

# CHARACTERIZATION OF BURNED SKIN ABLATED WITH ULTRASHORT PULSES LASER USING NONLINEAR MICROSCOPY TECHNIQUE

Moisés Oliveira dos Santos<sup>1</sup>, Vitor Bianchini Pelegati<sup>2</sup>, Carlos Lenz Cesar<sup>2</sup>, Telma Maria Tenório Zorn<sup>3</sup>, Denise Maria Zezell<sup>1</sup>, Ricardo Elgul Samad<sup>1</sup>, Nilson Dias Vieira Júnior<sup>1</sup>

1 - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN - CNEN/ SP – Brasil

Av. Lineu Prestes 2242 - Cidade Universitária - CEP: 05508-000 - São Paulo - SP BRASIL

2 - Depto. de Eletrônica Quântica - Universidade Estadual de Campinas - SP – Brasil

3 - Universidade de São Paulo - SP Brasil

E-mail: zezell@usp.br

## RESUMO

*Este trabalho é parte de um estudo que verifica o potencial de tratamento de pele queimada usando laser de pulsos ultra-curtos de alta intensidade. A técnica de microscopia não-linear permite adquirir imagens das fibras de colágeno na derme através da geração de segundo harmônico (SHG), e fibras elásticas por microscopia de autofluorescência de dois fótons (TPEFM). O objetivo deste estudo é caracterizar derme de pele com queimadura de terceiro grau pela técnica de TPEFM e SHG. As amostras foram obtidas de ratos Wistar, machos e adultos. Áreas do dorso foram submetidas à queimadura causada pela exposição ao vapor de água. Três dias após a queimadura, uma lesão de cada rato foi irradiada com laser de Ti:Safira, centrado em 800 nm, com largura de pulso de 30 fs e densidade de energia de 197 J/cm<sup>2</sup>. Amostras da lesão foram retiradas nos dias 3, 5, 7 e 14 pós-irradiação. As biópsias foram obtidas e imagens da interface entre o tecido irradiado e saudável da pele queimada na região subdérmica foram adquiridas pela técnica TPEFM e SHG. Em imagens de SHG, fibras de colágeno são visíveis e podem ser quantificados durante o processo de cicatrização. De acordo com as imagens obtidas, essas metodologias podem ser utilizadas para caracterizar derme de tecido queimado, bem como o seu processo de cicatrização.*

**Descritores:** SHG, TPEFM, Laser de Ti:Safira

## ABSTRACT

*This work is part of a study to verify the potential treatment of burned skin with high intense ultra-short laser. Nonlinear microscopy imaging technique enable to take both images of collagen fibers in dermis through second harmonic generation (SHG) signal and elastic fibers by two-photon emission fluorescence microscopy (TPEFM). The objective of this study is to characterize dermis of third-degree burned skin by TPEFM and SHG technique. The samples were obtained from male, adults Wistar rats. Dorsum areas were submitted to burn caused by water vapour exposure. At 3 day post-exposure, one lesion of each rat was irradiated with Ti:Sapphire laser pulses centered at 800 nm, with pulse width of 30 fs and energy densities in range of 197 J/cm<sup>2</sup>. Punch biopsy of lesion was excised at 3, 5, 7 and 14 days post-irradiation. The biopsies obtained were cryosectioned in slices of 20  $\mu$ m width. Selected area of interface between the irradiated and healthy subdermal burned skin were imaged by TPEFM and SHG technique. In SHG images, collagen fibers were visible and can be quantified during the healing process. According to the images obtained, these methodologies can be used to characterize dermis of burned tissue as its healing process.*

**Key words:** SHG, TPEFM, Ti:Sapphire laser system

## INTRODUÇÃO

A remoção de material por ablação térmica à laser é um método preciso usado em todos os tipos de tecidos biológicos. Nesse tipo de interação a energia do feixe laser é absorvida pelo tecido elevando a temperatura na região causando evaporação. Na ablação mediada por plasma o tecido é removido minimizando os danos térmicos ao tecido. Esse mecanismo de ablação ocorre quando a intensidade do feixe é superior ao limiar de ablação do tecido ocasionando uma quebra das ligações eletrônicas no material. Os lasers de pulsos ultra-curtos tem a vantagem de ser relativamente rápidos na sua aplicação, de fácil uso em áreas inacessíveis do corpo com quase nenhum sangramento [1]. Para caracterizar derme de tecido com queimadura de terceiro grau ablacionado com laser de femtossegundos, a microscopia não-linear oferece vantagens devido o contraste das imagens e a profundidade alcançada. As técnicas de microscopia não-linear incluem: microscopia pela emissão de dois fótons (TPEFM), e geração de segundo harmônico (SHG).

