dos fotones de baja energía. La transición ocurre entre estados con la misma paridad. Después del respectivo proceso de excitación, el fluoróforo puede tomar distintas vías de relajación; el diagrama muestra la fluorescencia.

la luz producida por el objetivo [5, 6]. El perfil espacial característico en el plano focal para un objetivo con apertura numérica  $NA = \sin\alpha$  (donde  $\alpha$  es el ángulo de la apertura del lente):

$$I(u, v) = \left| 2 \int_0^1 J_0(v\rho) e^{-\frac{i}{2}u\rho^2} \rho d\rho \right|^2 \quad (1.4)$$

Donde  $J_0$  es la función de Bessel de orden cero,  $u = 4k \sin^2(\alpha/2)z$  y  $v = k \sin(\alpha)r$  son las coordenadas axiales y radiales, respectivamente, normalizadas al número de onda,  $k = 2\pi/\lambda$ , mientras que el término  $\rho$  es un término que marca el cambio a coordenadas circulares. Este cambio de coordenadas es necesario ya que el perfil espacial de intensidad se deriva de un problema particular de la integral Huygens-Fresnel (tratado más adelante) [4, 31]. Lo crucial de este perfil, es el cambio en él para un microscopio con excitación *bifotónica*. El perfil de intensidad cambia a  $I^2(u/2, v/2)$ . Cambio que le dará a la microscopía bifotónica una hiperlocalización como la que se muestra en la figura 1.8 y se ilustra en el decaimiento exponencial de la probabilidad de excitación mostrado en la gráfica.

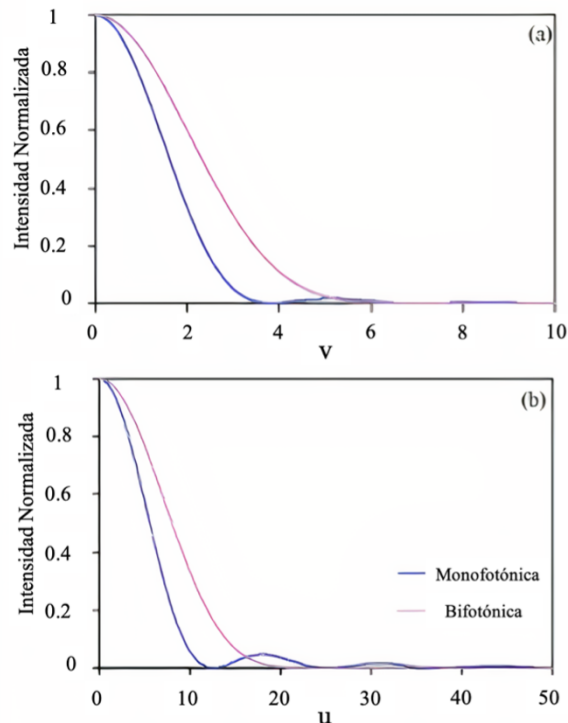


**Fig. 1.8:** Excitación monofotónica v. bifotónica: La muestra es una disolución diluida de fluoresceína. A la izq. un láser de 488 nm excita un volumen entero de muestra (incluyendo fuera del foco). A la derecha, un láser de infrarrojo excita un área micrométrica de muestra – el área (punto) focal del objetivo. Imagen tomada de [32]. Gráfica: Fluorescencia total generada en el plano z. La cantidad esta graficada en función de la distancia del plano focal. En el caso monofotónico, no hay variación en intensidad de fluorescencia. En el caso bifotónico, la intensidad experimenta un decaimiento exponencial al moverse fuera de foco[27].

## 1.5.2. Hiperlocalización del volumen de excitación

Un detalle clave en la microscopía bifotónica es que el volumen de excitación es del orden de un femtolitro. La ecuación 1.3 (y que se reafirma por la ecuación 1.4) lleva a una relación no lineal entre el proceso de absorción y la intensidad del láser. Esto implica que el fenómeno de absorción bifotónico ocurre únicamente en el foco del objetivo, donde el flujo de fotones es máximo (ver figura 1.8).

La importancia de la microscopía bifotónica radica en la discriminación sobre las señales de emisión fuera del foco. La fluorescencia generada en planos superiores e inferiores del foco es constante para una excitación monofotónica. Por otro lado, para la excitación monofotónica éste no es el caso. La fluorescencia generada fuera del foco (cuando la excitación es bifotónica) cae exponencialmente, demostrando que el proceso de absorción se da solo en el foco; esto se muestra en la gráfica de la figura 1.9. Esta hiperlocalización resulta en un contraste de imagen mejorado y una discriminación en señal de emisión a distintas profundidades. Este control sobre la localización de excitación es importante primeramente porque la región de foto interacción disminuye significativamente, previniendo el fotodaño y el fotoblanqueamiento de la muestra. En segundo lugar, se puede iniciar una reacción química fotoinducida en volúmenes tridimensionales resueltos – precisamente el objetivo del diseño de la presente tesis [33, 34].



**Fig. 1.9:** Comparación entre la FDP monofotónica y la FDP bifotónica en las direcciones (a) radiales y (b) axiales. En estas figuras  $u$  y  $v$  son coordenadas normalizadas al número de onda  $k = 2\pi/\lambda$  sobre las direcciones radiales y axiales [27]

## 1.6. Láseres

La microscopia bifotónica se estableció de manera teórica en el año de 1978 por Sheppard y Kompfner [35] y se pudo lograr hasta 1990 por Denk, Strickler y Webb por el uso de un láser de pulsos ultracortos [33]. El proceso de absorción bifotónico ocurre en bajas probabilidades y solo en medios donde la intensidad del láser es máxima. Tener un pulso ultracorto tiene un efecto significativo sobre la potencia instantánea por pulso y la probabilidad que dos fotones puedan ser absorbidos por una molécula. En los años 80s se empezaron a lograr cavidades ópticas con pulsos ultra breves. Los medios activos o de amplificación (medio donde se produce la amplificación óptica – o donde ocurren las primeras siglas de LASER: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) variaban pero el material más trascendente fue el cristal de Titanio:Zafiro.

Fue hasta 1986 cuando el cristal de Titanio:Zafiro se introduce como un candidato para ser el medio activo de un láser [36, 37]. El material presentó un posible laseo desde 700 nm hasta 1100 nm y una densidad de almacenamiento de energía bastante

alta: características que permitirían a este material revolucionar el mundo de la óptica, la espectroscopía y microscopía. Para los propósitos de la presente tesis se utilizó un láser sintonizable de Ti:Za con una potencia de salida de 300 mW, una frecuencia de repetición de 100 MHz y pulsos de 150 fs (la cavidad óptica se presentará más a detalle en secciones subsiguientes). Estas características resultan en pulsos de 3 nJ, con una potencia instantánea de 20 kW y posibilitan una microscopia de dos fotones.

### 1.7. Moléculas con índices de absorción bifotónicos elevados.

La microscopía bifotónica ha impulsado el desarrollo y estudio de moléculas capaces de presentar una absorción bifotónica [38, 39]. Un fluoróforo que pueda excitarse de manera monofotónica en una longitud de onda usualmente puede excitarse con dos fotones al doble de longitud de onda ( $2\lambda$ ). Es importante recordar que la absorción monofotónica y la absorción bifotónica son procesos cuánticos diferentes y obedecen reglas de selección diferentes. Por lo tanto, el espectro de excitación bifotónico de un fluoróforo escalado a la mitad usualmente no reproduce el espectro de excitación monofotónico [40]. Por otro lado, el espectro de emisión del fluoróforo se mantiene independiente al mecanismo de excitación ya que la molécula se relaja por la misma vía vibracional antes de emitir. Es importante notar que los fluoróforos diseñados para excitaciones monofotónicas no necesariamente están optimizados para manejar una excitación bifotónica y viceversa.

Como es posible imaginar, el diseño y síntesis de moléculas con posibilidades de absorción bifotónica es un campo sumamente estudiado [41-47]. Existen diversas estrategias para la síntesis de cromóforos con índices de absorción bifotónica, pero primero es necesario establecer los fundamentos para poder llegar y comprender las características que tienen que presentar éstos cromóforos para poder absorber dos fotones; como la antena cianínica IR 780 usada en el diseño del fluoróforo AntOIR.

Usando suposiciones equivalentes a aquellas en la ley de Beer-Lambert para absorciones monofotónicas, la atenuación de un rayo de luz sólo por una absorción bifotónica se da por:

$$\frac{\partial I}{\partial z} = -Na_2I^2 = -N\delta FI \quad (1.5)$$

Donde  $I$  es la intensidad,  $z$  es la distancia dentro del medio,  $N$  es el número de moléculas por unidad de volumen, y  $a_2$  es el coeficiente molecular para la absorción bifotónica. La intensidad también se puede expresar como un flujo de fotones:

$$F = \frac{I}{h\nu} \quad (1.6)$$

Donde  $h\nu$  es la energía del fotón y la ecuación tiene unidades de fotones  $s^{-1}cm^{-2}$ . Para este caso, se utiliza el coeficiente de  $\delta$  y se reporta con unidades Göppert-Mayer ( $1 GM = 10^{-50}cm^4 s \text{ fotones}^{-1}molécula^{-1}$ ).  $\delta$  se conoce como la intersección eficaz de absorción bifotónica (*2PA cross-section*). Si la luz tiene una polarización lineal, el valor de  $\delta$  para una transición del estado basal  $g$  a un estado final  $f$  en el máximo de una banda de absorción bifotónica con una forma Lorentziana esta dada por[42]:

$$\delta_{\text{máx}} = \frac{2\pi h\nu^2 L^4}{\varepsilon_0^2 n^2 c^2} \left( \frac{1}{\Gamma} \right) P \quad (1.7)$$

Donde:

- $P$  es la ecuación (1.3)
- $\Gamma$  es el ancho total a la mitad del máximo de la banda de absorción bifotónica.
- $L = \frac{n^2+2}{3}$  (donde  $n$  es el índice de refracción) es un factor de modificación que representa el cambio que tiene el comportamiento de la onda electromagnética en un medio con respecto a cuando esta en el vacío.

Si definimos  $\mu_{kl}$  como la amplitud de oscilación del momento dipolar de transición inducido por un campo eléctrico de una onda de luz cuya frecuencia es igual a la diferencia de energía entre los estados  $k$  y  $l$ . En solución, los vectores asociados a  $\mu_{kl}$  rotan con la molécula entonces resulta necesario obtener un promedio de sus proyecciones. Obtener el promedio no es sencillo, pero este es igual a  $1/5$  si todos los momentos  $\mu_{gi}$  y  $\mu_{if}$  son paralelos. Esto último se cumple para la gran mayoría de cromóforos con absorciones bifotónicas grandes con lo que se puede escribir:



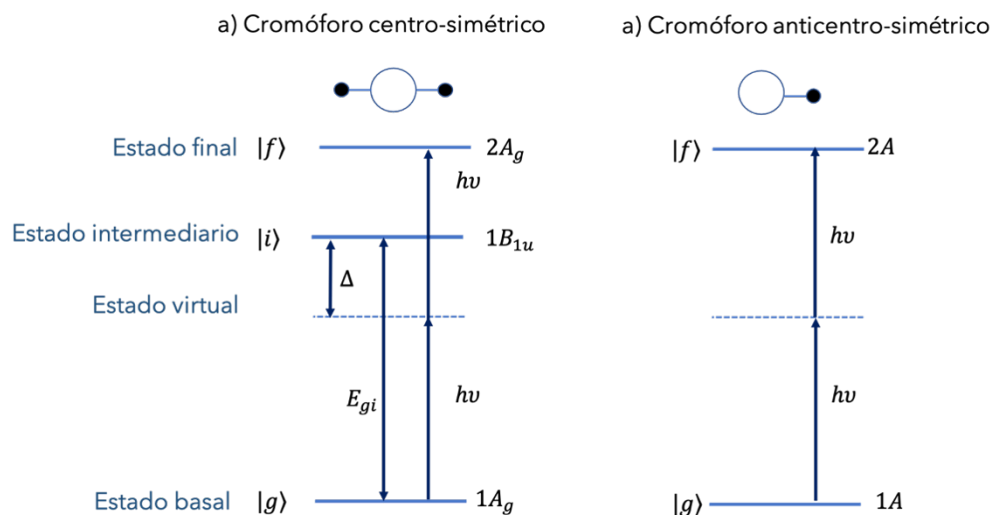
$$P = \frac{1}{5} \left[ \underbrace{\left( \frac{\Delta\mu_{gf}\mu_{gf}}{hv} \right)^2}_D + \sum_{i \neq f,g} \underbrace{\left( \frac{\mu_{gi}^2\mu_{if}^2}{(E_{gi} - hv)^2} \right)^2}_T \right] \quad (1.8)$$

Donde  $\Delta\mu_{gf}$  es el cambio en el momento dipolar estático del estado final con respecto al estado basal. El término D se le llama el término *dipolar* mientras que el término T es el término *bifotónico*. Pero como todos los momentos dipolares estáticos son cero y el término D está ausente en moléculas centro-simétricas la intersección efectiva de absorción bifotónica esta dominada por la interacción entre el estado basal y dos estados excitados. En estos casos, se puede reducir a una ecuación de un sólo término donde la intersección efectiva de absorción bifotónica se aproxima a:

$$\delta_{\text{máx}} \approx C \frac{\mu_{gi}^2\mu_{if}^2}{(E_{gi}/hv^{-1})^2\Gamma}. \quad (1.9)$$

Los tres estados “esenciales” de este modelo tienen simetrías alternas; el estado basal  $|g\rangle$  y el estado final  $|f\rangle$  son gerade (simétricos con respecto a su centro de inversión) mientras que el estado intermediario  $|i\rangle$  es ungerade (es decir, anti-simétrico). Tomando de ejemplo una molécula lineal (una molécula con simetría  $D_{2h}$ ) estos estados se escriben como  $1A_g, 1B_{1u}, 2A_g$  como se puede apreciar en la figura 1.10.

En absorciones bifotónicas (para moléculas centro-simétricas), la frecuencia  $\nu$  no está en resonancia con las transiciones g-i e i-f y crea un estado no estacionario (un estado virtual) que es una superposición (o mezcla) de  $|g\rangle$  y  $|i\rangle$ . Este estado virtual solo existe mientras la molécula esté experimentando el campo del primer fotón. La participación de  $|i\rangle$  con su paridad ungerade en esta superposición permite que el segundo fotón con frecuencia  $\nu$  induzca una transición al estado final con paridad gerade. Es por esto por lo que la transición  $1A_g - 2A_g$  esta permitida para una absorción bifotónica, pero prohibida para una transición monofotónica. Esta situación respecto a las reglas de selección es general para todos los cromóforos centro-simétricos. Para el caso no centro-simétrico, la transición g-f está permitida y el término D de la ecuación (1.8) es diferente de cero. En este caso,  $|f\rangle$  toma el rol de  $|i\rangle$  y la transición es posible para el caso monofotónico y el caso bifotónico. Las magnitudes de  $\mu_{gi}^2$  y  $\mu_{gf}^2$  son proporcionales a las fuerzas de oscilador monofotónicas y sus valores pueden ser calculados de un espectro de absorción. Pero  $\mu_{if}$  es difícil de determinar experimentalmente entonces, las estrategias para el diseño de

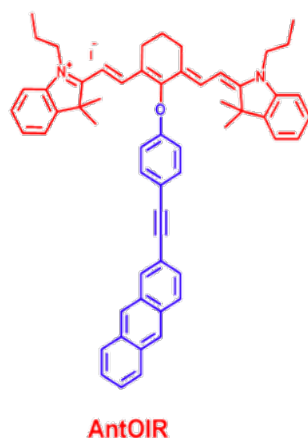


**Fig. 1.10:** Niveles energéticos para los estados “esenciales” para cromóforos a) centro-simétricos y b) no centro-simétricos. Los estados están señalados para moléculas con simetrías  $D_{2h}$  y  $C_2$  pero el diagrama generaliza las transiciones bifotónicas desde el estado basal para moléculas centro-simétricas y no centro-simétricas.

cromóforos con absorción bifotónica usualmente son empíricas y tienen que guiarse de cálculos teóricos de momentos de transición. Sin embargo, se tienen ciertos requerimientos para maximizar el índice  $\delta$  en un cromóforo:

1. Cadenas largas  $\pi$ -conjugadas y co-planares entre sí para asegurar una conjugación extendida que dará como resultado valores altos para  $\mu_{gi}$ ,  $\mu_{if}$  y  $\mu_{gf}$
2. Grupos donador-aceptor al centro y extremos de la molécula para también poder aumentar los valores de  $\mu_{gi}$ ,  $\mu_{if}$  y  $\mu_{gf}$ .
3. Cromóforos centro-simétricos que poseen una buena transición monofotónica y cercana a la longitud de onda de absorción bifotónica. El valor de  $\delta$  aumentará si  $\Delta$  es pequeño ( $\Delta = E_{gi} - h\nu$ ; ecuación 8; si  $\Delta = 0$  la absorción bifotónica será difícil de detectar porque la absorción monofotónica se traslapará con ella).
4. Cromóforos con bandas de absorción mono- y bifotónicas estrechas. Como el área de la banda de absorción bifotónica está fijada por el valor de  $S_{fg}$ , una banda de absorción estrecha ( $\Gamma$  pequeño) dará un valor  $\delta_{max}$  mayor (esta relación se puede observar en la ecuación 1.7). En moléculas centro-simétricas, el requerimiento para un estado intermediario que esté cercano a un estado virtual (sin que haya traslape) hace que surja una necesidad por una banda de absorción monofotónica estrecha.

