

Hablemos de...

Aplicaciones de la microscopia confocal

RAFAEL SAMANIEGO

Unidad de Microscopia Confocal. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

La microscopia de fluorescencia ha experimentado un impulso excepcional durante la última década. El desarrollo del microscopio confocal (MC) junto con el descubrimiento de la proteína fluorescente GFP (del inglés *green fluorescence protein*) han permitido estudiar de manera sistemática múltiples aspectos estructurales y funcionales de las proteínas en las células vivas. Mientras que los microscopios convencionales de fluorescencia producen imágenes contaminadas por la luz emitida fuera de foco, el MC secciona ópticamente la muestra y genera imágenes que corresponden exclusivamente a los distintos planos de foco. Gracias a este y otros importantes avances, el MC permite visualizar marcados múltiples en células, tejidos u órganos, hacer reconstrucciones tridimensionales (3D) a partir de múltiples secciones confocales, o estudiar los parámetros dinámicos de las proteínas mediante videomicroscopia. Además, el desarrollo de proteínas fluorescentes con propiedades distintas ha favorecido la aparición de nuevas aplicaciones, capaces de ofrecer información por debajo del límite de resolución de la microscopia de fluorescencia.

Puntos clave

- La microscopia confocal es una de las herramientas de investigación más utilizadas en biología y biomedicina.
- El microscopio confocal (MC) permite seccionar ópticamente una muestra de forma no invasiva.
- La reconstrucción tridimensional y el análisis de colocalización son las aplicaciones más frecuentes del MC.
- El descubrimiento de la proteína fluorescente GFP (del inglés *green fluorescence protein*) ha permitido estudiar los parámetros dinámicos de las proteínas en células vivas.
- El desarrollo de nuevas proteínas fluorescentes ha dado lugar a nuevas aplicaciones, superando el límite de resolución de la microscopia de fluorescencia.

Principios básicos

Fluorescencia es el fenómeno por el cual una molécula, denominada fluorocromo o fluoróforo, emite luz unos nanosegundos después de haber absorbido luz de menor longitud de onda. Por ejemplo, el fluorocromo FITC emite luz verde tras ser excitado con luz azul. Aparte de la posible autofluorescencia que pueda producir una muestra¹, la fluorescencia proveniente de ésta corresponde a la emitida por los fluorocromos utilizados en el marcado, en un rango que va desde el azul al rojo lejano, según su espectro de emisión² (fig. 1 y 2A). Hay numerosas sondas comerciales acopladas a fluorocromos, como anticuerpos, lípidos, nucleótidos, toxinas, etc., que permiten estudiar la distribución (sub)celular de proteínas, lípidos o ácidos nucleicos; marcar células enteras en estudios morfológicos o comparativos (*trackers*);

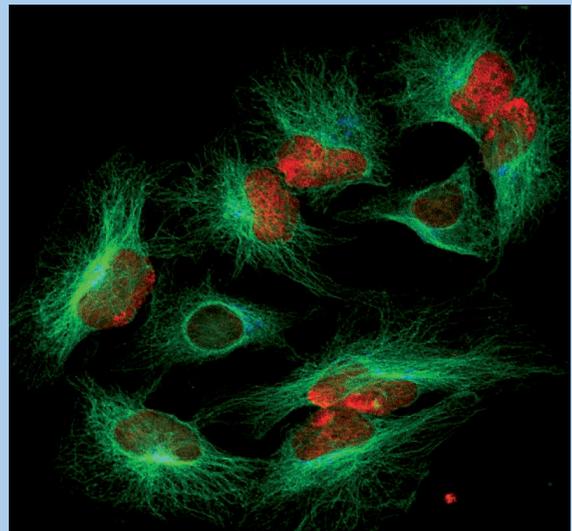


Figura 1. Triple marcaje en células adheridas a colágeno utilizando anticuerpos secundarios acoplados a Quantum-Dots. La imagen es una sección confocal que muestra la disposición subcelular del núcleo (rojo), el retículo endoplásmico (verde) y los endosomas primarios (azul).

