

Relatório 2012

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de

Fotônica Aplicada à Biologia Celular

INFABiC

Coordenador

Hernandes F Carvalho

Departamento de Biologia Celular – IB – Unicamp

Vice-coordenador

Carlos Lenz Cesar

Departamento de Eletrônica Quântica – IFGW - Unicamp

Índice

1.	Resumo	3
2.	Objetivos	4
3.	Metas.....	4
4.	Biofotônica.....	5
5.	Infraestrutura idealizada - microscopias biofotônicas a serem implantadas	5
6.	As instalações de laboratório e sua operação.....	7
7.	A equipe	9
8.	Oferecimento de cursos, treinamentos e workshops	10
9.	Site oficial do INFABIC	10
10.	Ampliação e adequação da área destinada aos laboratórios principais do INFABIC	10
11.	Equipamentos adquiridos e já instalados	10
12.	Estratégia de aquisição de equipamentos e utilização de fundos	11
13.	Propostas complementares para financiamento do INFABIC	12
14.	Recrutamento de pessoal.....	12
15.	Produção bibliográfica no ano de 2012.....	12

1. Resumo

No período a que se refere este relatório, foram concentrados esforços para (1) finalização do projeto executivo para construção do laboratório sede do INFABIC e obtenção de verbas complementares, (2) instalação dos equipamentos adquiridos através do programa EMU-FAPESP, (3) elaboração de novo projeto de continuidade submetido à Unicamp, para candidatura ao CT-INFRA2013 FINEP, (4) realização de processo de seleção e contratação de técnico especializado para atuar junto ao laboratório. Com a utilização da infra-estrutura existente nos laboratórios associados, foram publicados 160 artigos científicos. A extensão das atividades e disponibilização da infra-estrutura a outros pesquisadores (pesquisadores associados), adiciona a esta lista 114 outros artigos publicados em 2012. Destacam-se também a participação de nossos pesquisadores em congressos nacionais e internacionais, a participação na organização do X Congresso Internacional de Biologia Celular no Rio de Janeiro e o oferecimento do II Workshop Teórico-Prático de Microscopia do INFABiC. Em 2012 foi também realizada análise para continuidade do INCT-INFABiC por mais 24 meses.

Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular

(INFABiC)

2. Objetivos

- (1) Implantar o primeiro laboratório de microscopia multimodal baseado em técnicas fotônicas e aplicado à Biologia Celular, reunindo as técnicas de microscopia confocal *single e multiphoton*, equipadas com FLIM e FCS, microscopias SGH, THG, CARS, Tip-Enhancement e microespectroscopia/microscopia Raman, individualmente e/ou em conjunto;
- (2) Desenvolver um sistema de conexão entre diferentes microscópios, que permita o compartilhamento do laser pulsado;
- (3) Efetuar análises simultâneas de diferentes parâmetros celulares, empregando arranjos específicos das diferentes metodologias existentes, em células vivas;
- (4) Realizar estudos correlacionados entre microscopias ópticas e fotônicas, com suporte em abordagens complementares, e
- (5) Desenvolver e aprimorar abordagens e processos já existentes e que fazem parte desta proposta.

3. Metas

Curto prazo (até dois anos)

- (1) Concluir a ampliação do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB
- (2) Adquirir os equipamentos solicitados e instalá-los
- (3) Elaborar regimento do INFABiC
- (4) Estabelecer rotinas de cursos, seminários e discussões sobre projetos em andamento
- (5) Iniciar estudos propostos nos diversos subprojetos utilizando os equipamentos adquiridos
- (6) Utilizar os resultados científicos que devem aparecer rapidamente para submeter outros pedidos de financiamento para atualização contínua da infraestrutura, eventos e bolsas.
- (7) Definir metas para os próximos períodos

Médio prazo (até cinco anos)

- (1) Definir prioridades e concluir os estudos propostos
- (2) Ampliar o grupo de pesquisadores com base na análise de propostas recebidas
- (3) Avaliar desempenho do INFABiC
- (4) Realizar primeiro workshop com apresentações de resultados obtidos no INFABiC e avaliar impacto de sua criação na qualificação dos trabalhos realizados pelos membros da equipe
- (5) Redefinir metas e subprojetos do Instituto para os próximos períodos e submeter outros projetos para garantir a atualização contínua do parque de técnicas e equipamentos.