Algunos de los cromóforos mas utilizados para la microscopía bifotónica y que cumple con las características enunciadas son *Alexa Fluor 488*, *Alexa Fluor 594* y *X-rhod-1* entre otros. Es fácil intuir que las estrategias de diseño de cromóforos son muy diversas, esta tesis se enfocará en una estrategia particular; el sistema antena-efector. El diseño consiste en la construcción de moléculas con grupos optimizados para tener un índice de absorción bifotónico muy grande y con una transferencia de energía como su principal vía de relajación. La sección “antena” de la molécula absorbe dos fotones y transfiere energía a un segundo fragmento de la molécula cuya vía de relajación puede ser por isomerización o disociación de la molécula en sí. Con esto en mente, se presenta la molécula AntOIR.



**Fig. 1.11:** Estructura molecular del compuesto AntOIR [48]

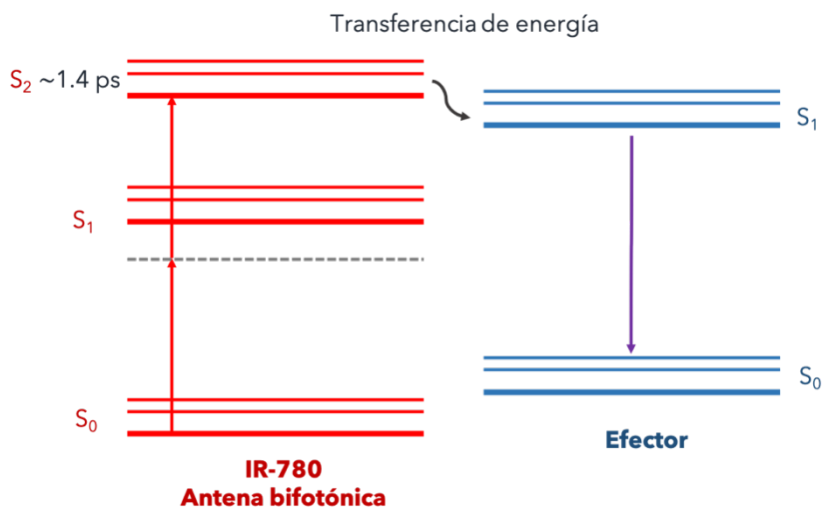
La molécula fue diseñada y sintetizada por el grupo de investigación, su correspondiente espectroscopia se puede encontrar en [48]. La molécula se puede dividir en dos partes, la antena bifotónica: la cianina derivada de la sonda comercial IR-780 (mostrada en rojo en la figura 1.11) y el fluoróforo AntOH (en azul en la figura 1.11). Ambas secciones están unidas por un éter en el carbono meso de la IR-780. Esta particularidad en el diseño es crucial, ya que mantiene las conjugaciones de ambas secciones independientes entre sí y asegurando que las propiedades foto físicas (como la habilidad para absorber dos fotones) de cada cromóforo se conserven.

Las cianinas son fluoróforos polimetínicos con una carga positiva deslocalizada a través de su cadena de carbonos  $sp^2$  y con grupos amino en los extremos. La estructura electrónica de las cianinas se ve determinada por un número impar de orbitales  $p_z$  conjugados y su número de electrones  $\pi$ . Las estructuras nodales para los orbitales  $\pi$  y  $\pi^*$  de estas moléculas hacen que el primer estado excitado esté mucho más estabilizado que el estado excitado  $S_2$ . La brecha energética entre los estados  $S_1 - S_2$  tiende a ser muy

grande (tan grande como de 1 eV) resultando en un acoplamiento débil entre estos estados. El tamaño de la cianinas produce una relajación estructural lenta lo que implica que la superficie de energía potencial de los estados superiores excitados es explorada de manera lenta después de la excitación. Esto brinda dos consecuencias importantes:

- Una constante de conversión interna,  $k_{CI}$ , entre estados superiores y el primer estado excitado baja.
- La posibilidad de otras vías de relajación mas favorecidas.

Las cianinas presentan momentos dipolares de transición muy grandes en su estado basal. Las orientaciones casi paralelas entre los momentos dipolares de transición del estado basal y estado excitado permiten que este tipo de moléculas tengan valores  $\delta_{max}$  bastante grandes. En el caso de la IR-780 la vía de relajación más favorecida para estados superiores (específicamente el estado  $S_2$ ) es la transferencia de energía ya que el tiempo de vida de su estado  $S_2$  es sumamente largo (1.4 ps, este tiempo de vida es dos ordenes de magnitud mayor a la mayoría de los cromóforos orgánicos)[49]. Se ha encontrado que el coeficiente de absorción bifotónica para la IR-780 a 875 nm es de 2800 GM [50].



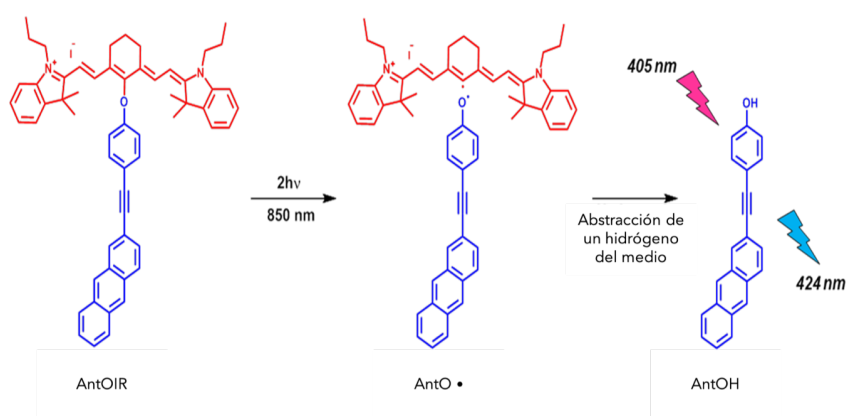
**Fig. 1.12:** Sistema Antena-Efector. La IR-780 es capaz de absorber dos fotones y llegar a su segundo estado excitado por medio de un estado virtual que resulta de la superposición del estado  $|i\rangle$  y  $|g\rangle$ . Una vez en el estado  $S_2$  ocurre una relajación por medio de una transferencia de energía al primer estado excitado del efector.

Para que ocurra esta transferencia de energía entre la antena y el efector, ciertas características se tienen que cumplir, estas se pueden encontrar en gran detalle en [19, 51-53]. El diseño de la molécula AntOIR toma a consideración dichas características.

## 1. MICROSCOPIA ÓPTICA

---

El efector, AntOH, es una molécula tipo antraceno sumamente fluorescente. La absorción bifotónica por la antena crea un evento de fotoliberación donde esta molécula (en este instante AntO•) se libera y abstrae un hidrógeno del medio para formar el fluoróforo AntOH. La fluorescencia del AntOH permite, como perspectiva, usar la molécula como una sonda molecular, sin embargo, el hecho que esta molécula llegue a este estado fluorescente por una fotoactivación abre una nueva posibilidad. Aprovechar este nuevo diseño de fluoróforos para su aplicación en la microscopía bifotónica de superresolución por la técnica de microscopía de localización foto-activada PALM.

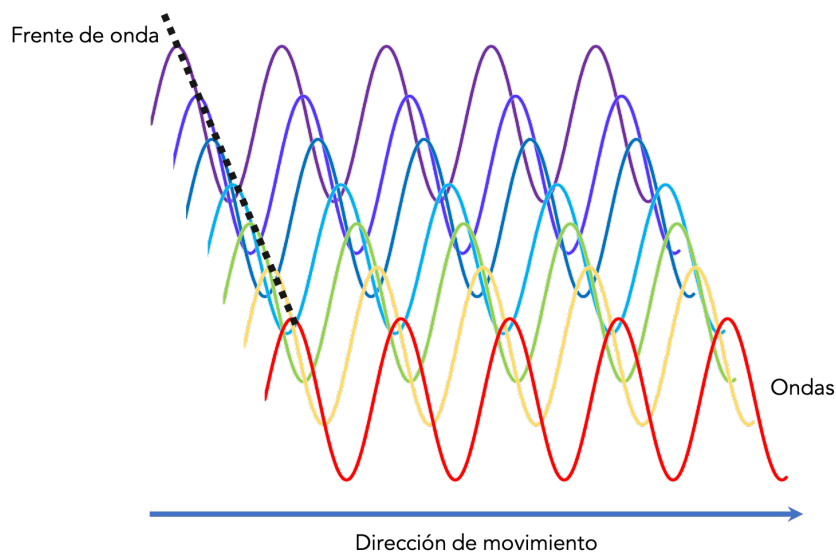


**Fig. 1.13:** Diseño de una molécula foto disociable por una absorción bifotónica. El diseño abre un nuevo campo de microscopía PALM. Dónde la fotoactivación gradual de fluoróforos se haría de manera hiperlocalizada – obteniendo los beneficios dimensionales de la microscopia bifotónica pero con una superresolución.

# La superresolución

---

Resulta importante formalizar los conceptos de difracción e interferencia antes de abordar el tema de microscopía de superresolución y poder comprender la importancia e innovación de esta rama. Ya que, como se establecerá a continuación, es imposible vencer los límites de difracción.



**Fig. 2.1:** Frentes de onda

*Frente de onda: el conjunto de puntos donde una onda tiene la misma fase.*

Al presentar los esquemas de los caminos ópticos de los microscopios se habló de la aproximación paraxial donde la luz se modela como rayos que se desplazan con ángulos pequeños respecto al eje óptico del sistema. Además de esta representación, a continuación, se presenta la construcción de Huygens que tiene una relevancia importante en la postulación de la teoría de difracción.

## 2. LA SUPERRESOLUCIÓN

---

El teorema explica que cada elemento de un frente de onda puede ser considerado como el centro de una perturbación secundaria que produce un subconjunto de ondas: la posición del frente de onda en un tiempo  $t_0 + \Delta t$  se formará por la contribución de este subconjunto de ondas como se aprecia en la figura 2.2.

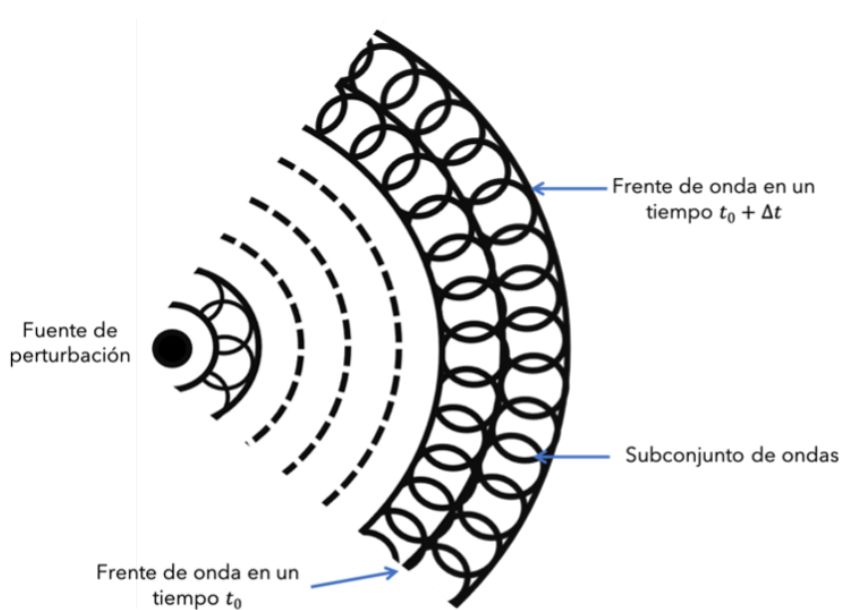


Fig. 2.2: Construcción de Huygens.

La construcción de Huygens resulta necesaria ya que la representación de la luz como un rayo deja de ser apropiada cuando se presenta el caso donde dos o más haces de luz se superponen ya que empiezan a presentarse variaciones en sus perfiles de intensidad. Por lo tanto, si tenemos una fuente de luz la cual es separada por un elemento óptico en dos haces de luz que después se superponen, la intensidad en la región de superposición se encuentra que varía de punto a punto entre un máximo que excede la suma de intensidades de los haces y el mínimo que puede aproximarse a cero. Este fenómeno se le llama interferencia [4].

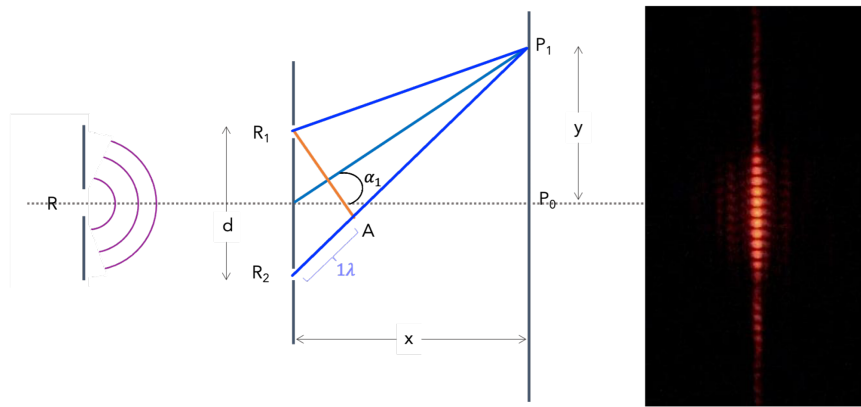
Ahora, si una fuente de luz coherente es separada por dos ranuras (ver el esquema de la figura 2.3), éstos actuarán como fuentes secundarias de luz. Todos los puntos en la pantalla reciben ondas de  $R_1$  y  $R_2$ . La figura muestra que la distancia  $R_1P_1$  es menor que la distancia  $R_2P_1$ ; la interferencia de las ondas ocurre en  $P_1$ . Si la diferencia de camino  $R_1A$  es igual a una longitud de onda, a través de interferencia constructiva una imagen de la fuente de luz, R, se forma en la pantalla  $P_1$ . Se puede demostrar que la formación de máximos se da cuando:

$$y = m\lambda \frac{x}{d} \quad (2.1)$$

Y la formación de mínimos ocurre cuando:

$$y = (m + 1/2)\lambda \frac{x}{d} \quad (2.2)$$

Donde  $y$  es la distancia entre la banda y el eje,  $m$  es un numero entero,  $\lambda$  es la longitud de onda de la fuente de luz,  $x$  es la distancia entre la ranura a la pantalla, y  $d$  es la distancia entre los centros de las ranuras.



**Fig. 2.3:** Experimento de Young y el patrón de interferencia de Young que se formaría en la pantalla  $P_1$ .

Para  $m=1$  en la ecuación  $y = m\lambda \frac{x}{d}$ , se pueden distinguir las siguientes relaciones [54]:

- Al disminuir  $d$ ,  $y$  aumenta, i.e. conforme la distancia entre ranuras se hace más pequeña, la interferencia máxima tiene un desplazamiento sobre el eje.
- Conforme  $\lambda$  disminuye,  $y$  disminuye, i.e. a longitudes de onda pequeñas, los máximos de interferencia se acercarán al eje.

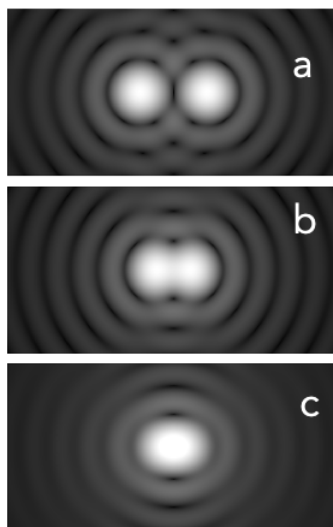
Ahora, supongamos que tenemos un haz de luz con dos componentes monocromáticas (una fuente de luz compuesta de dos longitudes de onda) pero con una intensidad similar. Si imaginamos que la diferencia entre longitudes de onda se empieza a incrementar, poco a poco la presencia de ambas componentes será evidente. Poder distinguir entre ambas es poder resolverlas. El criterio que determina cual es el desplazamiento mínimo entre



máximos de intensidad ( $\Delta l$ ) para llamar a ambos perfiles como resueltos es conocido como el *Criterio de Rayleigh* [4]. El criterio de Rayleigh para un microscopio es:

$$\Delta l \cong 1.22 \frac{f\lambda}{D} \quad (2.3)$$

Donde  $f$  es la distancia focal del objetivo,  $\lambda$  es la longitud de onda y  $D$  es la apertura numérica de éste.

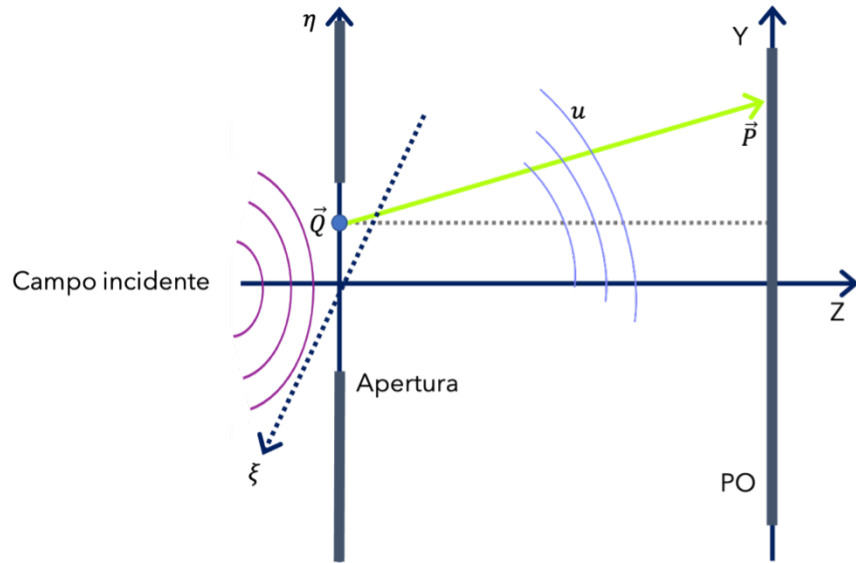


**Fig. 2.4:** Criterio de Rayleigh. a) dos objetos están resueltos entre si ya que el Criterio de Rayleigh se cumple. b y c) los objetos dejan de estar resueltos entre si, el Criterio de Rayleigh ya no se cumple.