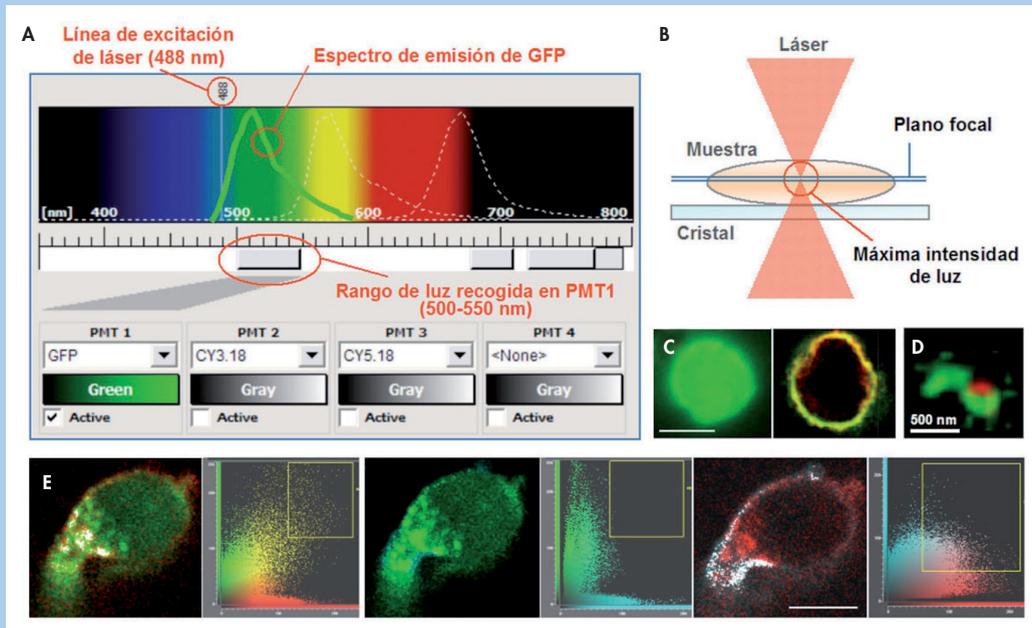


Figura 2. Cuadro de ajuste de parámetros de un microscopio confocal (MC) modelo Leica SP2 durante la adquisición del fluoróforo de la GFP (del inglés green fluorescence protein), donde se muestra la línea de excitación del láser (488 nm), el espectro de emisión de GFP (también se enseña el de los fluoróforos Cy3 y Cy5), y el ancho de banda seleccionado para recoger la señal en el fotomultiplicador 1 (Leica utiliza un prisma que permite regular libremente el ancho de banda, otras marcas utilizan espejos dicróicos para cada color). B. Representación del haz de luz producido por el láser de un MC concentrando su máxima intensidad en el plano de foco. C. Marcado periférico celular visualizado mediante un microscopio de epifluorescencia (izquierda) y un MC (derecha, doble marcado), en ambos casos el plano de foco coincide con el ecuador de la célula. D. Detalle de una estructura de clatrina-GFP (verde) y un punto de transferrina acoplada al fluorocromo Texas red (rojo), ambas estructuras muy pequeñas y cercanas al límite de resolución (200 nm en xy). E. Triple marcado en un linfocito T polarizado: clatrina-GFP (verde), transferrina-Texas red (rojo) y CD45 como marcador de membrana (azul). Las imágenes muestran la colocalización de las proteínas dos a dos y sus correspondientes scatter-plots, sobre cada imagen aparece una máscara de píxeles de colocalización en blanco, correspondiente a las zonas seleccionadas en los scatter-plots (rectángulos amarillos). Barras de escala, 10 μ m.

teñir orgánulos o estructuras celulares (*dyes*); detectar cambios en las concentraciones de iones mediante fluoróforos sensibles al medio que cambian su espectro de fluorescencia (color de la luz emitida) en determinadas condiciones fisiológicas^{2,3}, etc. Recientemente, se han incorporado al mercado los denominados *Quantum-Dots*, cristales nanométricos fluorescentes con un espectro de emisión estrecho y una gran resistencia al blanqueamiento. En la figura 1 se muestra un ejemplo de marcaje celular con anticuerpos acoplados a *Quantum-Dots*.

La microscopia de fluorescencia ha evolucionado de manera extraordinaria y se ha convertido en una de las herramientas de investigación más utilizadas en biología y biomedicina. El microscopio de fluorescencia confocal, también denominado CSM (del inglés *confocal scanning microscope*), permite la adquisición de imágenes digitales de alta resolución correspondientes a la fluorescencia producida en distintos planos de foco (confocal), y produce secciones ópticas a lo largo del eje z de una muestra marcada con uno o varios fluorocromos^{3,4}. El MC utiliza como fuente de iluminación distintos tipos de láser controlados por un siste-

ma acústico-óptico de filtrado (AOTF) capaz de concentrar la máxima intensidad de la luz en el plano de foco a longitudes de onda determinadas (fig. 2B); los sistemas convencionales utilizan una lámpara de mercurio que irradia la muestra de forma indiscriminada. Durante la adquisición de la imagen, el láser barre la muestra a gran velocidad (*scanning*) y la fluorescencia emitida en cada punto es recogida por un fotomultiplicador (PMT) tras atravesar un filtro denominado *pinhole*, que bloquea el paso de toda señal fuera de foco (fig. 2A, C).