As técnicas de TPEFM e SHG são mais utilizadas para obter imagens de tecidos turvos e finos e também para imagens de amostras biológicas com estruturas altamente organizadas sem qualquer marcador exógeno. Na emissão de dois fótons de moléculas fluorescentes, os dois fótons são absorvidos no mesmo evento quântico, como determinado pelo princípio da incerteza de Heisenberg, na escala de tempo do processo de  $10^{-16} - 10^{-17}$  s [2,3]. A interação ocorre se a soma da energia dos dois fótons é igual a energia requerida para absorção com excitação de um fóton. Os dois fótons usam comprimento de onda, na faixa do infravermelho próximo - NIR (700 – 1000 nm), que permitem imagens de tecidos em profundidade, devido o NIR ser menos espalhado que a luz visível [4]. Como informação complementar detalhando estruturas de sistemas biológicos, o SHG é um processo coerente no qual fótons do feixe laser, passando através de uma estrutura não-linear gera outro fóton com duas vezes a frequência óptica (i.e metade do comprimento de onda), no meio, oposto ao efeito da fluorescência de dois fótons [4]. A intensidade

dos sinais varia de técnica. No SHG, a intensidade é altamente dependente do comprimento de onda de excitação, enquanto que na emissão de dois fótons é influenciado pelo comprimento de onda do laser e a absorbância espectral da estrutura. O objetivo deste estudo é caracterizar derme de tecido com queimadura de terceiro grau ablacionado com laser de femtossegundos.

## MATERIAL E MÉTODOS DE ANÁLISE

No experimento usamos um sistema laser com amplificação de pulsos com varredura em frequência (*chirped pulse amplification* - CPA), de Titânio:Safira, do Laboratório de Lasers Compactos de Altíssima Potência do Centro de Lasers e Aplicações (CLA), do IPEN. Os pulsos gerados pelo sistema de amplificação, utilizado neste estudo possuíam duração aproximada de 35 femtossegundos, taxa de repetição do pulso de 4 KHz, e energia de 17,25  $\mu$ J. (Tabela 1)

Tabela 1

Sistema laser – Ti: Safira	
Comprimento de onda ( $\lambda$ )	830 nm
Duração do pulso ( $\tau_p$ )	35 fs
Taxa de repetição do pulso	4 KHz
Densidade de energia utilizada ( $J/cm^2$ )	197

Na caracterização do tecido usamos o sistema laser Mai Tai HP (Spectra Physics, Santa Clara, CA), bombeado por um laser de Ti:Safira (Millennia<sup>®</sup>, Spectra Physics, Santa Clara, CA), com largura temporal de pulso de aproximadamente 100 fs, taxa de repetição de 80 MHz. Para o TPEFM, o laser operou em 766 nm e 690 nm. Para o SHG foi em 793 nm. O microscópio multifóton consiste de uma unidade de escaneamento laser (Olympus Fluoview 300), montado em um microscópio confocal invertido (Olympus IX81), com objetiva de imersão à óleo (40x, NA = 1.30), para a focalização do feixe de excitação e para coletar o sinal retroespalhado.