### 2.1. Difracción

En 1818, Fresnel complementó la teoría de Huygens con el postulado que el subconjunto de ondas interfiere entre sí de tal forma que se producirá un patrón de difracción (Teoría de Huygens-Fresnel). La difracción se puede definir cuando un campo electromagnético incide sobre una abertura, el campo incidente que logra pasar a través de la abertura es el campo difractado como se observa en la figura 2.5.

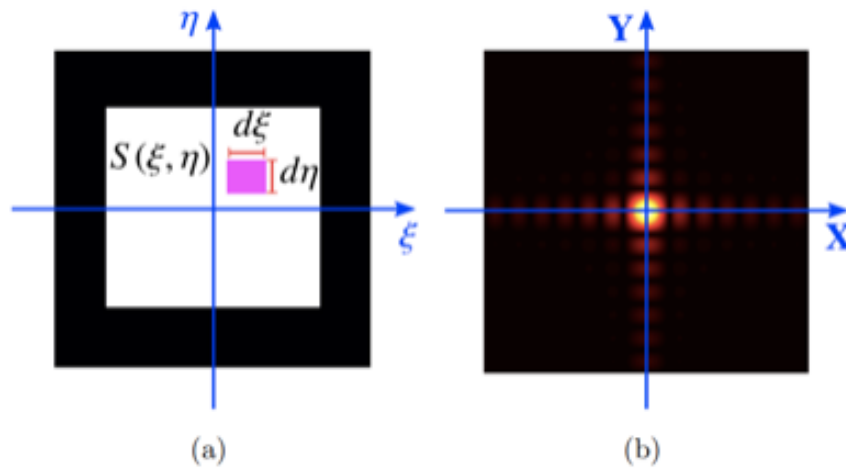
Experimentalmente, el campo incidente se modela como una onda esférica (frente de onda esférico) o una onda plana (frente de onda plano). Cuando el campo incidente es difractado en el plano de la abertura  $\xi\eta$ , cada elemento del área  $\Delta\xi\Delta\eta$  centrado en el punto  $\vec{Q} \cong (\xi, \eta, 0)$  contribuye con una onda esférica y su contribución al campo difractado es:



**Fig. 2.5:** Fenómeno de difracción causado por el paso de un frente de onda por una apertura con área  $\Delta\xi\Delta\eta$

$$u = Ae^{i(kr-\omega t)} \Delta\xi\Delta\eta \quad (2.4)$$

Donde  $A$  es la amplitud de la onda,  $k$  es el número de onda angular o magnitud del vector de onda angular,  $\omega$  es la frecuencia angular y  $r$  es la coordenada radial del espacio. El campo difractado es detectado en el plano de observación (PO) y se encuentra a una distancia  $z$  del plano de la apertura .



**Fig. 2.6:** Patrón de difracción. En la figura (a) se muestra a una apertura cuadrada en el plano  $\xi\eta$  y en la figura (b) se observa al patrón de difracción, cuando el campo incidente es una onda plana y PO está muy alejado de la apertura

Recordando la óptica geométrica y la aproximación paraxial, un conjunto de caminos

ópticos pueden ser representados como un conjunto de rayos que viajan desde el objeto, a través del camino óptico hasta llegar a la imagen de este objeto. En principio, esta imagen sería perfecta; el trazo de rayos lo confirmaría. En la realidad, esta imagen no es una representación exacta del objeto. La imagen del objeto es en realidad un patrón de difracción. Entonces, se debería de tener algún sistema óptico ideal que permita que todos los frentes de onda (así como sus subconjuntos) pasen a través del camino óptico hasta el foco *en fase*. Para formar una imagen perfecta, también sería necesario que, en cada punto en el plano de imagen, cualquier interferencia destructiva entre las ondas no produzca iluminación. *La teoría de difracción de Fraunhofer describe como un sistema óptico con apertura finita no puede llegar a esta imagen.*

### 2.2. Formación de imágenes

La teoría de difracción de Fraunhofer y la teoría de interferencia son la base para la teoría de Abbe sobre la formación de imágenes en un microscopio. Como es posible imaginar, la situación en un microscopio es mucho más complicada. La difracción en la apertura del “sistema de iluminación” (el objetivo enfocando el haz de excitación) hace que cada elemento o punto de la muestra tenga un patrón de difracción propio. Estos patrones de difracción en el plan de la imagen tienen centros en puntos suficientemente cercanos entre sí para que haya por lo menos un traslape parcial entre ellos. Abbe modeló este sistema con estructuras periódicas como rejillas.

Una rejilla, que consiste en la alternación de bandas oscuras y bandas luminosas de anchos finos, actúa como una apertura múltiple iluminada por rayos paralelos de luz. La rejilla produce difracción e interferencia de tal manera que el máximo de interferencia se forma en posiciones donde la diferencia entre los caminos de rayos y las ranuras adyacentes sea un número entero de longitudes de onda:

$$\text{Para el máximo: } \sin \alpha = m \frac{\lambda}{d} \tag{2.5}$$

Donde  $m = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3$  etc.,  $\lambda$  es la longitud de onda, para  $\alpha$  y  $d$  ver el esquema de la figura 2.3.

En un microscopio, la lente de objetivo capta estos rayos y brinda un máximo de

interferencia en el punto focal distal del objetivo. Esta imagen enfocada se describe como la imagen de interferencia primaria. La rejilla (o el espécimen en si) forma una imagen de interferencia secundaria.

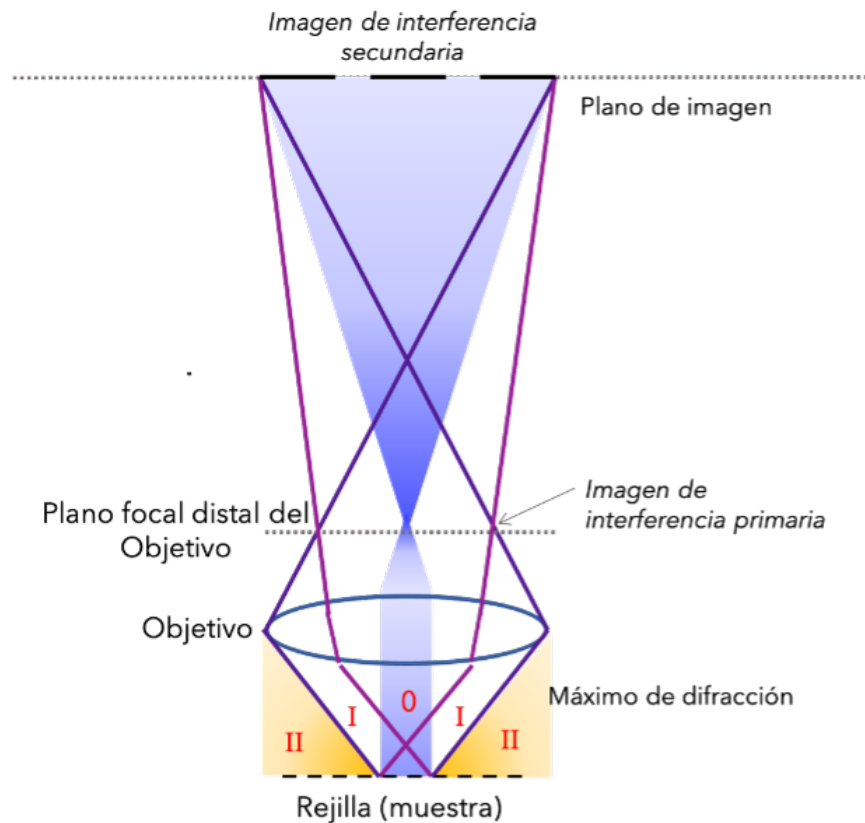


Fig. 2.7: Teoría de formación de imágenes de Abbe

La teoría de Abbe se puede resumir como una que postula que la difracción de un espécimen produce una imagen de interferencia primaria y la imagen producida por el microscopio es un resultado de interferencia secundaria del fenómeno de interferencia primaria. La interferencia secundaria sólo ocurre entre los rayos de orden cero (directos o sin difractar) y los rayos de orden superior (difractados). Si la interferencia secundaria no ocurre, entonces la formación de la imagen (ya sea de la rejilla o del espécimen) no será posible. Por lo tanto, se tiene:

$$\sin \alpha = m \frac{\lambda}{d} \quad (2.6)$$

$$d = \frac{\lambda}{\sin \alpha} = \frac{\lambda}{n \sin \alpha} = \frac{\lambda}{AN}$$

Donde n es el índice de refracción del medio entre la rejilla o la muestra y la lente;

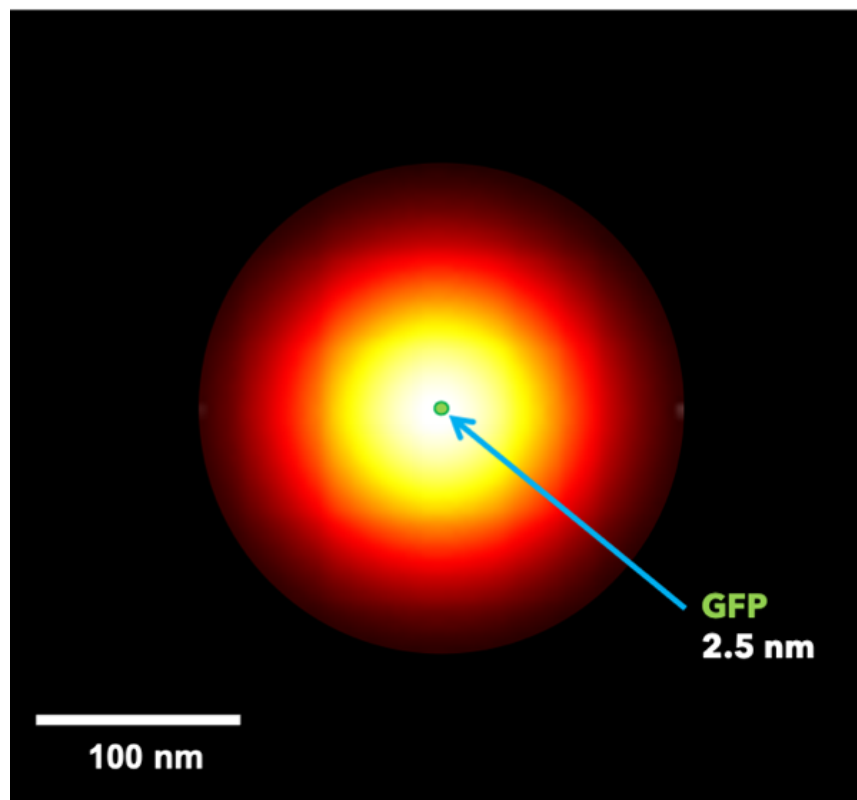
AN es la apertura numérica del objetivo; para  $\alpha$  y  $d$  ver el esquema de la figura 2.3 y  $m$  es una constante que se define como  $m = 1$ . Esta ecuación define la resolución limitada por difracción de un microscopio. Establecer la teoría de Huygens y la teoría de interferencia de Fresnel nos llevan a la misma conclusión a la cuál llegó Abbe: a pesar de poder minimizar las aberraciones y mejorar las piezas ópticas que conforman el microscopio, la imagen es un fenómeno de interferencia y su difracción es inevitable e insuperable. En términos simples, la barrera de resolución propuesta por Abbe es inalterable pero sí evitable, como Stefan Hell enseñó, en 1994, la primera propuesta sobre superresolución [55].

### 2.3. La superresolución

Fue hasta mediados de 1990s los primeros conceptos viables para evitar la barrera de difracción aparecieron [25, 55]. Actualmente existen varias técnicas de microscopía que han rebasado la frontera de difracción y llegan a la superresolución. Éstas lo logran de dos maneras: modulando espacialmente el haz de excitación, como lo hace la técnica de agotamiento de emisión estimulada *STED* (por sus siglas en inglés: Stimulated Emission Depletion Microscopy) y la microscopía de iluminación estructurada *SIM* (Structured Illumination Microscopy) [56, 57]. Por otro lado, se cuenta con técnicas basadas en la modulación temporal de la luz de emisión de fluoróforos individuales, como la microscopía de localización foto-activada *PALM* (Photoactivated Localization Microscopy) [58, 59] o microscopía óptica de reconstrucción estocástica *STORM* (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) [60]. Por el objetivo de la presente tesis, nos enfocaremos en *PALM* o *Photo Activated Localization Microscopy*.

Al hacer una comparativa entre la resolución óptica y las dimensiones moleculares de un objeto de estudio, por ejemplo, una proteína, se nota que en lugar de observar una imagen de la proteína o el punto emisor de la proteína se observa en el plano focal del sistema un área parcialmente-definida y que corresponde a la función de dispersión de punto del microscopio. La función de dispersión de punto puede ser hasta 1000 veces mayor a la dimensión molecular del objeto de estudio, por lo que imposibilita resolver moléculas distribuidas en estructuras nanométricas de las cuales se constituyen las estructuras subcelulares. Una forma de circunvenir este límite de difracción fue presentado por Erik Betzig en 1994, donde se propone aislar la señal de cada molécula individual de la distribución de intensidad gaussiana que tiene la función de dispersión de punto [59]. Esto se puede lograr al aplicar un ajuste de mínimos cuadrados a la distribución (imagen

formada por cada molécula) para determinar el centro de la gaussiana. Al tener el centro de la gaussiana se tiene una excelente aproximación a las coordenadas espaciales de la molécula. Como se pudo apreciar en secciones anteriores, la difracción era un obstáculo para el área de microscopía; *PALM* la aprovecha para obtener una superresolución. La función de dispersión de punto es la parte central de un patrón de interferencia causado por fenómeno de la difracción. La técnica *PALM* aprovecha los patrones de interferencia de cada molécula para localizarla y ajustar funciones matemáticas para recrear imágenes con su centro que en realidad son un tipo de "mapas de posiciones de moléculas".



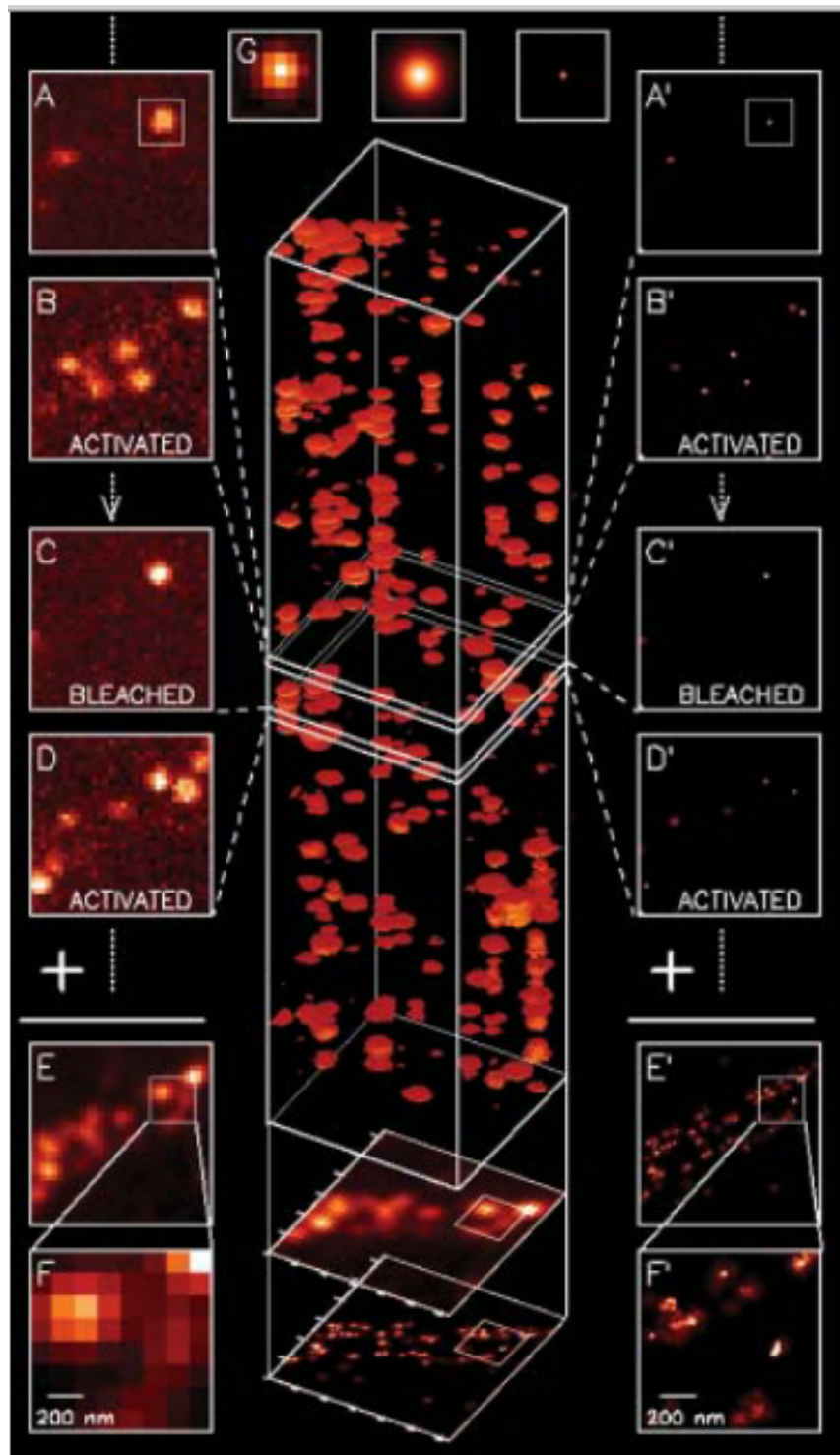
**Fig. 2.8:** Comparación en tamaños de la función de dispersión de punto y el tamaño de una proteína fluorescente (un cromóforo es mucho más pequeño). La función de dispersión de punto, en la mayoría de los casos, es mayor a estructuras subcelulares haciéndolas imposibles de resolver.