El desarrollo de objetivos de alta apertura numérica, junto con la capacidad del MC para hacer *zoom* sin pérdida de resolución, han hecho posible la visualización de estructuras de hasta 200 nm de tamaño real (límite de resolución en xy), incluso menores si la señal emitida es lo suficientemente brillante⁴ (fig. 2D). Aunque el

Durante la adquisición de la imagen, el láser barre la muestra a gran velocidad (*scanning*) y recoge la fluorescencia emitida en cada punto del plano focal.

El microscopio confocal (MC) permite obtener secciones ópticas a lo largo del eje z de una muestra.

El *pinhole* filtra la fluorescencia emitida fuera de foco.

El MC permite visualizar estructuras de hasta 200 nm de tamaño real.

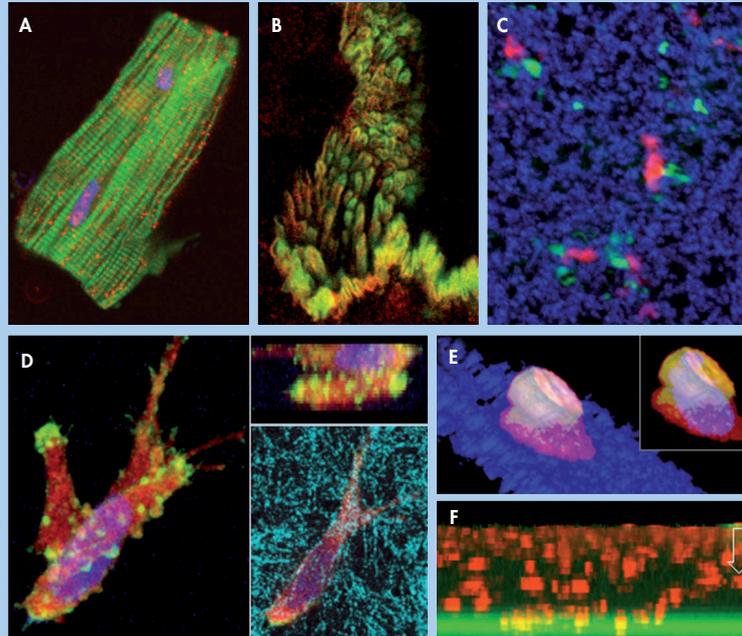


Figura 3. A. Cardiomiocito marcado de forma simultánea para filamentos de actina (verde), estructuras citoplasmáticas (rojo) y ADN (azul). La imagen es una proyección vertical de 5 cortes confocales. B. Criocorte de una biopsia correspondiente a un paciente con enfermedad autoinmunitaria. La imagen es una sección óptica confocal de la región dermoepidérmica, donde se pueden observar el depósito autoinmunitario (verde) y un marcador de la lámina basal (rojo). C. Pulmón de ratón teñido con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) para visualizar los núcleos celulares (azul). El pulmón se visualiza directamente con un objetivo $\times 10$, 2 h antes se inyectaron por vena una mezcla de células tumorales marcadas con trackers rojo (CMTMR) y verde (calceína). D. Triple marcado de una célula tumoral (verde, rojo y azul) invadiendo una matriz de colágeno. A la izquierda se muestra la proyección vertical de 20 secciones ópticas. A la derecha, reconstrucción lateral tridimensional (3D) (panel superior) y corte confocal enseñando las fibras de colágeno de la matriz detectadas mediante reflexión (cián). E. Doble marcado de una célula tumoral (verde, rojo) sobre una matriz de colágeno (azul). La imagen corresponde a una reconstrucción 3D de la célula en un ángulo distinto a 90° . En el panel insertado, el azul corresponde a la posición del núcleo. F. Reconstrucción de un gel de colágeno de $150 \mu\text{m}$ invadido por decenas de células tumorales (rojo). En verde la reflexión de la membrana sobre la que se polimeriza el gel. (Imágenes cortesía de J. Gallego, I. Treviño, A. Estecha y P. Sánchez-Mateos, investigadores del Hospital Gregorio Marañón.)