Após aprovação no Comitê de Ética Animal, as amostras foram obtidas de ratos Wistar, machos, adultos, sacrificados por dose letal de anestésicos. No dorso de cada animal foi queimada uma área com diâmetro de 8

mm, causado por exposição a fonte de vapor (~90 °C), durante 7 s. Amostras da queimadura de terceiro grau foram retiradas no terceiro, quinto, sétimo e décimo quarto dia pós-irradiação. A amostra coletada em cada dia foi imersa em isopentano para criopreservação e armazenada em nitrogênio líquido. O corte utilizado nas técnicas foi transversal a epiderme, compreendendo uma seção transversa das camadas da epiderme e derme, com espessura de 20 µm. Os cortes foram montados sobre uma lâmina histológica e coberta com lamínula. Para TPEFM/SHG nenhum tipo de corante foi utilizado.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Imagens de TPEFM e SHG de áreas selecionadas na interface entre o tecido sadio e o lesionado/irradiado, na região subdérmica foram tomadas no modo multicanal, como mostrado na Figura 1. Na imagem, as linhas representam o dia de sacrifício, e as colunas o comprimento de onda de excitação. A coluna a e b representam a excitação do TPEFM, com comprimento de onda de 690 nm e 760 nm, onde a elastina e os fibroblastos puderam ser mostrados, em diferentes profundidades, e coloridos em azul e verde, respectivamente. Na coluna c, o SHG excitado em 793 nm, mostra o colágeno da subderme, colorido em vermelho. Monitorando o processo de cicatrização pela imagem, podemos notar a distribuição e os componentes da matriz extracelular (MEC). Na imagem, o sinal obtido nestas profundidades, fica mais intenso, permitindo uma melhor visualização dos componentes secretados pelas células presentes na MEC.

Os resultados apresentados mostram a validade da técnica para investigar a evolução do processo de cicatrização ao

longo do tempo, validando a eficiência das técnicas de microscopia TPEFM e SHG para analisar o tecido queimado e ablacionado com laser de femtossegundos. Observamos que os componentes da MEC aparecem com menos intensidade de sinal no início do processo, aumentado com o tempo. Isso pode ser devido aos fibroblastos que restauraram a estabilidade mecânica na lesão, secretando colágeno, elastina e proteoglicanas[6, 7]. A estrutura morfológica do colágeno muda como podemos observar pela Figura 1, e desenvolve um papel importante na pele, no tecido intersticial e na lâmina basal, e sua síntese é importante na fase proliferativa do processo de cicatrização e marca o início da renovação estrutural do tecido.

## **CONCLUSÃO**

De acordo com as imagens obtidas por TPEFM e SHG, essas metodologias podem ser utilizadas para caracterizar derme de tecido queimado e ablacionado, bem como seu processo de cicatrização. Os sinais adquiridos possuem a capacidade de melhor diferenciar a estrutura das proteínas endógenas que originam o SHG e a TPEFM. As técnicas permitiram obter imagens das células com reduzida fototoxicidade e fotocclareamento [7].

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem o apoio financeiro das seguintes agências de fomento: FAPESP CEPID (05/51689-2), FAPEAM - Programa RH-POSGRAD, Instituto Nacional de Fotônica – INFO/CNPq (573916/2008-0).