La forma en la cuál se desarrolla la técnica de interés en esta tesis se explicará en seguida. *PALM* depende de la localización exacta de fluoróforos individuales basándose en el aislamiento de la señal de emisión de moléculas individuales; la combinación de estas señales permite la reconstrucción de la posición de cada uno de los emisores lo cual define la "superresolución". Este método no sufre de los límites de resolución ya establecidos pues no depende exclusivamente de la resolución óptica para la visualización de múltiples moléculas. Para lograr el objetivo de ver conjuntos discretos de emisores,

una pequeña cantidad moléculas individuales son convertidas en moléculas fluorescentes mediante reacciones químicas. La subpoblación de moléculas se fotoactiva con una fuente luminosa, se toma la imagen de los pocos puntos emisivos antes de que estos se fotodegraden (o se “apaguen”), se aplica el ajuste de mínimos cuadrados a cada imagen de una molécula individual y se obtiene la posición de estas moléculas de manera casi exacta. Esta excitación a una subpoblación de moléculas y su consecuente foto degradación es repetida las veces necesarias hasta que el número de moléculas sin fotoactivar sea nula. Una vez que se colectan estas distribuciones ajustadas de todas las posiciones de las moléculas individuales, se puede reconstruir una imagen que rebasa los límites de resolución que, de otra manera, impone la difracción [10].

El fluoróforo y su subsecuente activación (es decir fototransformación por reacciones fotoquímicas en una nueva forma fluorescente) es primordial para la técnica *PALM*. De hecho, el concepto de *PALM* se concretó gracias a la introducción de proteínas fluorescentes fotoactivables con el fundamento de esta microscopía. Aunque el fluoróforo hace que este tipo de microscopía sea posible, también la limita. La fotoactivación de estos restringen la técnica a planos de estudio bidimensionales o a arreglos ópticos muy sofisticados y costosos para obtener una imagen tridimensional (*iPALM*). Lo anterior se debe a que se buscaría fotoactivar moléculas solo en un plano, y por ello se requeriría de esquemas como el de reflexión interna total, con la que la luz de fotoactivación se restringe exclusivamente al plano que forman las muestras en la superficie, en contacto con un vidrio (cubreobjetos). El objetivo de esta tesis es tener una fotoactivación hiperlocalizada de profundidad variable, la cual, podría evitar esta limitación. Una excitación y fotoactivación de un fluoróforo de manera bifotónica cumpliría con esta característica y ofrece una solución a las limitaciones de estas técnicas.

Un fluoróforo, como AntOIR, que pueda experimentar una excitación bifotónica resulta sumamente deseable ya que redefiniría el concepto de *PALM*. A continuación, se presentará la construcción de un microscopio confocal que adicionalmente cuenta con la posibilidad de usar una fuente láser pulsada para realizar la fototransformación no lineal y un primer acercamiento a una microscopía de superresolución con fotoactivación bifotónica empleando la molécula AntOIR.



**Fig. 2.9:** El principio de PALM. Un subconjunto de moléculas foto-activables son activadas (A B) a una longitud de onda de 405 nm, se cambia la longitud de onda del laser a 561 nm para tomar imágenes hasta que la mayoría de las moléculas han sido fotordegradadas. (C) el proceso se repite muchas veces hasta que la población de moléculas inactivadas se termine (C y D). La suma de todas las imágenes resulta en una imagen con una resolución aproximadamente 10 veces mejor que una imagen limitada por la difracción [10].





# Construcción de un microscopio para la formación de imágenes tipo PALM por fotoactivación bifotónica.

---

## 3.1. Requerimientos

Para poder hacer una microscopia de detección confocal monofotónica donde la construcción óptica del microscopio sea capaz de foto activar fluoróforos bifotónicamente para luego formar de imágenes tridimensionales PALM se enunciarán los requerimientos necesarios que debe tener el microscopio a construir.

- La construcción de un microscopio de fotoactivación bifotónica con la formación posterior de imágenes tanto confocales como de epifluorescencia. La construcción es semejante a la construcción de un microscopio confocal, el único requisito es que el sistema óptico esté adaptado para propagar y enfocar (sin provocar el desarrollo de aberraciones ópticas) la longitud de onda del haz de excitación bifotónico que es de 875 nm y corresponde a un haz de luz pulsada de femtosegundos.
- Es deseable poder separar las señales de emisión de la molécula fotoactivada de otras señales propias de la muestra mediante el uso apropiado de espejos dicróicos.
- Tener un control nanométrico sobre los planos de excitación y la profundidad de la muestra.
- Láseres para la imagenología y un láser de Ti: Zafiro para fotoactivación.

### 3. CONSTRUCCIÓN DE UN MICROSCOPIO PARA LA FORMACIÓN DE IMÁGENES TIPO PALM POR FOTOACTIVACIÓN BIFOTÓNICA.

---

- Detección específica de las moléculas foto activadas por conteo de fotones y obtención de imágenes con la técnica FLIM<sup>1</sup>

El microscopio que se presenta en esta tesis cumple estos requerimientos. En breve se brindarán detalles específicos del microscopio construido (para su posible reproducibilidad en otro laboratorio) también se explicará la necesidad de los requerimientos dados.

## 3.2. Diseño General

El diseño del microscopio construido se presentará a continuación.

Las componentes ópticas consisten en espejos, dicróicos y lentes. Los requerimientos para estas piezas se enunciarán brevemente:

### 3.2.1. Espejos

- Espejos dieléctricos con una reflectancia  $>99\%$  para el rango de 400 -750 nm. Estos espejos son los que marcan el camino óptico de las excitaciones de 405 y 485 nm (las longitudes de onda para la detección confocal) así como el camino óptico de detección. Se requiere que los espejos tengan una calidad en su superficie de  $\frac{\lambda}{10}$  a 632.8 nm (grado de planaridad de la superficie). Estos espejos permiten que rayos con perfiles de intensidad gaussianos se enfoquen a áreas con una tolerancia menor al 10% respecto a la distribución de intensidad ideal en el punto focal.
- Espejos dieléctricos E03 (del proveedor ThorLabs) con una reflectancia  $>99\%$  para el rango de 750 – 1100 nm. Éstos espejos marcan el camino óptico del láser de titanio zafiro con longitud de onda de 875 nm (láser de fotoconversión bifotónica). Es necesario usar los espejos apropiados para evitar pérdidas innecesarias de potencia.
- Espejos de colocación rápida (flip): estos espejos se caracterizan por su montura

---

<sup>1</sup>La microscopía de Tiempo de vida de Imagen Fluorescente o FLIM (por sus siglas en ingles “Fluorescence-lifetime imaging microscopy”) es una técnica que produce imágenes basadas en las diferencias en los decaimientos exponenciales de fluorescencia de una muestra fluorescente. Puede ser utilizada para un microscopio confocal y un microscopio con excitación bifotónica. El tiempo de vida del fluoróforo, en lugar de su intensidad, es usado para crear la imagen en FLIM. Esta técnica minimiza la dispersión en muestras mas gruesas (tejidos).[61, 62]

“flip”. Estos permiten tener opciones en el camino óptico. Notablemente se tiene un espejo flip que permite una dualidad en el tipo de microscopia que se puede hacer, campo amplio, bifotónico o confocal (para cambiar de la operación de foto-convertir, a la de observación).

### 3.2.2. Espejos o ventanas dicroicas.

Uno de los detalles mas importantes de la microscopia de fluorescencia es poder separar las longitudes de onda de excitación de las longitudes de emisión; el caso ideal es encontrar fluoróforos con desplazamientos de Stokes grandes, pero éste no siempre es el caso. La separación de estas fuentes de luz usualmente se da por filtros ópticos y una buena imagen es dependiente de su selección. Los espejos dicroicos son un tipo de filtro que, puesto a un ángulo de  $45^{\circ}$ , permite la transmisión de ciertas longitudes y la reflexión de otras.

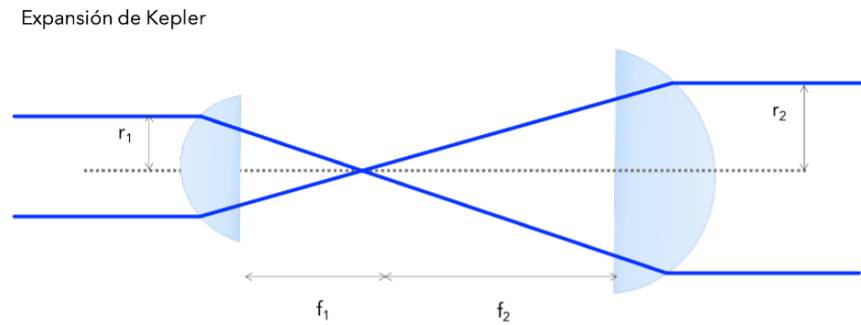
Los espejos dicroicos en el camino óptico de fluorescencia cumplen con tres propósitos, el primero es permitir la simplificación del camino al permitir que dos longitudes de onda puedan viajar sobre el mismo eje; el segundo es separar longitudes de onda de emisión de las longitudes de excitación, y el tercero es poder detectar en canales distintos (con diferentes detectores), señales de emisión de fluorescencia distintos. Este último es sumamente importante por la técnica tipo *PALM*, es necesario poder diferenciar entre la molécula no activada y la molécula foto activada, y la única manera de distinguir entre señales es la filtración espectral de éstas. Los dicroicos utilizados en el microscopio son de la marca CHROMA Optics y las ventanas de transmisión y reflexión de estos varían con cada experimento.

### 3.2.3. Lentes

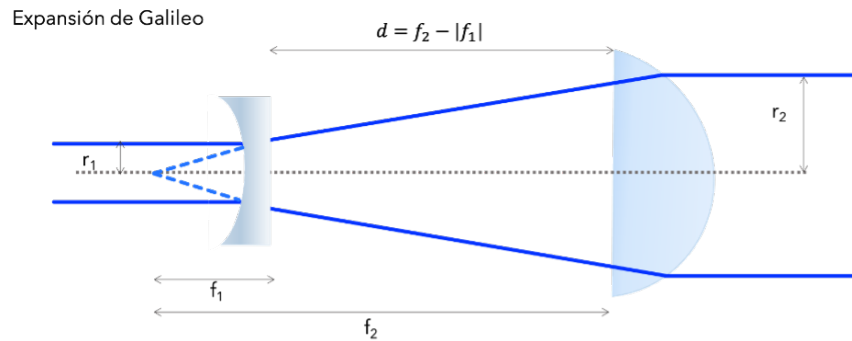
Una lente es una pieza óptica que enfoca o dispersa los rayos de luz por medio de la refracción. Una lente consiste en una pieza de un material transparente (sea  $SiO_2$  ó  $CaF_2$ ). Un arreglo de lentes puede crear sistemas de expansión o de convergencia del pulso de luz. Los dos sistemas de expansión telescópica mas representativos y utilizados en el arreglo óptico son la expansión de Kepler y la expansión de Galileo (su trazo de rayos se muestra en las figuras 3.1 y 3.2, respectivamente):

### 3. CONSTRUCCIÓN DE UN MICROSCOPIO PARA LA FORMACIÓN DE IMÁGENES TIPO PALM POR FOTOACTIVACIÓN BIFOTÓNICA.

---



**Fig. 3.1:** Expansión de Kepler. El arreglo de lentes se utiliza para enfocar la luz de excitación o de emisión hacia un pinhole.



**Fig. 3.2:** Expansión de Galileo. El arreglo de lentes se utiliza para expandir el diámetro del pulso del láser de Ti:Za para la entrada a la lente de objetivo sin pasar por un foco en el espacio.

La importancia en estas combinaciones de lentes en el contexto del manejo de fuentes láser de excitación radica en poder acrecentar o enfocar el área del haz de luz. Se busca acrecentar el área cuando es necesario pasar el haz de excitación por la apertura del objetivo. Es posible alternar en distancias focales de distintas lentes para llegar al ensanchamiento deseado y asegurar un paso colimado del haz de excitación por la apertura del objetivo. Para este propósito, como se puede observar, ambos esquemas de telescopio funcionan. Sin embargo en nuestro diseño se usan ambos, la expansión de Galileo para el láser de Ti:Za y la expansión de Kepler para los láseres para imagenología o excitación monofotónica. Este cambio en arreglos de expansión para cada láser radica en las diferencias de potencia y frecuencias de repetición de estos láseres. Los láseres de excitación monofotónica se usan a una frecuencia de repetición de 40 MHz, una potencia de salida de 4 mW y pulsos desde 50 a 130 ps. Usando:

$$\text{Energía} = \text{Potencia} \times \text{Tiempo} \quad (3.1)$$

### 3.2 Diseño General

---

Para los láseres de excitación monofotónica la energía por pulso y la potencia instantánea serían:

$$E = \frac{4 \times 10^{-3} W}{1 s} \times \frac{1 s}{40 \times 10^6} = 0.1 nJ$$

$$P = \frac{1 \times 10^{-10} J}{50 \times 10^{-12} s} = 2 W, \quad P = \frac{1 \times 10^{-10} J}{130 \times 10^{-12} s} = 0.769 W \quad (3.2)$$

En este caso, la expansión de Kepler- donde hay un enfoque previo a la expansión del haz- no tiene repercusiones en seguridad. Para el láser de Ti:Za se tiene una potencia de salida de 300 mW, una frecuencia de repetición de 100 MHz y pulsos de 150 fs. Por lo tanto:

$$E = \frac{300 \times 10^{-3} W}{1 s} \times \frac{1 s}{100 \times 10^6} = 3 nJ$$

$$P = \frac{3 \times 10^{-9} J}{150 \times 10^{-15} s} = 20 kW \quad (3.3)$$

Al enfocar el haz antes de expandirlo, el telescopio crearía un punto en el camino óptico del láser de Ti:Za donde éste ionizaría el aire; creando un escenario peligroso para el usuario.

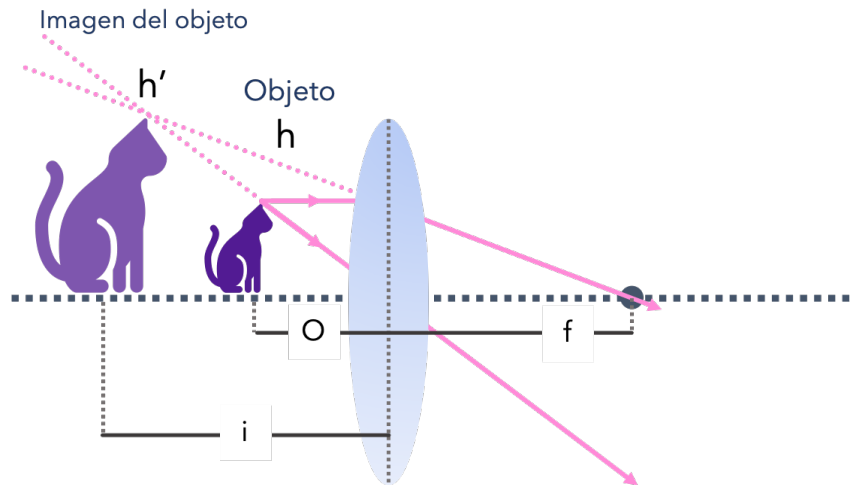


Fig. 3.3: aumento de una lente

aumento lineal:

$$\frac{1}{O} + \frac{1}{i} = \frac{1}{f}$$

$$M = \frac{-i}{O} = \frac{h'}{h}$$

### 3. CONSTRUCCIÓN DE UN MICROSCOPIO PARA LA FORMACIÓN DE IMÁGENES TIPO PALM POR FOTOACTIVACIÓN BIFOTÓNICA.

---

El telescopio de Galileo, como ya se mencionó, es usado en este caso para expandir los haces de excitación y asegurar que entren de manera ideal al *rear plane* del objetivo. Para el láser de excitación bifotónica, el haz de luz sale del oscilador con un diámetro de 1 mm. El *rear plane* del objetivo mide 10 mm, por lo tanto, necesitamos un factor de aumento de 10x. En el caso particular de nuestro microscopio se utilizaron lentes con distancias focales de - 4 y 40 cm para la expansión de Galileo, cumpliendo:

$$\frac{-(40) \text{ cm}}{-4 \text{ cm}} = \frac{10 \text{ mm}}{1 \text{ mm}} = 10$$

Por otro lado, la aplicación del telescopio de Kepler también juega un papel fundamental en la construcción óptica a presentarse. La aplicación más importante de este juego de lentes radica en su rol como “filtro espacial”, donde se filtra luz no deseada, tanto de excitación como de emisión. El microscopio construido es un microscopio con una arquitectura confocal. Recordando, una pieza fundamental de este arreglo es la apertura micrométrica (o el pinhole) cuya función principal es impedir el paso de la luz que proviene fuera de el punto focal que define el lente objetivo en la muestra. En el arreglo confocal, se aplica el telescopio de Kepler para enfocar la luz de emisión sobre una apertura micrométrica previa a la muestra, y luego, sobre el camino óptico de la señal según se detalla a continuación, y con ello lograr imágenes confocales. Esta expansión se usa en esta construcción para los haces de excitación monofotónica y la fluorescencia del camino de detección. Para determinar los distancias focales de la lentes a usar se sigue un procedimiento diferente, ya que su perfil de intensidad es diferente al perfil gaussiano del láser de Ti:Za. El cálculo de esta expansión se abordará en la siguiente sección.