MC es el más utilizado, hay otros sistemas alternativos capaces de generar secciones ópticas de un modo no invasivo para la muestra. El microscopio multifotón ilumina exclusivamente el punto del espacio barrido en ese momento, por lo que es innecesario el uso del *pinhole*⁵; los microscopios TIRF (del inglés *total internal reflection fluorescence*) sólo irradian el plano situado inmediatamente sobre el cristal, y producen una sección óptica de 100 nm de grosor de gran utilidad en estudios de estructuras de membrana⁶; por último, las imágenes de deconvolución eliminan la señal fuera de foco mediante algoritmos informáticos⁷.

Aplicaciones más frecuentes: colocalización y análisis tridimensional

El análisis de colocalización y la reconstrucción 3D son con gran diferencia las aplicaciones más utilizadas por los usuarios del MC. Dos o más moléculas colocalizan cuando se detectan en un mismo lugar, lo que permite relacionar una molécula con una estructura u órgano en el ámbito subcelular, un tipo celular

dentro de un tejido, un estado fisiológico, etc. Desde el punto de vista digital, 2 fluorocromos colocalizan cuando su emisión coincide en un mismo *voxel* (píxel tridimensional), lo que permite analizar la colocalización en representaciones denominadas *scatter-plots* donde los píxeles de la imagen (o los correspondientes a una región de interés, ROI) se ordenan en función de su doble intensidad en los ejes de ordenadas y abscisas⁸ (fig. 2E). Estas representaciones permiten el cálculo de coeficientes o la imposición de máscaras de colocalización correspondientes a zonas de píxeles seleccionadas en el *scatter-plot* (fig. 2E). La multitud de parámetros a tener en cuenta durante el análisis de colocalización hacen que este análisis sea a veces más complejo de lo que puede parecer^{9,10}, y aunque el *scatter-plot* es una herramienta de utilidad, es el propio investigador quien en muchas ocasiones determina qué tipo de colocalización existe en su muestra, ya que ésta puede

Mediante FRAP (del inglés *fluorescence recovery after photobleaching*) se puede estimar el tiempo de residencia de una proteína en una determinada estructura.

El MC permite cuantificar la longitud, el área o la intensidad de fluorescencia.

ser parcial o las moléculas pueden no ser igualmente abundantes en una misma estructura. Así, entre los parámetros que influyen en el análisis de colocalización, se pueden destacar la calidad de la muestra o el marcado y los ajustes de adquisición, todo ello crucial a la hora de obtener la intensidad de señal adecuada en la región analizada; el tipo de objetivo también incide en la resolución y la posible aberración cromática (cuando diferentes longitudes de onda tienen planos de foco distintos, produciendo falsos negativos);

Los análisis de colocalización y la reconstrucción tridimensional (3D) son las aplicaciones más utilizadas del MC.

Las proteínas fluorescentes convertibles (*optical highlighters*) permiten realizar el seguimiento del comportamiento dinámico de una parte del total de una proteína.

FRET y FLIM son aplicaciones que revelan cuándo y dónde 2 proteínas se unen covalentemente o cuándo se produce un cambio conformacional en una proteína.

la selección de los fluorocromos apropiados, su barrido independiente (secuencial) y el diseño apropiado de controles permiten reducir falsos positivos debidos al *crossstalk* (cuando al excitar un fluorocromo se produce señal en el espectro de emisión de un segundo fluorocromo), etc.

El análisis 3D mediante la adquisición seriada de secciones ópticas permite estudiar estructuras interconectadas entre sí en distintos planos de foco¹¹. Hay numerosos programas de fácil manejo capaces de generar planos laterales, proyecciones verticales, reconstrucciones en múltiples ángulos o rotaciones generadas a partir de series de proyecciones (fig. 3A-F). Además, es importante destacar que estos programas permiten calcular valores como longitud, área o intensidad de fluorescencia, haciendo del MC una herramienta cuantitativa. El análisis 3D no sólo es posible en el ámbito celular¹²; al utilizar objetivos de bajo aumento se pueden hacer reconstrucciones de hasta 0,4 mm de grosor de la superficie de embriones u órganos (fig. 3C), cortes de tejido, o conjuntos de células embebidas en una matriz, que resultan especialmente útiles en estudios tisulares o de invasión tumoral (fig. 3D, F).