4. Biofotônica

O termo fotônica, derivado da palavra fóton, foi criado em 1967 pelo cientista francês Pierre Aigrain como a “Ciência para Controlar e Manipular os Fótons”. A biofotônica envolve a fotônica para compreensão e manipulação dos fenômenos e eventos das ciências da vida, o que a torna intrinsecamente uma área de conhecimento multidisciplinar, envolvendo Física, Química, Biologia, Medicina, Engenharias, etc. Isso significa que a pesquisa na área de biofotônica requer a formação de redes de conhecimento multidisciplinar. Existe alguma ambigüidade entre os termos Fotônica e Óptica, assim como existia entre os termos Eletrônica e Eletricidade. Em relação à microscopia, consideram-se microscopias ópticas as que utilizam lâmpadas, incluindo fluorescência “wide-field”, contraste de fase e DIC [Differential Interference Contrast]. Já as microscopias fotônicas utilizam lasers como fontes de luz.

5. Infraestrutura idealizada - microscopias Biofotônicas a serem implantadas

A descrição das diversas técnicas que serão utilizadas pelo Instituto está disponível no site <http://www.ifi.unicamp.br/foton/biofotonica/> de forma intuitiva e didática. Nesse site também

estão disponíveis exemplos de filmes de manipulações celulares com pinças ópticas, de imagens confocais e outros resultados obtidos no laboratório de Biofotônica do IFGW - UNICAMP. Essa seção é dedicada à apresentação das diversas técnicas que serão implantadas no laboratório. Só as técnicas de microscopias disponíveis comercialmente serão implantadas para garantir a facilidade de uso, manutenção e a utilização real para estudos em ciências da vida. O objetivo fundamental do gerenciamento do laboratório será para garantir essa utilização das ferramentas da forma mais intensa e pelo maior número de pesquisadores possível. O desenvolvimento de novas técnicas será realizado no laboratório de biofotônica já existente no Instituto de Física e, essas técnicas novas só serão disponibilizadas no laboratório sede do INFABIC após testes de facilidade de uso e reproducibilidade.

O projeto propõe implantar de forma integrada as seguintes técnicas biofotônicas: microscopias confocais de varredura “single-photon” [confocal tradicional] e “two-photons” ou “multiphoton”, microscopias SHG [Second Harmonic Generation] e THG [Third Harmonic Generation], microespectroscopia e microscopia Raman, microscopia CARS [Coherent AntiStokes Raman Scattering], microscopias baseadas no tempo de vida de fluorescência FLIM [Fluorescence Lifetime Imaging], FRET [Förster Resonant Energy Transfer], FCS [fluorescence Correlation Spectroscopy]. A técnica FRAP (Fluorescence Recover After Photobleaching) será disponibilizada através da instalação de softwares apropriados. Técnicas de “spinning disk” serão utilizadas para observação de processos mais rápidos. Os microscópios serão equipados com pinças ópticas, para permitir disparar processos através de múltiplas micro-manipulações celulares sem contacto físico e também de realizar medidas de propriedades biomecânicas de células, membranas, organelas e tecidos. Sistemas de fotoativação, micro-dissecção e micro-cirurgia com laser de femto-segundos e de UV também devem ser implantados. Microscopia óptica acoplada a sistema de captura de imagem em alta velocidade será destinada à análise de processos rápidos *in vivo*. Um conjunto de equipamentos para preparação de amostras e de microscopias convencionais deve estar no mesmo laboratório para pré-visualizações rápidas antes da utilização dos equipamentos mais sofisticados. A infraestrutura idealizada deverá também ser capaz de receber e manter materiais biológicos diversos, assim como manter condições adequadas de cultivo celular para uso pelos usuários de outros laboratórios ou universidades ou cidades.

6. As instalações de laboratório e sua operação

As diversas técnicas de microscopias biofotônicas serão montadas em um conjunto de 4 mesas ópticas conectadas contendo 3 a 4 microscópios e todos os lasers, de modo que os diferentes feixes possam ser utilizados em qualquer um dos microscópios sem perder o alinhamento. Duas outras mesas ópticas acomodarão as microscopias mais convencionais. O espaço físico do laboratório incluirá uma grande sala para acomodar as mesas ópticas conectadas com espaço de circulação. Para tanto haverá uma ampliação do laboratório de microscopia eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP. Após uma série de discussões, concluiu-se que o laboratório deveria também dar suporte para a manutenção e processamento de células em cultura e materiais diversos trazidos pelo usuário.