En sí, el microscopio construido se puede dividir por secciones:

#### 1. Caminos de excitación

- a) Fuentes y caminos de excitación monofotónicos – para una detección confocal.
- b) Fuente y camino de excitación bifotónico – para la fotoactivación bifotónica de fluoróforos y la formación de imágenes tridimensionales con superresolución *PALM*.

#### 2. Microscopio

- a) Espejos dicróicos.

- b) Objetivos.
- c) Nanoposicionador.

#### 3. Camino de detección.

El esquema de la figura 3.7 muestra el trazo final del microscopio instalado, con los requisitos y componentes ya enunciados.

## 3.3. Caminos de excitación.

### 3.3.1. Monofotónico

Se tienen 3 fuentes láser de luz pulsada con 3 longitudes de onda para tener una excitación y detección monofotónica: 354 nm, 405 nm y 485 nm. Cuando se presentó la microscopía de fluorescencia se habló brevemente del impacto y sensibilidad que este tipo de microscopía ha tenido en los campos de las ciencias biológicas y de las ciencias biomédicas. Este impacto se debe al hecho que una gran cantidad de los especímenes de estudio presentan auto fluorescencia. Estos fluoróforos intrínsecos tienen espectros de excitación en longitudes de onda entre 350 – 500 nm; longitudes de onda accesibles con los láseres instalados.

Los láseres empleados en el laboratorio son de la marca PicoQuant y de perfil no-gaussiano:

- LDH Series: Picosecond Laser Diode Heads for PDL 800-D / PDL 828 en las longitudes de onda de 354 nm, 405 nm y 485 nm.

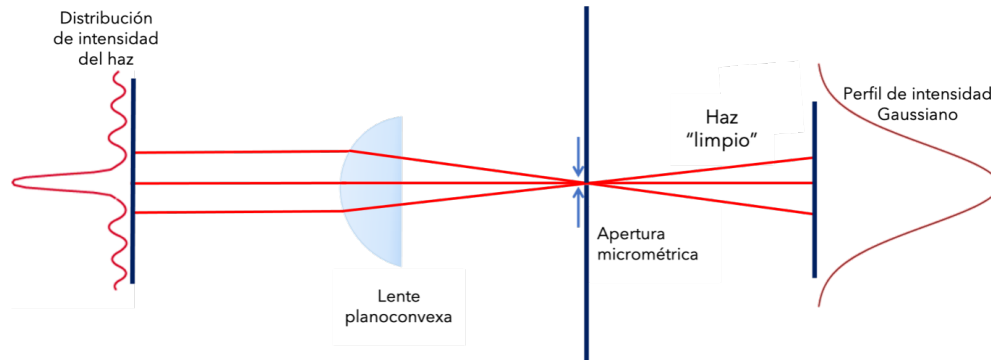
Los láseres de 405 nm y 485 nm son dirigidos a una ventana dicróica, esto con el propósito de que ambos láseres sigan el mismo camino óptico y ser eficientes con el espacio sobre la mesa óptica. Los haces láser son llevados a esta ventana con espejos dieléctricos, la ventana dicróica es capaz de reflejar (al instalarse a un ángulo de 45°) longitudes de onda de 405 nm y de transmitir 485 nm. El haz es después llevado a una lente planoconvexa que enfocará el haz a la primera apertura micrométrica, o *pinhole*. Esta primera apertura sirve como un filtro espacial. Este tipo de filtros son necesarios ya que a veces los perfiles



### 3. CONSTRUCCIÓN DE UN MICROSCOPIO PARA LA FORMACIÓN DE IMÁGENES TIPO PALM POR FOTOACTIVACIÓN BIFOTÓNICA.

---

de intensidad de los láseres no son ideales (y obtener un láser con un perfil de intensidad perfecto o Gaussiano resulta costoso); detalle que resulta importante al tratar de lograr una buena imagen. Para poder lograr un perfil de intensidad “limpio” se instala un filtro espacial que remueve máximos de intensidad no deseados y solo deja pasar el máximo central del patrón de difracción; esto se ilustra en la figura 3.4



**Fig. 3.4:** Filtro espacial creado con un telescopio de Kepler y una apertura micrométrica (*pinhole*).

El tamaño de la apertura micrométrica es un detalle experimental importante, como se hablará mas adelante, para el camino de detección y el *pinhole* del arreglo confocal. Para el camino de excitación se tiene una necesidad de asegurar un perfil de intensidad Gaussiano para mejorar la calidad de imagen. Para el láser de Ti:Za no hay necesidad de un filtro espacial ya que el láser tiene un perfil Gaussiano perfecto. Para los láseres de 405 nm y 485 nm se instaló un *pinhole* de  $30\ \mu\text{m}$ . El tamaño de apertura ideal para este caso se decide experimentalmente con base en la potencia anterior y posterior a la apertura y el perfil del modo transversal o el perfil de intensidad. La apertura puede cambiar para cada láser. Para los nuestros, la apertura es de  $30\ \mu\text{m}$ .

Posteriormente el haz se colima con otra lente planoconvexa y se lleva con espejos dieléctricos a otra ventana dicroica que permite la transmisión de ambas longitudes de onda de excitación (405 nm y 485 nm). Antes de la entrada al soporte de microscopio se instaló una lente en una montura de colocación rápida, *flip*, esta lente enfoca el haz de excitación en el plano distal del objetivo haciendo que este último colime el haz de excitación en su apertura; un arreglo análogo al de campo amplio, pero con el propósito de observar si el haz de excitación esta entrando de forma paralela al objetivo y no esté experimentando algún tipo de aberración óptica. Después de la lente, está un divisor de haz que manda una fracción de los fotones del haz de excitación (una vez que este haya entrado al soporte de microscopio el mismo objetivo regresa una porción de la luz de excitación, este es reflejado por una ventana dicroica a la entrada del microscopio y

llevado al divisor) a una cámara que permite observar la función de dispersión de punto del microscopio y dar al usuario una idea de dónde está el plano focal del objetivo.

#### 3.3.2. Bifotónico

El láser utilizado para la excitación bifotónica es un láser infrarrojo sintonizable, un láser de titanio zafiro. Este láser produce pulsos de duración de  $< 100$  fs, lo cual produce una intensidad instantánea lo suficientemente intensa para inducir el fenómeno de absorción de dos fotones. A diferencia de los láseres utilizados para la detección monofotónica, es innecesario cualquier tipo de filtro espacial como el instalado para los láseres de 405 y 485 nm. El láser de Ti:Za funciona a través de un mecanismo llamado “acoplamiento de modos” que le brinda un perfil de intensidad Gaussiano. Sucintamente:

Al considerar una cavidad óptica donde las fases de los modos longitudinales  $\phi$  (se le llama modo longitudinal a cada una de las ondas electromagnéticas estacionarias que se definen dentro del oscilador o cavidad óptica) son aleatorias y en el rango de 0 a  $2\pi$ . Su campo eléctrico neto se define por la siguiente ecuación:

$$E(t) = \sum_{p=-m}^m E_p \cos [(\omega_0 + p\Delta\omega) t + \varphi_{\text{aleatorio}}] \quad (3.4)$$

Donde  $2m + 1$  es igual al número de modos,  $\Delta\omega$  es el espaciamiento en frecuencia angular entre dos modos consecutivos (una constante),  $\omega_0$  es la frecuencia angular central del conjunto y  $\phi_{\text{aleatorio}}$  es la fase de cada modo longitudinal. Para cada modo longitudinal se tiene:

$$E(t)_p = E_p [\cos (\omega_p t - \varphi_p) + i \text{sen} (\omega_p t - \varphi_p)] \quad (3.5)$$

Como la intensidad de la onda es proporcional al cuadrado del campo eléctrico  $E(t)$ , se tiene:

$$I(t) = (E(t))^2 = \left( \sum_p E_p \cos (\omega_p t - \varphi_p) + \sum_p E_p i \text{sen} (\omega_p t - \varphi_p) \right)^2$$

### 3. CONSTRUCCIÓN DE UN MICROSCOPIO PARA LA FORMACIÓN DE IMÁGENES TIPO PALM POR FOTOACTIVACIÓN BIFOTÓNICA.

---

$$I(t) = (E(t))^2 = \left( \sum_p E_p \cos(\omega_p t - \varphi_p) \right)^2 + \left( \sum_p E_p \sen(\omega_p t + \varphi_p) \right)^2$$

Al graficar  $E(t)$  e  $I(t)$  en función del tiempo se obtiene la gráfica mostrada en la figura 3.5. Al sumar diferentes modos longitudinales cuyas fases son aleatorias se obtienen pulsaciones continuas que presentan una repetición periódica que en sí esta definido por la periodicidad o el tiempo de recorrido o de un ciclo por la cavidad óptica,  $\tau_p \cdot \tau_p$  se puede definir de la siguiente manera.

$$\tau_p = \frac{1}{\Delta\nu}$$

Donde  $\Delta\nu$  es el espaciamiento entre dos modos consecutivos.

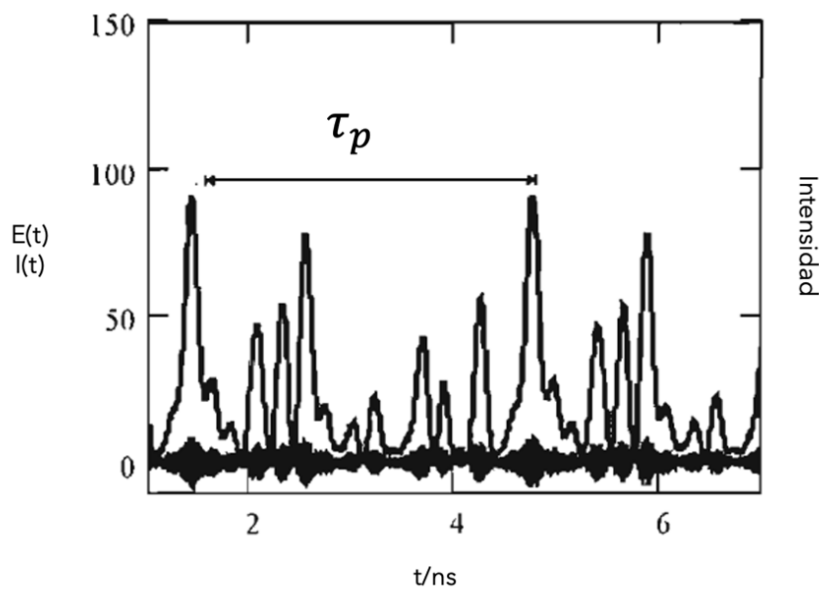


Fig. 3.5:  $E(t)$  e  $I(t)$  en función del tiempo

El láser de titanio-zafiro está diseñado de tal manera que las fases de los modos longitudinales pueden ser ajustadas tales que sean constantes (el diseño no tiene como propósito obtener un perfil de intensidad gaussiano, pero el perfil de intensidad es una consecuencia del diseño). Es decir:

$$\varphi_p - \varphi_{p-1} = \varphi$$

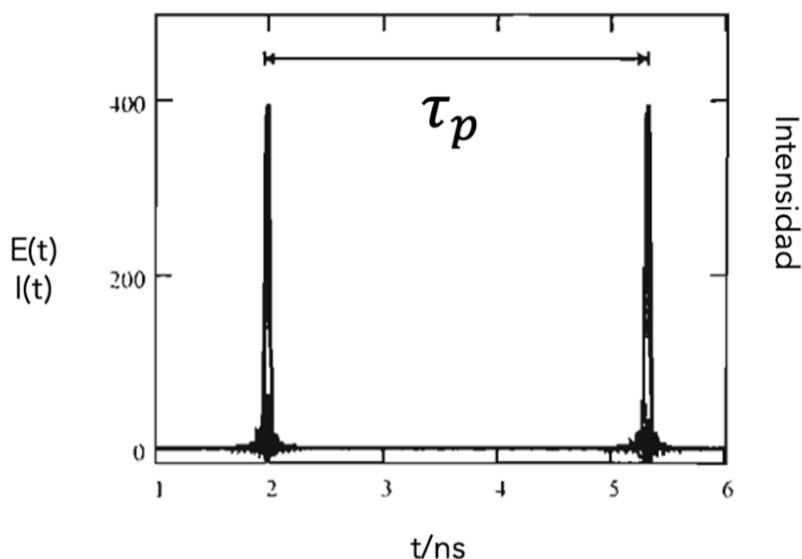
### 3.3 Caminos de excitación.

---

Este ajuste de fases es posible por el efecto de autoenfoco de Kerr [63-65]; la dependencia del índice de refracción del material (Ti:Za) con respecto a la intensidad de la onda electromagnética que lo atraviesa es:

$$n = n_0 + n_2 I$$

Donde  $n_0$  es el índice de refracción del medio y  $n_2$  es el índice de refracción del medio que se manifiesta a grandes intensidades. El diseño de cavidad del Ti:Za es tal que éste sólo es estable cuando existe el efecto Kerr que a su vez, es posible solamente cuando la cavidad está en estado de fases-fijas (o Modos fijos=*Mode-locked*).



**Fig. 3.6:**  $E(t)eI(t)$  en acomplamiento de modos65

Una vez que los pulsos se producen en la cavidad, el haz de pulsos es llevado a la entrada del microscopio por espejos dieléctricos E03 (capaces de reflejar la longitud de onda infrarroja sin pérdidas innecesarias de potencia). El haz es expandido por un telescopio de Galileo para que el diámetro de este sea del mismo tamaño que la entrada del objetivo del microscopio. El láser toma el mismo camino óptico que el de los láseres monofotónicos al ser redirigido por una ventana dicróica capaz de transmitir las longitudes de onda monofotónicas y reflejar la longitud de onda para excitación bifotónica.

3. CONSTRUCCIÓN DE UN MICROSCOPIO PARA LA FORMACIÓN DE IMÁGENES TIPO PALM POR FOTOACTIVACIÓN BIFOTÓNICA.

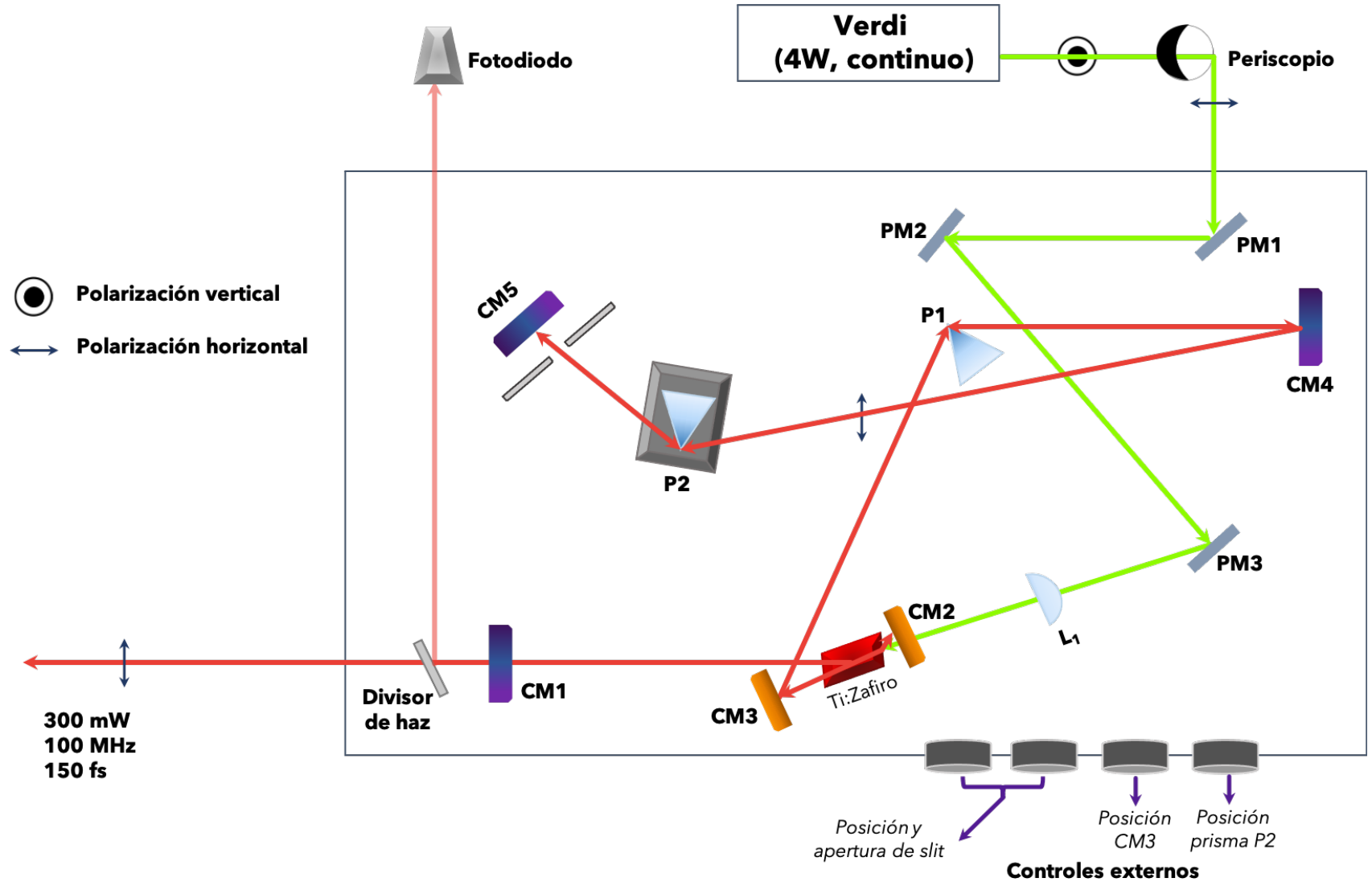


Fig. 3.7: Cavidad óptica del láser sintonizable de  $Ti^{3+} : Al_2O_3$  670-1070 nm

## 3.4. Microscopio

A la entrada del microscopio está otra ventana dicróica que permite la reflexión de los haces de excitación y la transmisión de las longitudes de onda de emisión que provendrán a su vez de la muestra. La elección de este dicróico es de suma importancia para lograr una buena imagen; poder filtrar las múltiples señales de emisión puede ofrecer aparte de una buena imagen, información sobre el objeto de estudio. Una vez reflejado el haz de excitación, este entra al microscopio. Luego, un prisma le cambia la trayectoria del rayo a una vertical y lo lleva al objetivo.