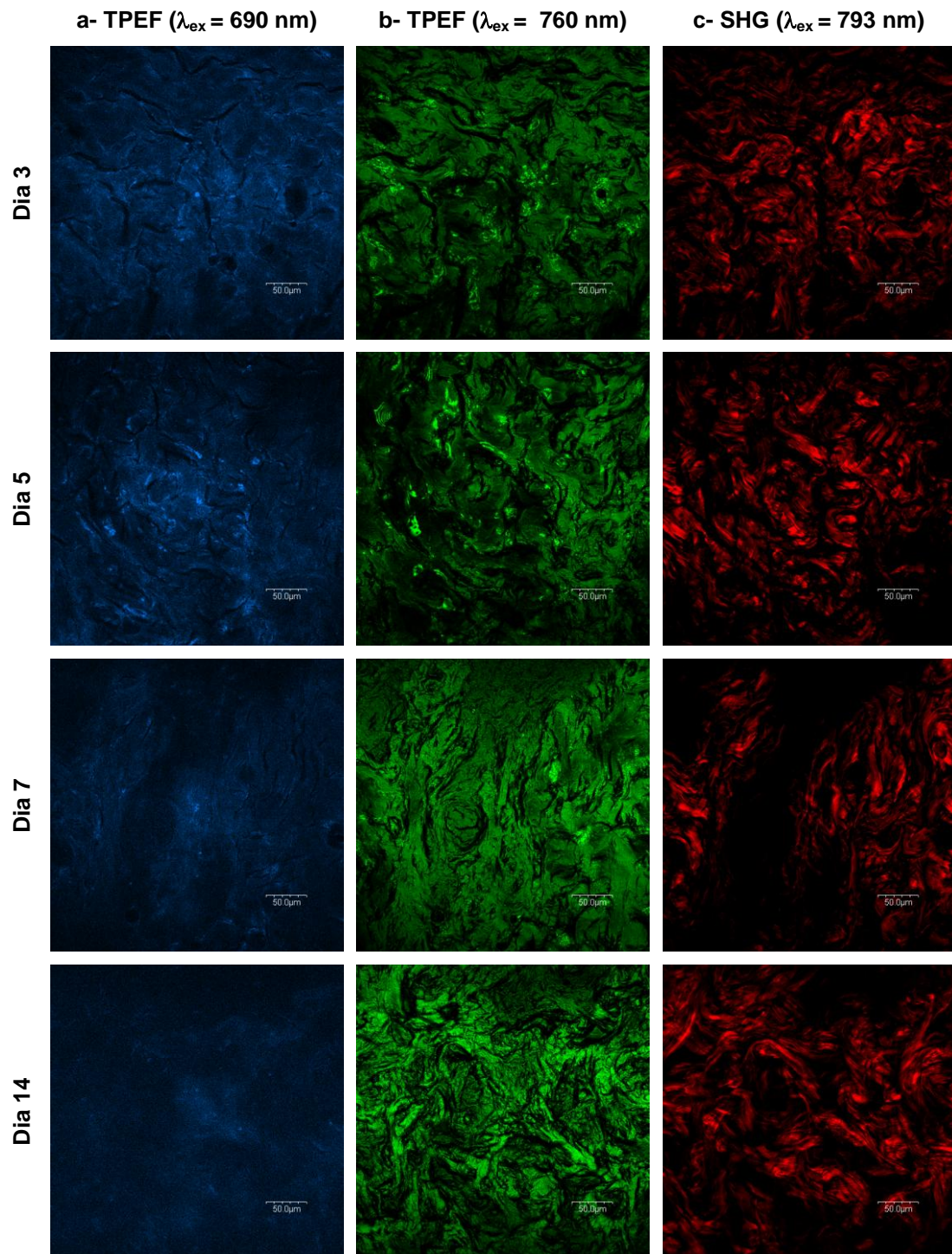


Figura 1 – Imagem da seção transversal da pele com espessura de 20  $\mu\text{m}$ . A coluna (a) representa a autofluorescência com comprimento de onda de excitação em 690 nm; a coluna (b), representa a autofluorescência com comprimento de onda de excitação em 760 nm; e a coluna (c), representa o SHG com comprimento de onda de excitação em 793 nm. A fluorescência do TPEFM vem dos componentes da MEC, e do SHG vem das fibras de colágeno da derme. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

## REFERÊNCIAS

[1] EVISON, D.; BROWN, R.F.R.; RICE, P. The treatment of sulphur mustard burns with laser debridement. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*. 59, p1087-1096, 2006;

[2] Birks, J. B., *Photophysics of Aromatic Molecules*, Wiley Interscience, (1970).

[3] Nakamura, O., *Fundamentals of two-photon microscopy*, *Microscopy Research and Technique*, 47, 165–171(1999).

[4] Alberto D., Giuseppe C., Maddalena C., Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy, *Quarterly Reviews of Biophysics* 38, 97–166, 2 (2005).

[5] Leslie P. Gartner, James L. Hiatt, *Color Textbook of Histology*, Saunders, 2 edition, Chap. 4 (2001).

[6] Roumen Pankov and Kenneth M. Yamada, "Fibronectin at a glance", *Journal of Cell Science* 115, 3861-3863, (2002).

[7] Hugh M. Gloster, Jr., "Complications in Cutaneous Surgery", *Springer Science and Business Media*, 77-85 (2008).