A montagem dos diversos lasers e microscópios deve permitir a utilização simultânea e integrada das diferentes técnicas de microscopia. As técnicas de óptica não linear, especialmente, utilizam lasers com pulsos tão curtos quanto dezenas de femto-segundos, sistemas laser de múltiplos pulsos de pico-segundos sincronizados no tempo, sistemas laser de nano-segundos até diferentes lasers contínuos, sofisticados e caros, cuja operação deve ficar a cargo de um profissional com forte treinamento na área de lasers e conhecimento de física e óptica. Para garantir a utilização das diversas técnicas pelos pesquisadores da área de ciências da vida o laboratório será operado por, pelo menos, dois técnicos de alto nível [espera-se que com doutoramento em Física ou Engenharia Elétrica/Eletrônica/Biomédica], em turnos, por até 12 horas diárias. Nenhum equipamento de grande porte será adquirido sem a garantia de treinamento e reciclagem dos técnicos do laboratório por parte do fabricante. A manutenção e gerenciamento dos materiais do laboratório também ficarão a cargo dos técnicos. Já está em andamento o processo de seleção de um técnico oferecido pela Unicamp como contrapartida.

Toda a utilização deverá ser feita em conjunto entre o usuário, que entende do problema biológico e é responsável pela preparação das amostras, e o técnico do laboratório, responsável por garantir o funcionamento do equipamento e instruir o usuário. No caso de usuário com nenhum treinamento, mas de posse de um problema biológico relevante, o técnico deve operar o microscópio sobre a supervisão do usuário. Pesquisadores principais da equipe proponente devem também reservar um horário de consultoria para que os usuários apresentem seus objetivos e possam discutir as melhores estratégias para aquisição de seus dados. Espera-se que

esse procedimento evite a não utilização dos equipamentos sofisticados pelos pesquisadores de ciências da vida por receio ou desconhecimento dos princípios físicos envolvidos, ao mesmo tempo em que se evita possibilidade de danificar os equipamentos por má utilização, ou mesmo acidentes com feixes de laser potentes.

Os lasers e outros acessórios de microscopia devem permitir utilização compartilhada em mais de um microscópio para garantir a continuidade dos trabalhos de outros membros da equipe enquanto um microscópio esteja ocupado, às vezes até por vários dias, acompanhando o desenvolvimento de um processo celular. Considerando que o estudo de processos celulares é um dos objetivos principais desse Instituto deve-se garantir um microscópio para a realização desses estudos, mesmo quando demorados. Feixes de lasers de alta potência podem ser divididos e utilizados em vários microscópios simultaneamente. Lasers baratos de baixa potência como alguns lasers de diodo, devem ser adquiridos para cada microscópio individualmente, evitando constante realinhamento dos mesmos em diferentes plataformas. Por outro lado em experimentos que requerem obtenção de filmes do tipo “time-lapse”, com aquisição de uma imagem a cada intervalo de tempo, a montagem do laboratório deve permitir que os lasers sejam utilizados em outro microscópio no tempo morto do experimento de “time-lapse”.

O projeto também prevê uma infraestrutura de rede de comunicações para permitir utilização das microscopias à distância. Nesse caso, o pesquisador envia a amostra, de preferência através de um orientado, mas terá acesso remoto em tempo real às imagens obtidas e mesmo algum controle sobre os parâmetros do microscópio, como posicionamento XYZ da amostra, por exemplo. Isso será obtido através de uma conexão direta por fibras ópticas em cooperação com o programa Kyatera da FAPESP. O INFABIC deverá manter um site com um programa de agendamento de consultorias e dos equipamentos segundo uma ordem de prioridades definida pelo comitê gestor baseada na disponibilidade e importância dos trabalhos desenvolvidos. O compromisso com a equipe de pesquisadores que toma parte desse projeto deve ser honrado garantindo prioridade máxima aos mesmos, com acesso imediato caso exista disponibilidade e um prazo para utilização da infraestrutura inferior a três semanas.