Los objetivos de microscopio son conjuntos o pilas de lentes individuales. El diseño del objetivo permite reducir aberraciones ópticas y con ello lograr mejores resoluciones e imágenes. Los objetivos son la pieza óptica más sofisticada y más importante en el arreglo óptico de un microscopio. Algunas de las características más importantes que se deben tomar en cuenta al elegir un objetivo son [66]:

- *Correcciones apocromáticas*: aunque no son esenciales, la mayoría de los objetivos tienen alguna corrección de este tipo. Estas le permiten al objetivo transmitir un intervalo significativo de longitudes de onda (del azul al rojo); evitando la creación de aberraciones innecesarias.
- *Aumento*: esta característica depende del experimento en sí y de las lentes.
- *Apertura numérica*: determina la cantidad de luz capaz de ser captada y la resolución de la imagen; ver figura 25. La apertura numérica (NA por sus siglas en inglés) se define como:

$$AN = n \sin(\theta)$$

Donde  $n$  es el índice de refracción.

- *Distancia de trabajo*: determina la profundidad a la que se puede trabajar. Es importante considerar a los cubreobjetos para calcular una distancia de trabajo “neta”. Por ejemplo, si tenemos una distancia de trabajo de 0.15 mm y el cubreobjetos a usarse es 0.14 mm, nuestra distancia de trabajo neta será de 0.01 mm. La apertura numérica y la distancia de trabajo están inversamente relacionadas como se puede observar en la figura 3.8:

### 3. CONSTRUCCIÓN DE UN MICROSCOPIO PARA LA FORMACIÓN DE IMÁGENES TIPO PALM POR FOTOACTIVACIÓN BIFOTÓNICA.

---

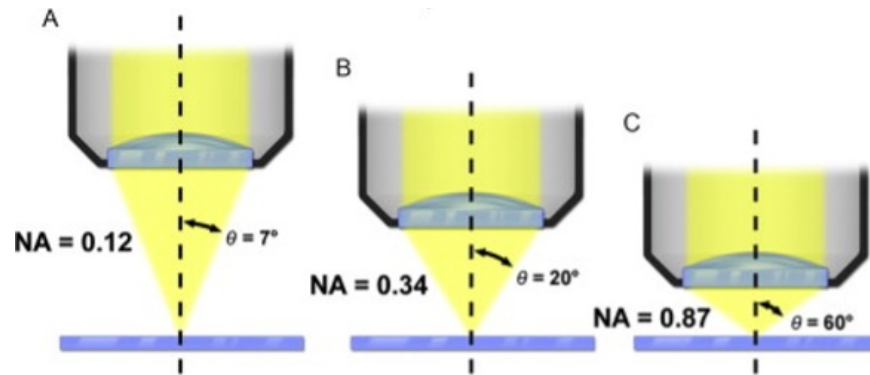


Fig. 3.8: Relación inversa entre la apertura numérica (NA) y la distancia de trabajo. La apertura numérica determine cuanta luz es captada por el objetivo[67].

- *Cuello corrector*: se puede ajustar este para evitar las aberraciones esféricas producidas por el grosor del cubreobjetos.
- *Objetivos de inmersión*: la apertura numérica de un objetivo puede ser dramáticamente incrementada diseñando un objetivo que se use a la par con un medio de inmersión como aceite, agua, glicerina y silicón. Al usar un medio de inmersión con índice de refracción similar al de un cubreobjetos, se puede eliminar la degradación de la imagen provocada por variaciones en el grosor del cubreobjetos ya que los rayos con mayor oblicuidad dejan de experimentar refracción y son captados con mayor facilidad por el objetivo [68].

Los objetivos empleados en el laboratorio son los siguientes:

- LMM-40X-UVV-160. Reflectivo, Thorlabs.
- Plan Apo VC 60X/1.40 Oil.  $\infty/0.17$ , W.D.=0.13 mm, Nikon.
- CFI Super Fluor 40X/1.30 Oil.  $\infty/0.17$ , W.D.=0.22 mm, Nikon.
- CFI Plan Fluor 60X/0.85 .  $\infty/0.11 - 0.23$ , W.D.=0.4-0.31 mm, Nikon.

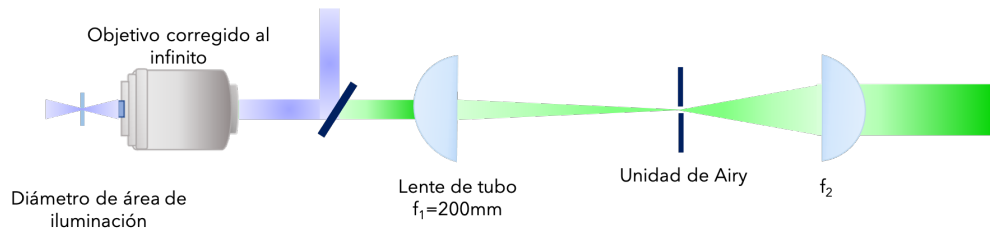
Una vez llegado al objetivo, el haz de excitación es enfocado sobre la muestra. La muestra en sí, está montada sobre un nanoposicionador que la mueve con gran precisión cambiando el punto de excitación continuamente y formando una imagen reconstruida punto por punto.

- Para el microscopio se usa el equipo nanoposicionador PInano-P545.

### 3.5. Camino de detección

La señal de emisión de la muestra es captada confocalmente por el mismo objetivo y es colimada por el mismo. La señal atraviesa el dicroico instalado a la entrada del microscopio y es llevada por espejos dieléctricos al telescopio de Kepler característico de un arreglo confocal. En este diseño, el “lente de tubo del microscopio” corresponde al primer lente de este telescopio. La primera lente tiene una distancia focal de 200 mm, y enfoca la señal de emisión a la apertura micrométrica.

La apertura, como ya se menciona al explicar la microscopía confocal, inhibe el paso de la luz fuera de foco y solo permite el paso de la luz que emana en el punto focal del objetivo. La apertura es el factor más importante en el arreglo confocal ya que define las resoluciones laterales y axiales, el contraste, y la profundidad de la sección óptica observada y es, en consecuencia, una decisión experimental importante. Por convención, la apertura micrométrica “ideal” es igual a una unidad de Airy ya que el diámetro del *pinhole* debe de coincidir con el tamaño de la imagen de una fuente puntual en el plano de excitación.



**Fig. 3.9:** Detección confocal

$$\text{Diámetro área de iluminación} = \frac{2 \times 0.61 \times \lambda_{\text{emisión}}}{AN} \quad (3.6)$$

$$\text{Unidad de Airy} = \frac{0.61 \times 0.61 \times \lambda_{\text{emisión}} \times \text{Aumento Objetivo}}{AN} \quad (3.7)$$

Para un objetivo con apertura numérica (AN) de 1.4, aumento de 60X y una  $\lambda_{\text{emisión}} = 425 \text{ nm}$  se tiene:



### 3. CONSTRUCCIÓN DE UN MICROSCOPIO PARA LA FORMACIÓN DE IMÁGENES TIPO PALM POR FOTOACTIVACIÓN BIFOTÓNICA.

---

$$\text{Diámetro área de iluminación} = \frac{2 \times 0.61 \times 425 \text{ nm}}{1.4} = 370 \text{ nm}$$

$$1 \text{ Unidad de Airy} = \frac{0.61 \times 425 \text{ nm} \times 60}{1.4} \cong 20 \mu\text{m}$$

Para encontrar  $f_2 =$

$$w_0 \cong \frac{\lambda \cdot x}{\pi \cdot w(x)} \quad (3.8)$$

$$x \cong \frac{\pi \cdot w(x) \cdot w_0}{\lambda} \quad (3.9)$$

$$x = \frac{\pi \cdot (5 \times 10^{-6} \text{ nm}) \cdot (20 \times 10^{-3} \text{ nm})}{425 \text{ nm}} \cong 75 \text{ nm}$$

En teoría, al disminuir el tamaño de la apertura la resolución mejoraría, pero en la práctica surgen otros problemas que se necesitan considerar como el deterioro en la relación señal/ruido y la necesidad de aumentar la potencia del haz de excitación. Esta última es una consideración importante cuando se trabaja con muestras biológicas ya que un incremento en potencia y/o tiempo de irradiación puede tener consecuencias en el sistema a estudiarse. Por estas razones, es recomendable determinar el tamaño ideal del *pinhole* de manera experimental e intercambiarlo según las necesidades del experimento. Se encontró que el *pinhole* ideal para el arreglo instalado es de  $30 \mu\text{m}$ .

Una vez que el haz es recolimado se lleva a los detectores de avalancha (APD's). Aquí, el usuario puede decidir si separar las señales de fluorescencia en diferentes zonas espectrales de detección. Poder discernir señales de fluorescencia es imperativo para el estudio y análisis de la muestra. Para poder tener un control sobre esta separación se instaló una ventana dicróica con una montura de colocación rápida. La ventana dicróica se puede cambiar para cada experimento y adaptarse a las longitudes de onda de detección deseadas. Para que la imagen de la fuente puntual entre al APD es necesario enfocar la imagen con una lente plano convexa con distancia focal de 25 mm.

Símbolo	
	Espejo
	Divisor de haz
	Espejo dicróico
	Lente cóncava
	Lente convexa
	Iris
	Periscopio
	Pinhole
	Prisma

Fig. 3.10

### 3.6. Un primer acercamiento

Este diseño ya está siendo utilizado para experimentos preliminares de foto activación con la perspectiva de llegar a la superresolución. Las imágenes son tejido de corazón y bazo de rata. Los tejidos fueron preparados usando una técnica histológica en parafina y están teñidos con el fluoróforo AntOIR. Se espera que, al irradiar el tejido con el haz (pulso) de 875 nm, la antena bifotónica de la molécula absorba dos fotones de 875 nm cada uno, accediendo al estado superior  $S_2$ . Al tener un tiempo de vida inusualmente largo, la vía de relajación de la cianina es la transferencia de energía. El fragmento de tipo antraceno es foto disociado de la antena. Las regiones señaladas son las regiones foto activadas bifotónicamente por el laser de 875 nm, la fluorescencia detectada es la del fragmento fotodisociado AntOH.

Las imágenes obtenidas fueron con el láser de 405 nm. La autofluorescencia de los tejidos es responsable de la formación de la imagen. Las imágenes FLIM antes de la irradiación con el láser de 875 nm muestran a un lado, un rango de los tiempos de vida con los que se formo la imagen. Las imágenes después de irradiar muestran no solo un cambio aparente en intensidad en el área irradiada sino que tambien ocurre un cambio en el rango de tiempos de vida de fluorescencia. Al ocurrir la fotodisociación, se espera un aumento en concentración del fragmento AntOH- aumento que se vería reflejado en los tiempos de vida de la imagen FLIM. Las imágenes muestran un cambio en tiempos de

### 3. CONSTRUCCIÓN DE UN MICROSCOPIO PARA LA FORMACIÓN DE IMÁGENES TIPO PALM POR FOTOACTIVACIÓN BIFOTÓNICA.

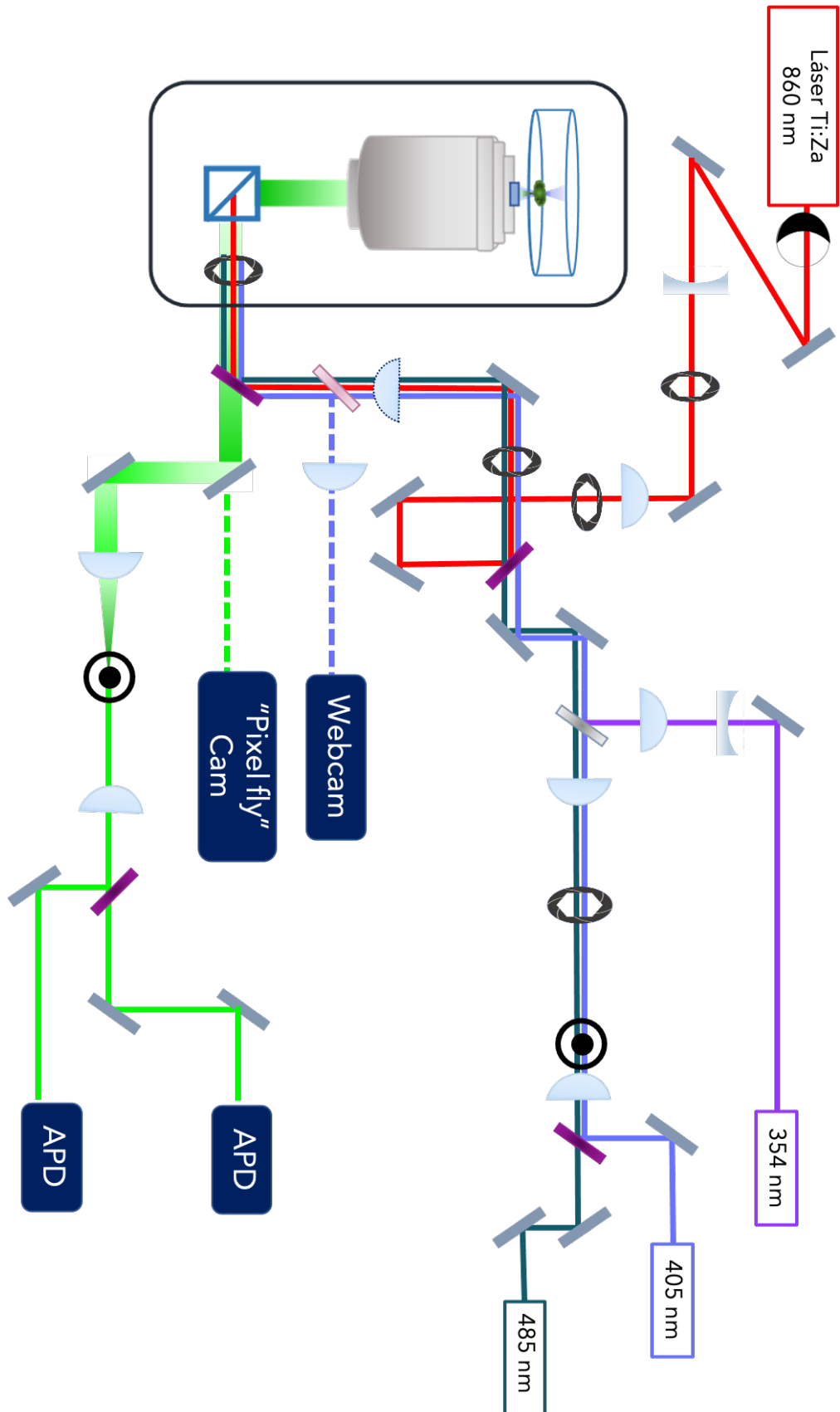


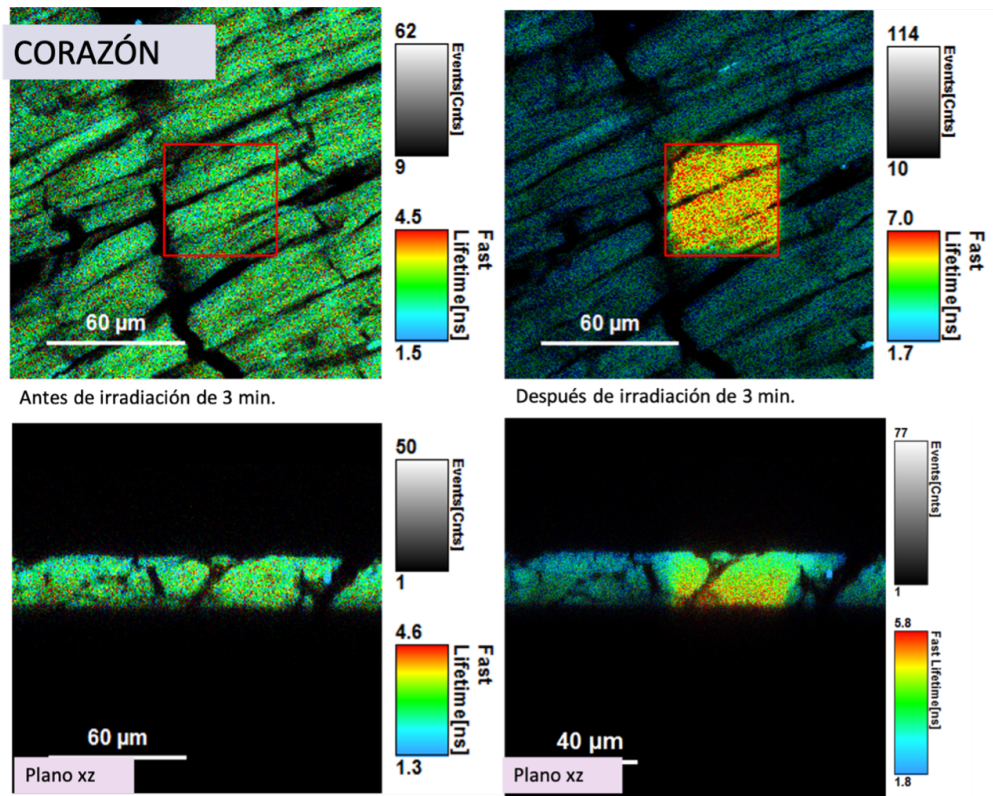
Fig. 3.11: Microscopio de fotoactivación bifuncional instalado en el laboratorio de espectroscopia láser

vida, específicamente en las regiones irradiadas por el láser de 875 nm. Este es cambio es consistente con la aparición del fragmento AntOH y su tiempo de vida de 4.5 ns. También se observan tiempos de vida más largos, esto se asocia al mecanismo en sí de disociación y el intermediario radicalario *AntO·* y la variedad de especies que este puede formar. Es importante mencionar que controles (tejidos simplemente sumergidos en DMSO, el disolvente usado para la disolución de la molécula AntOIR) también fueron estudiados e irradiados bajo las mismas condiciones de aquellos tejidos teñidos.

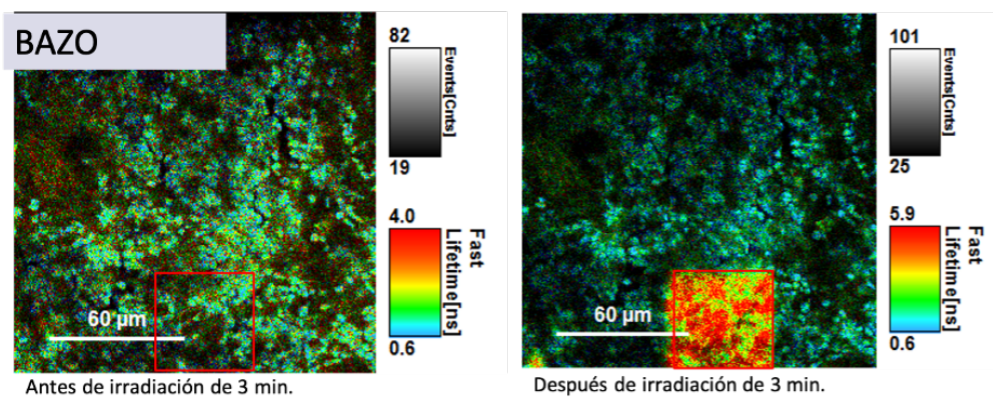
Las imágenes *FLIM* incluidas muestran dos planos principales, *xy* y *xz*, dando dos perspectivas importantes; el plano *xy* que se hace la fotoactivación y el plano *xz* da información sobre la perfusión de la molécula fotoactivada AntOH. En el caso del tejido de corazón, las imágenes del lado izquierdo muestran ambos planos antes de irradiarse por el láser de 875 nm. Se observa una imagen con detalles característicos de corazón y con tiempos de vida entre 2-3 ns (correspondiente a los tiempos de vida de fluoróforos intrínsecos a los tejidos como NADH y FAD). Un recuadro rojo remarca el área de irradiación que tendrá el láser de 875 nm. Las imágenes de lado derecho son imágenes de los planos *xy* y *xz* después de irradiar y fotoliberar el fluoróforo AntOH. En ambos planos se observa una diferencia tanto en intensidad de señal y tiempos de vida en la región remarcada por el recuadro. Al liberarse AntOH, la cantidad de fotones que llegan al detector aumentan y los tiempos de vida cambian para incluir los tiempos de vida de AntOH y sus análogos *AntO·*. Algo similar se observa en las imágenes de bazo. En la imagen de la izquierda, el recuadro rojo marca el área de irradiación que tendrá el láser sobre el plano *xy* y la imagen de la derecha muestra la región fotoactivada exhibiendo cambios en intensidad y tiempos de vida.

La difusión que se observa en el plano *xz* no es tan deseable ya que encompasa el ancho total del área irradiada. La fotoactivación que se busca debe de ser mucho más localizada. Para estos fines, actualmente se está trabajando en disminuir el área de irradiación y aumentar el ancho de los tejidos con los que se trabaja para observar una fotoactivación más puntual.

### 3. CONSTRUCCIÓN DE UN MICROSCOPIO PARA LA FORMACIÓN DE IMÁGENES TIPO PALM POR FOTOACTIVACIÓN BIFOTÓNICA.



**Fig. 3.12:** Tejido de corazón de rata. Las imágenes de lado izquierdo muestran dos planos del tejido  $xy$  y  $xz$  antes de una irradiación de 3 min por el láser de 875 nm. Las imágenes de lado derecho muestran las mismas imágenes con las regiones irradiadas mostrando la fotoactivación del AntOIR en el plano  $xy$  así como en el ancho del tejido (plano  $xz$ ).



**Fig. 3.13:** Tejido de bazo de rata. La imagen de lado izquierdo muestra el plano  $xy$  del tejido antes de una irradiación de 3 min por el láser de 875 nm sobre el área encuadrada en rojo. La imagen de lado derecho muestra la misma imagen después de la irradiación. Se puede observar un cambio sobre la intensidad del área encuadrada en rojo: producto de la fotoactivación del AntOIR lo cual corresponde a disociar o liberar el fragmento AntOH, el cual es excitado con el láser de 405 nm; y cuya emisión es detectada alrededor de 435 nm

## Conclusiones

---

Esta tesis presenta la intersección entre la microscopía bifotónica y la técnica de superresolución PALM dónde el aprovechamiento de un nuevo diseño de moléculas foto activables hace posible una fotoactivación bifotónica híperlocalizada y la obtención de imágenes con superresolución. Este diseño de microscopio con este nuevo diseño molecular son una primera propuesta para una nueva rama de microscopía: una microscopía de superresolución PALM con excitación bifotónica. Con esta técnica, se espera facilitar la imagenología de superresolución PALM en 3-D y esta misma in vivo.

El hecho que la perspectiva de este proyecto sea desde un punto de vista óptico, parece quitarle el protagonismo a la molécula química pero el presente diseño no es tanto una innovación si no una respuesta necesaria a un nuevo esquema molecular. El diseño y síntesis de moléculas con altos coeficientes de absorción bifotónico han y siguen siendo una cuna de oportunidad en distintas áreas. El diseño e instalación de éste microscopio simplemente posibilita y facilita el potencial de la molécula.

Al leer el presente documento se tendrá un panorama general de los desafíos y limitaciones ópticas de la microscopía. Así como parte de algunas soluciones y perspectivas a estos límites. También se espera que esta tesis pueda ser una guía de apoyo para la construcción de microscopios – dando una perspectiva de detalles y posibles problemas. Así mismo, esta tesis ofrece ser un documento de apoyo para futuros estudiantes y usuarios del microscopio en el Laboratorio de Espectroscopia Láser.



## **.1. Protocolo de uso:**

Equipo PicoQuant:

1. Encender el regulador con la conexión de APD y la del nanoposicionador
2. Encender el PicoHarp 300
3. Encender el PHR800 Uni Router
4. Encender la caja de láseres PDL 800-D, conectar a este el láser con el que se tomarán imágenes.
5. Encender la caja de control del nanoposicionador. El nanoposicionador tarda aproximadamente 1 hora en alcanzar estabilidad térmica.

## **.2. Láser de Titanio: Zafiro**

1. Encender el sistema de refrigeración del láser
2. Encender la computadora donde el software del espectrógrafo OceanView esta instalado
3. Encender osciloscopio
4. Introducir llave y desbloquear el bombeo del oscilador.
5. Llevar a amarre de modos.



El llevar a amarre de modos a partir de *cerro* implica alinear la cavidad y optimizar la potencia de salida mientras el láser esta en estado CW (continuo). Posteriormente, se debe observar que como función de la distancia entre los dos espejos cóncavos (CM2 y CM3) se pasa por dos máximos de potencia (esa distancia se controla con el CM3 del oscilador). Es decir, si se hiciera una gráfica de la potencia en función de la distancia entre los dos espejos, saldría una gráfica con dos máximos y en medio un mínimo local que tiene aproximadamente 15 % menos potencia. La alineación de la cavidad debe ser tal que ambos máximos alcancen la misma potencia (produciendo una gráfica simétrica centrada sobre el mínimo local). En este mínimo la cavidad debe de entrar en *mode-locking* con una perturbación que incluye una vibración a un espejo o mover un poco el prisma P2.

### **.3. Alineación del camino de detección del arreglo Confocal**

1. Bloquear el láser de 875 nm
2. Abrir el software Symphotime
3. Abrir un nuevo espacio de trabajo
4. En la pestaña de Test elegir la prueba Time-Trace, esta se usará para alinear el camino óptico de detección.
  - a) El estándar para la alineación de los láseres 405 nm y 485 nm es fluoresceína en Etilenglicol, se añade una gota de NaOH 0.1 M antes de utilizarse.
  - b) El estándar para la alineación del láser de 354 nm es Cumarina 153
5. Se coloca una gota del estándar apropiado sobre un cubreobjetos y se lleva al microscopio.
6. Se acerca el objetivo a utilizarse (si es un objetivo de inmersión, añadir una gota de aceite o de agua antes del paso 4).
7. Dar “click” a Start. El marcador de cuentas llegará a un máximo cuando el objetivo esté en foco con el cubreobjetos.
8. Una vez en foco, se harán ajustes finos usando esta secuencia:

Los “1” indican el inicio de esa alineación. Primero se alinea (buscar un máximo número de cuentas) con un eje ya sea el horizontal y vertical después se alinea el otro. Por ejemplo: Se alinean los horizontales del 1 primero y después del 2; al llegar a un máximo número de cuentas en los detectores se pasa a los horizontales.

9. Las intensidades que se pueden lograr dependen del laser de excitación y del estándar usado, pero siempre se busca llegar a un número superior a un millón de cuentas; cuando el número se mantenga constante la alineación ha terminado.

## .4. Experimento

1. Se cambia de Time-Trace a Imaging en el programa Symphotime.
2. Se cambia el cubre objetos con el estándar a la muestra teñida por una molécula foto activable.
3. Se bloquea el laser y se cambia la lente de tubo a los oculares. Manualmente se busca un plano de visión.
4. Para buscar el plano de imagen se seguirá el siguiente procedimiento:
  - a) Cambiar el scan axis a  $x - z$
  - b) Cambiar Img size: 128 px
  - c) Cambiar Dwell time: 1.3 ms
  - d) Cambiar Learning time: 1 s
5. Este procedimiento dará una imagen donde se podrá ver el ancho de la muestra, escoger una profundidad.
6. Cambiar el scan axis a x-y y tomar otra imagen.
7. Si la imagen es del agrado del usuario se cambia la pestaña de *Test* a *Measurement*
8. Se vuela a tomar una imagen, pero a mayor resolución (img size:512px y Dwell time: 1.0 ms)
9. Al terminar, sobre esta misma imagen se escoge la opción “Select Range”, esta opción permite ubicar una región de foto-activación.

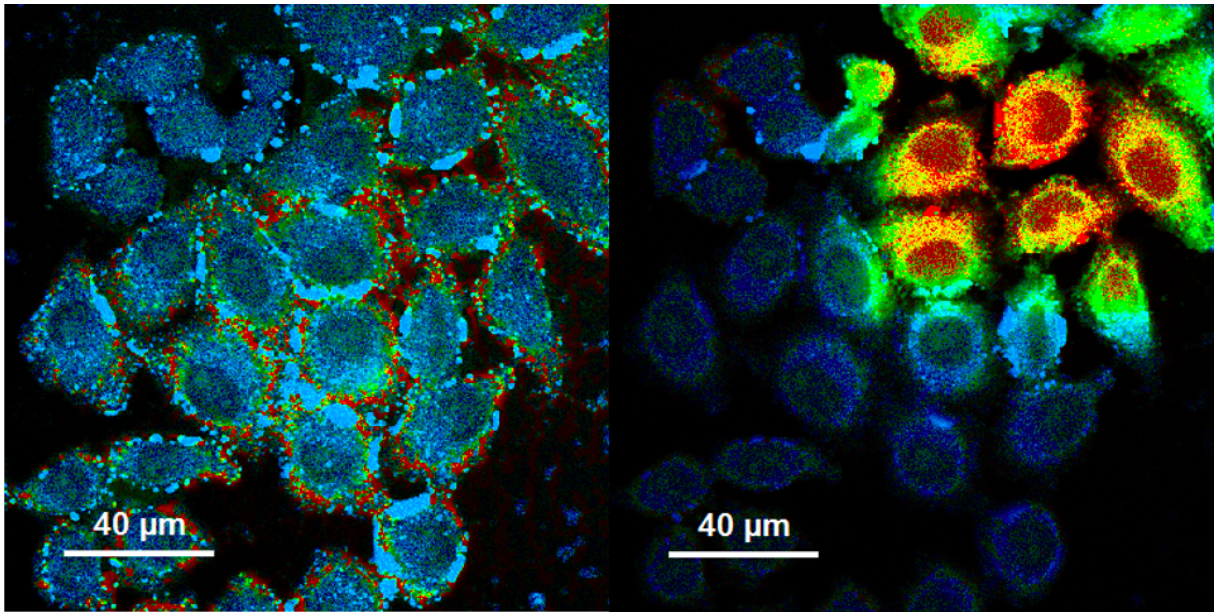


Fig. 14

10. Bajar la resolución a 256 px
11. En la pestaña de “Automated measurements” se da click a la opción enable, el programa hace un calculo de cuanto tardara en producir una imagen, el numero de imágenes que se ponga es el tiempo de irradiación.
12. Al escoger la posición y las dimensiones de la región de activación se bloquea el láser para la toma de imágenes y se desbloquea el laser de 860 nm.
13. Se da click en start.
14. Al terminar la medición se bloquea el láser de 860 nm y desbloquea el otro láser.
15. Se sube la resolución a 512 px.
16. Se da click en ‘Max Range’
17. La opción de ‘Automated measurements’ se deshabilita
18. Se da click en start

Este experimento dará dos imágenes, una antes de la foto activación y una después.  
fig. A1(Izq. Antes, Derecha: Después)

## Bibliografía

---

- [1] C. K. Rosenthal. The beginning: Invention of the microscope. *Nature Cell Biology*, **11**(1):S6-S6, oct. de 2009. ISSN: 1476-4679. DOI: [10.1038/ncb1938](https://doi.org/10.1038/ncb1938). URL: <https://www.nature.com/articles/milelight01> (citado en la pág. VII).
- [2] E. Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung: I. Die Construction von Mikroskopen auf Grund der Theorie. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, **9**(1):413-418, dic. de 1873. ISSN: 01767364. DOI: [10.1007/BF02956173](https://doi.org/10.1007/BF02956173). URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02956173> (citado en las págs. VII, IX, X).
- [3] J. B. Pawley. *Handbook of biological confocal microscopy: Third edition*. 2006, páginas 1-985. ISBN: 038725921X. DOI: [10.1007/978-0-387-45524-2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2) (citado en las págs. VIII, X, XI, 1).
- [4] E Born M Wolf. *Principles of Optics*, Pergamon, Oxford, 1993 (citado en las págs. IX, 9, 20, 22).
- [5] C.-Y. Dong, K. Koenig y P. So. Characterizing point spread functions of two-photon fluorescence microscopy in turbid medium. *Journal of Biomedical Optics*, **8**(3):450, 2003. ISSN: 10833668. DOI: [10.1117/1.1578644](https://doi.org/10.1117/1.1578644) (citado en las págs. X, 9).
- [6] J. E. D. Zamboni y V. H. Casco. Estimation methods of the point spread function axial position: A comparative computational study. *Journal of Imaging*, **3**(1), 2017. ISSN: 2313433X. DOI: [10.3390/jimaging3010007](https://doi.org/10.3390/jimaging3010007) (citado en las págs. X, 9).
- [7] T. Wilson, C. J. R. Sheppard y L. Orlando San Diego San Francisco New York Toronto Montreal Sydney Tokyo Sao Paulo. *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy with contributions*. 1984, página 73. ISBN: 0-12-757760-2. URL: [http://xrm.phys.northwestern.edu/research/pdf\\_papers/chapters/wilson\\_sheppard\\_chaps1-5.pdf](http://xrm.phys.northwestern.edu/research/pdf_papers/chapters/wilson_sheppard_chaps1-5.pdf) (citado en la pág. X).
- [8] The Rayleigh Criterion for Microscope Resolution | Edinburgh Instruments. URL: <https://www.edinst.com/de/news/the-rayleigh-criterion-for-microscope-resolution/> (citado en las págs. X, XI).
- [9] W. Lukosz. Optical Systems with Resolving Powers Exceeding the Classical Limit\*. *Journal of the Optical Society of America*, **56**(11):1463, nov. de 1966. ISSN: 0030-3941. DOI: [10.1364/josa.56.001463](https://doi.org/10.1364/josa.56.001463). URL: <https://www.osapublishing.org/viewmedia.cfm?uri=josa-56-11-1463&seq=0&html=true><https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?uri=josa-56-11-1463><https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?uri=josa-56-11-1463>