7. A equipe

Com essa infraestrutura multiusuária o INFABIC deve atender a uma grande parcela da comunidade de pesquisadores envolvidos com estudos de processos em nível celular. A equipe desse projeto inclui pesquisadores do Instituto de Física e Instituto de Biologia, da Faculdade de Ciências Médicas e da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Instituto de Ciências Biomédicas da USP-SP, disciplinas de Oftalmologia e de Reprodução Animal da UNIFESP-SP, Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, FIOCRUZ-RJ e Biologia da UFF, no Estado do Rio de Janeiro. A Polícia Técnica Civil do Estado de São Paulo também está na equipe para realização de pesquisas forenses. A iniciativa privada está presente através das empresas KOM-LUX de Campinas. Uma conexão com a clínica será reforçada pela participação do Hospital Pérola Byington de São Paulo, além do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher e do Hemocentro da Unicamp. A parceria entre o Coordenador deste projeto, Prof. Dr. Hernandes F. Carvalho, Professor Titular de Biologia Celular da Unicamp e ex-Presidente da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, com ampla experiência em microscopias e em fisiologia celular e o seu vice-Coordenador, Prof. Dr. Carlos Lenz César, Professor Titular do IFGW da Unicamp, com ampla experiência em fotônica e biofotônica, em conjunto com os demais membros do Instituto parecem adequadas para fomentar o desenvolvimento da fotônica aplicada à Biologia Celular. Com a restrição do Edital de que cada pesquisador só pode participar de uma proposta, houve significativa dispersão de pesquisadores com interesse potencial em outros projetos, o que tornaria a equipe deste projeto ainda mais significativa, o que pode ser observado através de várias colaborações já existentes com coordenadores e participantes de outros INCTs.. A infraestrutura inicial aliada aos trabalhos desenvolvidos ao longo do tempo na mesma deve garantir o financiamento de sua operação por tempo longo, sua continuidade e a modernização.

O Comitê gestor do Instituto é composto por Hernandes F. Carvalho (Coordenador); Carlos Lenz Cesar (Vice-coordenador); Luciana Bolsoni Lourenço (membro); Konradin Metze (membro); Ruy G Jaeger (membro externo à Unicamp); Rosiane Lopes da Cunha (suplente); Fátima Bötcher-Luigi (suplente).

Após sua implantação, o INFABiC agregou mais 23 usuários, cuja produção é listada a seguir.

8. Oferecimento de cursos, treinamentos e workshops

No ano de 2012, foi organizado o segundo *Workshop Teórico Prático – Explorando a microscopia confocal e a óptica não linear na análise de materiais biológicos*, de 26 de novembro a 07 de dezembro de 2012, na UNICAMP, que recebeu mais de 90 inscrições.

Para o próximo ano planejamos realizar um workshop internacional, além do workshop teórico prático para estudantes, fazer um curso de treinamento para técnicos especializados em microscopia fotônica e realizar um evento conjunto Biologia e Física, em ação conjunta com a Sociedade Brasileira de Biologia Celular, a Sociedade Americana de Biologia Celular, USP, UNICAMP e FAPESP.

9. Site oficial do INFABIC

www.inct-infabic.ib.unicamp.br

10. Ampliação e adequação da área destinada ao laboratório principal do INFABIC

Após longo processo, a obra está em fase de licitação. Isto só foi possível graças à generosa contribuição da Reitoria da Universidade, através do Magnífico Reitor Fernando F Costa, que aportou o valor de R\$ 700.000,00 para esta construção.

11. Equipamentos adquiridos e já instalados

O sistema de FLIM, (adquiridos via EMU-FAPESP) foi instalado e tem sido utilizado rotineiramente.

O novo confocal LSM780 da Carl Zeiss foi instalado e permitiu adaptações para a microscopia intravital, tendo sido obtidas as primeiras imagens de pâncreas, glândula salivar e

glândula mamária de animais vivos. O sistema de *spinning disk* da Andor também está instalado e em utilização.