- [osapublishing.org/josa/abstract.cfm?uri=josa-56-11-1463](http://osapublishing.org/josa/abstract.cfm?uri=josa-56-11-1463) (citado en la pág. XI).
- [10] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz y H. F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, **313**(5793):1642-1645, sep. de 2006. ISSN: 00368075. DOI: [10.1126/science.1127344](https://doi.org/10.1126/science.1127344). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16902090/> (citado en las págs. XII, 28, 29).
- [11] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien y W. E. Moerner. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature*, **388**(6640):355-358, 1997. ISSN: 00280836. DOI: [10.1038/41048](https://doi.org/10.1038/41048). URL: <https://www.nature.com/articles/41048> (citado en la pág. XII).
- [12] G. Patterson, M. Davidson, S. Manley y J. Lippincott-Schwartz. Superresolution imaging using single-molecule localization. *Annual Review of Physical Chemistry*, **61**:345-367, 2010. ISSN: 0066426X. DOI: [10.1146/annurev.physchem.012809.103444](https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.012809.103444) (citado en la pág. XIII).
- [13] M. Rubart. Two-photon microscopy of cells and tissue, dic. de 2004. DOI: [10.1161/01.RES.0000150593.30324.42](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000150593.30324.42). URL: <http://www.circresaha.org> (citado en la pág. XIV).
- [14] F. Zernike. How I discovered phase contrast. *Science*, **121**(3141):345-349, mar. de 1955. ISSN: 00368075. DOI: [10.1126/science.121.3141.345](https://doi.org/10.1126/science.121.3141.345). URL: <https://science.sciencemag.org/content/121/3141/345><https://science.sciencemag.org/content/121/3141/345.abstract> (citado en la pág. 1).
- [15] Polarized Light Microscopy | Nikon's MicroscopyU. URL: <https://www.microscopyu.com/techniques/polarized-light/polarized-light-microscopy> (citado en la pág. 1).
- [16] M. J. Sanderson, I. Smith, I. Parker y M. D. Bootman. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2014**(10):1042-1065, 2014. ISSN: 15596095. DOI: [10.1101/pdb.top071795](https://doi.org/10.1101/pdb.top071795) (citado en la pág. 1).
- [17] J. C. Stockert y A. Blazquez-Castro. *Fluorescence Microscopy in Life Sciences*. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, dic. de 2017. DOI: [10.2174/97816810851801170101](https://doi.org/10.2174/97816810851801170101) (citado en la pág. 1).
- [18] E Hecht. Optics, 2016 (citado en la pág. 2).
- [19] J. R. Lakowicz. Introduction to Fluorescence. En *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, páginas 1-26. Springer US, 2006. DOI: [10.1007/978-0-387-46312-4\\_{1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_{1) (citado en las págs. 3, 17).
- [20] M. Sauer, Hofkens Johan y Enderlein Jörg. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Ensemble to Single Molecules* | Wiley. 2010, página 290. URL: <https://www.wiley.com/en-us/Handbook+of+Fluorescence+Spectroscopy+and+Imaging%3A+From+Ensemble+to+Single+Molecules-p-9783527633524> (citado en la pág. 3).
- [21] J. S. Verdaasdonk, A. D. Stephens, J. Haase y K. Bloom. Bending the Rules: Widefield Microscopy and the Abbe Limit of Resolution. *Journal of Cellular Physiology*, **229**(2):132-138, feb. de 2014. ISSN: 00219541. DOI: [10.1002/jcp.24439](https://doi.org/10.1002/jcp.24439). URL: [/pmc/](http://pmc/)

- [articles/PMC4076117//pmc/articles/PMC4076117/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4076117/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4076117/) (citado en la pág. 4).
- [22] A. D. Elliott. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Current Protocols in Cytometry*, **92**(1):e68, mar. de 2020. ISSN: 19349300. DOI: [10.1002/cpcy.68](https://doi.org/10.1002/cpcy.68). URL: [/pmc/articles/PMC6961134//pmc/articles/PMC6961134/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6961134/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6961134/) (citado en la pág. 5).
- [23] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold y G. P. Drummen. Advanced fluorescence microscopy techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*, **17**(4):4047-4132, 2012. ISSN: 14203049. DOI: [10.3390/molecules17044047](https://doi.org/10.3390/molecules17044047) (citado en la pág. 6).
- [24] S. W. Hell. Toward fluorescence nanoscopy. *Nature Biotechnology*, **21**(11):1347-1355, 2003. ISSN: 10870156. DOI: [10.1038/nbt895](https://doi.org/10.1038/nbt895) (citado en la pág. 7).
- [25] S. W. Hell y M. Kroug. Ground-state-depletion fluorescence microscopy: A concept for breaking the diffraction resolution limit. *Applied Physics B Lasers and Optics*, **60**(5):495-497, mayo de 1995. ISSN: 09462171. DOI: [10.1007/BF01081333](https://doi.org/10.1007/BF01081333). URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01081333> (citado en las págs. 7, 26).
- [26] M. Göppert-Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*, **401**(3):273-294, ene. de 1931. ISSN: 00033804. DOI: [10.1002/andp.19314010303](https://doi.org/10.1002/andp.19314010303). URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/andp.19314010303> (citado en la pág. 7).
- [27] P. T. So, C. Y. Dong y B. R. Masters. Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Biomedical Photonics: Handbook*:11-1, 2003. DOI: [10.1007/978-3-642-16712-6{\\\_}829](https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_{\_}829) (citado en las págs. 7, 10, 11).
- [28] P. P. Mondal, A. Diaspro, P. P. Mondal y A. Diaspro. Multiphoton Fluorescence Microscopy. *Fundamentals of Fluorescence Microscopy*:149-159, 2014. DOI: [10.1007/978-94-007-7545-9{\\\_}8](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7545-9_{\_}8) (citado en la pág. 7).
- [29] G. Baym. Lectures on quantum mechanics, 1974 (citado en la pág. 8).
- [30] J. R. Lakowicz y J. R. Lakowicz. Fluorescence Anisotropy. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, **5**:291-319, 1999. DOI: [10.1007/978-1-4757-3061-6{\\\_}10](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3061-6_{\_}10) (citado en la pág. 8).
- [31] C. Sheppard. Image formation in two-photon fluorescence microscopy. (October):1-4, 2017 (citado en la pág. 9).
- [32] Two-Photon fluorescence microscopy. URL: <http://microscopy.berkeley.edu/courses/TLM/2P/index.html> (citado en la pág. 10).
- [33] W. Denk, J. H. Strickler y W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, **248**(4951):73-76, abr. de 1990. ISSN: 00368075. DOI: [10.1126/science.2321027](https://doi.org/10.1126/science.2321027). URL: <https://science.sciencemag.org/content/248/4951/73https://science.sciencemag.org/content/248/4951/73.abstract> (citado en las págs. 10, 11).
- [34] J. Bewersdorf, R. Pick y S. W. Hell. Multifocal multiphoton microscopy. *Optics Letters*, **23**(9):655, mayo de 1998. ISSN: 0146-9592. DOI: [10.1364/ol.23.000655](https://doi.org/10.1364/ol.23.000655). URL: <https://www.osapublishing.org/viewmedia.cfm?uri=ol-23-9-655&>

- [seq=0&html=truehttps://www.osapublishing.org/abstract.cfm?uri=ol-23-9-655](https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?uri=ol-23-9-655)<https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-23-9-655> (citado en la pág. 10).
- [35] C. J. R. Sheppard y R. Kompfner. Resonant scanning optical microscope. *Applied Optics*, **17**(18):2879, 1978. ISSN: 0003-6935. DOI: [10.1364/ao.17.002879](https://doi.org/10.1364/ao.17.002879) (citado en la pág. 11).
- [36] H. Kapteyn y M. M. Murnane. Femtosecond Lasers. *Optics & Photonics News*:241-241, 1994. ISSN: 0752-5370. DOI: [10.5005/jp/books/10723{\\\_}27](https://doi.org/10.5005/jp/books/10723{\_}27) (citado en la pág. 11).
- [37] P. F. Moulton. Spectroscopic and Laser Characteristics of Ti:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, **3**(1):125-133, 1986. ISSN: 15581713. DOI: [10.1109/3.216](https://doi.org/10.1109/3.216) (citado en la pág. 11).
- [38] M. Albota, D. Beljonne, J. L. Brédas, J. E. Ehrlich, J. Y. Fu, A. A. Heikal, S. E. Hess, T. Kogej, M. D. Levin, S. R. Marder, D. McCord-Maughon, J. W. Perry, H. Röckel, M. Rumi, G. Subramaniam, W. W. Webb, X. L. Wu y C. Xu. Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections. *Science*, **281**(5383):1653-1656, sep. de 1998. ISSN: 00368075. DOI: [10.1126/science.281.5383.1653](https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1653). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9733507/> (citado en la pág. 12).
- [39] P. E. Hänninen, L. Lehtelä y S. W. Hell. Two- and multiphoton excitation of conjugate-dyes using a continuous wave laser. *Optics Communications*, **130**(1-3):29-33, sep. de 1996. ISSN: 00304018. DOI: [10.1016/0030-4018\(96\)00189-7](https://doi.org/10.1016/0030-4018(96)00189-7) (citado en la pág. 12).
- [40] C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R. M. Williams y W. W. Webb. Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(20):10763-10768, oct. de 1996. ISSN: 00278424. DOI: [10.1073/pnas.93.20.10763](https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.10763). URL: <https://www.pnas.org/content/93/20/10763><https://www.pnas.org/content/93/20/10763.abstract> (citado en la pág. 12).
- [41] C. Dudley. Chromophore design for large two-photon absorption. *Optical Materials*, **37**(C):750-755, 2014. ISSN: 09253467. DOI: [10.1016/j.optmat.2014.08.023](https://doi.org/10.1016/j.optmat.2014.08.023). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.optmat.2014.08.023> (citado en la pág. 12).
- [42] M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning y H. L. Anderson. Two-photon absorption and the design of two-photon dyes. *Angewandte Chemie - International Edition*, **48**(18):3244-3266, 2009. ISSN: 14337851. DOI: [10.1002/anie.200805257](https://doi.org/10.1002/anie.200805257) (citado en las págs. 12, 13).
- [43] G. S. He, L. S. Tan, Q. Zheng y P. N. Prasad. Multiphoton absorbing materials: Molecular designs, characterizations, and applications. *Chemical Reviews*, **108**(4):1245-1330, 2008. ISSN: 00092665. DOI: [10.1021/cr050054x](https://doi.org/10.1021/cr050054x) (citado en la pág. 12).
- [44] L. A. Padilha, S. Webster, O. V. Przhonska, H. Hu, D. Peceli, J. L. Rosch, M. V. Bondar, A. O. Gerasov, Y. P. Kovtun, M. P. Shandura, A. D. Kachkovski, D. J. Hagan y E. W. Van Stryland. Nonlinear absorption in a series of Donor- $\pi$ -Acceptor cyanines with different conjugation lengths. *Journal of Materials Chemistry*, **19**(40):7503-7513, 2009. ISSN: 09599428. DOI: [10.1039/b907344b](https://doi.org/10.1039/b907344b) (citado en la pág. 12).

- [45] Q. Bellier, N. S. Makarov, P. A. Bouit, S. Rigaut, K. Kamada, P. Feneyrou, G. Berginc, O. Maury, J. W. Perry y C. Andraud. Excited state absorption: A key phenomenon for the improvement of biphotonic based optical limiting at telecommunication wavelengths. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **14**(44):15299-15307, 2012. ISSN: 14639076. DOI: [10.1039/c2cp40779e](https://doi.org/10.1039/c2cp40779e) (citado en la pág. 12).
- [46] J. Fu, L. A. Padilha, D. J. Hagan, E. W. Van Stryland, O. V. Przhonska, M. V. Bondar, Y. L. Slominsky y A. D. Kachkovski. Experimental and theoretical approaches to understanding two-photon absorption spectra in polymethine and squaraine molecules. *Journal of the Optical Society of America B*, **24**(1):67, 2007. ISSN: 0740-3224. DOI: [10.1364/josab.24.000067](https://doi.org/10.1364/josab.24.000067) (citado en la pág. 12).
- [47] J. M. Hales, D. J. Hagan, E. W. Van Stryland, K. J. Schafer, A. R. Morales, K. D. Belfield, P. Pacher, O. Kwon, E. Zojer y J. L. Bredas. Resonant enhancement of two-photon absorption in substituted fluorene molecules. *Journal of Chemical Physics*, **121**(7):3152-3160, 2004. ISSN: 00219606. DOI: [10.1063/1.1770726](https://doi.org/10.1063/1.1770726) (citado en la pág. 12).
- [48] J. Rodríguez-Romero, C. A. Guarín, A. Arroyo-Pieck, L. Gutiérrez-Arzaluz, R. López-Arteaga, F. Cortés-Guzmán, P. Navarro y J. Peon. Front Cover: Fluorophore Release from a Polymethinic Photoremovable Protecting Group Through a Nonlinear Optical Process (ChemPhotoChem 9/2017). *ChemPhotoChem*, **1**(9):376-376, 2017. ISSN: 2367-0932. DOI: [10.1002/cptc.201700143](https://doi.org/10.1002/cptc.201700143) (citado en la pág. 16).
- [49] C. A. Guarín, J. P. Villabona-Monsalve, R. López-Arteaga y J. Peon. Dynamics of the higher lying excited states of cyanine dyes. An ultrafast fluorescence study. *Journal of Physical Chemistry B*, **117**(24):7352-7362, 2013. ISSN: 15205207. DOI: [10.1021/jp400278t](https://doi.org/10.1021/jp400278t) (citado en la pág. 17).
- [50] C. A. Guarín, L. G. Mendoza-Luna, E. Haro-Poniatowski y J. L. Hernández-Pozos. Two-photon absorption spectrum and characterization of the upper electronic states of the dye IR780. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **249**(186):119291, 2021. ISSN: 13861425. DOI: [10.1016/j.saa.2020.119291](https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119291). URL: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119291> (citado en la pág. 17).
- [51] B. R. Masters. Paths to Förster's resonance energy transfer (FRET) theory. *European Physical Journal H*, **39**(1):87-139, 2014. ISSN: 21026459. DOI: [10.1140/epjh/e2013-40007-9](https://doi.org/10.1140/epjh/e2013-40007-9) (citado en la pág. 17).
- [52] A. Kaur, P. Kaur y S. Ahuja. Förster resonance energy transfer (FRET) and applications thereof. *Analytical Methods*, **12**(46):5532-5550, 2020. ISSN: 17599679. DOI: [10.1039/d0ay01961e](https://doi.org/10.1039/d0ay01961e). URL: <http://dx.doi.org/10.1039/D0AY01961E> (citado en la pág. 17).
- [53] T. Mirkovic, E. E. Ostroumov, J. M. Anna, R. Van Grondelle, Govindjee y G. D. Scholes. Light absorption and energy transfer in the antenna complexes of photosynthetic organisms. *Chemical Reviews*, **117**(2):249-293, 2017. ISSN: 15206890. DOI: [10.1021/acs.chemrev.6b00002](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00002) (citado en la pág. 17).
- [54] R. W. Ditchburn. Wave theory - Combination of wave motions, 1957 (citado en la pág. 21).



- [55] S. W. Hell y J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, **19**(11):780, jun. de 1994. ISSN: 0146-9592. DOI: [10.1364/ol.19.000780](https://doi.org/10.1364/ol.19.000780). URL: <https://www.osapublishing.org/viewmedia.cfm?uri=ol-19-11-780&seq=0&html=true><https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?uri=ol-19-11-780><https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-19-11-780> (citado en la pág. 26).
- [56] M. G. L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. SHORT COMMUNICATION. *Journal of Microscopy*, **198**(2):82-87, mayo de 2000. ISSN: 0022-2720. DOI: [10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x). URL: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x> (citado en la pág. 26).
- [57] M. G. Gustafsson. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(37):13081-13086, sep. de 2005. ISSN: 00278424. DOI: [10.1073/pnas.0406877102](https://doi.org/10.1073/pnas.0406877102). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16141335/> (citado en la pág. 26).
- [58] S. T. Hess, T. P. Girirajan y M. D. Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal*, **91**(11):4258-4272, 2006. ISSN: 00063495. DOI: [10.1529/biophysj.106.091116](https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091116). URL: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.091116> (citado en la pág. 26).
- [59] E. Betzig. Proposed method for molecular optical imaging. *Optics Letters*, **20**(3):237, 1995. ISSN: 0146-9592. DOI: [10.1364/ol.20.000237](https://doi.org/10.1364/ol.20.000237) (citado en la pág. 26).
- [60] M. J. Rust, M. Bates y X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*, **3**(10):793-795, oct. de 2006. ISSN: 15487091. DOI: [10.1038/nmeth929](https://doi.org/10.1038/nmeth929). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16896339/> (citado en la pág. 26).
- [61] W. Becker, A. Bergmann, M. A. Hink, K. König, K. Benndorf y C. Biskup. Fluorescence Lifetime Imaging by Time-Correlated Single-Photon Counting. *Microscopy Research and Technique*, **63**(1):58-66, 2004. ISSN: 1059910X. DOI: [10.1002/jemt.10421](https://doi.org/10.1002/jemt.10421) (citado en la pág. 32).
- [62] Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. URL: <https://www.ibiology.org/talks/fluorescence-lifetime-imaging/> (citado en la pág. 32).
- [63] S. Backus, C. G. Durfee, M. M. Murnane y H. C. Kapteyn. High power ultrafast lasers. *Review of Scientific Instruments*, **69**(3):1207-1223, 1998. ISSN: 00346748. DOI: [10.1063/1.1148795](https://doi.org/10.1063/1.1148795) (citado en la pág. 41).
- [64] U Morgner, F. X. Kartner, S. H. Cho, E. Chen, H. A. Haus, J. G. Fujimoto, E. P. Ippen, V. Scheuer, G. Angelow y T. Tschudi. Sub-two-cycle pulses from a Kerr-lens mode-locked Ti : sapphire laser (vol 24, pg 411, 1999). *Optics Letters*, **24**(13):920, 1999 (citado en la pág. 41).
- [65] I. P. Christov, M. M. Murnane, H. C. Kapteyn y V. D. Stoev. Sub-10-fs operation of Kerr-lens mode-locked lasers. *Optics Letters*, **21**(18):1493, 1996. ISSN: 0146-9592. DOI: [10.1364/ol.21.001493](https://doi.org/10.1364/ol.21.001493) (citado en la pág. 41).

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [66] Features of an Objective Lens. URL: <https://www.ibiology.org/talks/features-of-an-objective-lens/> (citado en la pág. 43).
- [67] S. T. Ross, J. R. Allen y M. W. Davidson. Practical considerations of objective lenses for application in cell biology. En *Methods in Cell Biology*. Volumen 123, páginas 19-34. Academic Press Inc., ene. de 2014. DOI: [10.1016/B978-0-12-420138-5.00002-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420138-5.00002-1) (citado en la pág. 44).
- [68] Immersion Oil and Refractive Index | Nikon's MicroscopyU. URL: <https://www.microscopyu.com/tutorials/immersion> (citado en la pág. 44).