Estratégia de aquisição de equipamentos e utilização de fundos

Equipamento	Agência/valor	Equipamento complementar	Valor agência
Sistema confocal Zeiss LSM780	FAPESP	Laser MaiTai de femto segundos	CNPq/FAPESP (2)
Sistema de microdissecção Palm	FAPESP	Microscópio invertido Observer	FAPESP
Spinning disk	CNPq		
Mesas antivibratórias	CNPq/FAPESP (2)		
Ampliação de área construída e adequação de laboratório	CNPq		

12. Projetos complementares

Projeto	Agência	Valor	Itens complementares relacionados
Equipamentos Multiusuários Coord. Hernandes F. Carvalho	FAPESP Proc.09/54164-9	US\$ 1,563,736.82 (aprovado)	1. Microscópio confocal NLO upright espectral 2. Sistema de AFM e tip-enhancement 3. Sistema FLIM e FCS 4. Sistema de pinças ópticas múltiplas e microdissecção 5. OPO de femtosegundos para THG
Auxílio implantação Coord. Hernandes F Carvalho	FAEPEX/ UNICAMP Proc. 1076/09	R\$ 20.000,00 (já aprovado)	1. Despesas com instalação do INCT
Auxílio infra-estrutura de laboratórios Coord. Hernandes F Carvalho	FAEPEX/ UNICAMP	R\$ 56.000,00 (já aprovado)	2. Adequação de mobiliário e bancadas de laboratório

CT-INFRA 2012	FINEP	Não selecionado pela COPEI-UNICAMP
CEPID - Sangue	FAPESP	Não aprovado na segunda fase
CT-INFRA 2013	FINEP	Em fase de análise pela COPEI-UNICAMP

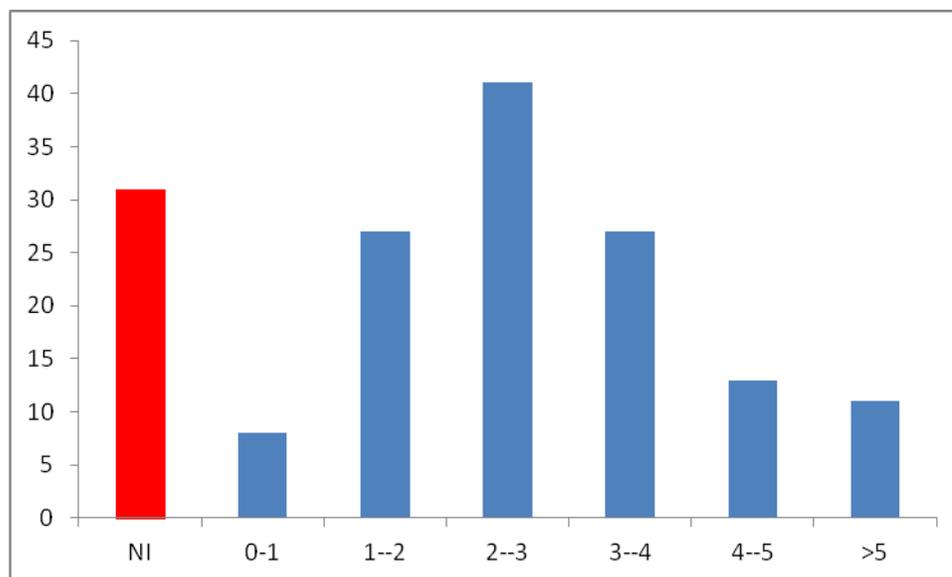
13. Recrutamento de pessoal

1. Bolsista de PD – Andrius Masedunskas (Bolsa CAPES – período março-setembro 2012)
2. Professor Visitante – Javier F. Adur (FAPESP)
3. A vaga para segundo técnico de nível superior foi preenchida e o servidor contratado pela Unicamp, tendo o início de suas atividades em novembro 2012.

13. Produção bibliográfica no ano de 2012

Foram publicados 160 artigos pelos participantes do INFABIC no ano de 2012.

A seguir são apresentadas as publicações individuais, não removidas as duplicações por colaborações entre seus membros. Na figura abaixo se pode identificar que a maior parte dos artigos publicados (80,6%) são indexados e que a maior parte deles (94%) em revistas com índice de impacto maior que 1. Na segunda lista são apresentados os novos colaboradores e a lista de 114 artigos por eles publicados.



Distribuição do índice de impacto das revistas utilizadas pelos pesquisadores do INFABIC (NI = não indexado). Fonte JCR 4.5 Fator de Impacto 2011.