Aparte de la fluorescencia, el MC detecta la reflexión de la luz en especímenes no marcados (fig. 3D). De hecho, los primeros MC desarrollados en la década de 1960 se basaban principalmente en la reflexión interna de la muestra (IRM, del inglés *internal reflexion microscopy*). Esta propiedad se utiliza actualmente en medicina (*in vivo reflectance microscopy*) aplicada al diagnóstico no invasivo de lesiones de piel¹³, córnea¹⁴, en micosis¹⁵, etc. También se han realizado estudios preliminares sobre la utilidad del MC de fluorescencia en el diagnóstico. Un ejemplo son las enfermedades ampollas subepidérmicas autoinmunitarias, donde a partir de biopsias de piel y mediante análisis de colocalización se estudia la relación de los depósitos inmunitarios con los distintos marcadores de la unión dermoepidérmica¹⁶ (fig. 3B). Sin embargo, pese a su potencial para

el diagnóstico al permitir estudios longitudinales en el ámbito molecular, el uso del MC no es frecuente en la práctica clínica, entre otras razones debido a la escasa penetración en la muestra^{17,18}.

Aplicaciones en células vivas: proteínas acopladas a GFP y sus variantes

El desarrollo de la ingeniería genética en la última década ha hecho posible la expresión de proteínas “fluorescentes” en células vivas^{2,3,19}. Estas proteínas quiméricas se generan incorporando la secuencia de una pequeña proteína fluorescente, como la GFP, al gen de la proteína en estudio, lo que permite expresar proteínas de fusión “fluorescentes” en las células, y así abordar los parámetros dinámicos de las proteínas (4D, distribución en el tiempo). Es más, analizando el comportamiento o el fenotipo celular producido tras la expresión de proteínas mutadas acopladas a GFP, se pueden estudiar también las características funcionales, estructurales y/o reguladoras de las proteínas y sus dominios peptídicos. La generación de proteínas quiméricas y la alta velocidad de barrido de los microscopios actuales (hasta 30 imágenes por segundo) han propiciado el desarrollo de aplicaciones como el FRAP (del inglés *fluorescence recovery after photobleaching*). Mediante FRAP se puede estimar el tiempo de residencia de una proteína en una determinada estructura o compartimiento, midiendo para ello el tiempo que tarda en recuperar la fluorescencia una región que previamente se ha blanqueado. El blanqueamiento o *photobleaching* se consigue irradiando de manera intensa y prolongada los fluoróforos de una región de interés, haciendo que alcancen un estado energético inusual (*triplet*) en el que dejan de ser fluorescentes. Los primeros resultados de FRAP demostraron que la mayor parte de las proteínas difunden a gran velocidad por el interior de las células, residiendo desde apenas una fracción de segundo, a unos pocos minutos en la estructura en la que se visualizan, cambiando el concepto de estructura “estable”. La GFP original se ha modificado genéticamente para producir multitud de variantes con nuevas propiedades, con las cuales han surgido nuevas aplicaciones^{2,3}. Un ejemplo son las proteínas fluorescentes convertibles²⁰ (*optical highlighters*), que comienzan a emitir fluorescencia (*photo-activation*) o cambian su espectro de emisión (*photo-conversion*) al irradiarse a una longitud de onda determinada, que permite realizar el seguimiento del comportamiento dinámico de una parte del total de una proteína¹⁹.

Otras aplicaciones permiten obtener información por debajo del límite de resolución (FLIM, FRET), ya que miden cambios en el comportamiento de los fluoróforos que tienen lugar cuando éstos se acercan entre sí a escasos nanómetros³, y permiten conocer dónde y/o cuándo 2 proteínas se unen covalentemente, o cuándo tiene lugar un cambio conformacional en una proteína.

El desarrollo de la ingeniería genética ha hecho posible la expresión de proteínas “fluorescentes” en células vivas.

Aparte de la fluorescencia, el MC detecta la reflexión de la luz en especímenes no marcados.

El análisis 3D mediante la adquisición seriada de secciones ópticas permite estudiar estructuras interconectadas entre sí en distintos planos de foco.

Fuentes de información

Los avances constantes en el diseño de fluorocromos, herramientas, equipos y aplicaciones generan una cantidad de información que puede resultar abrumadora²¹. No obstante, se pueden encontrar excelentes revisiones en revistas metodológicas, como *Nature Methods* o *Current Protocols in Cell Biology*, que abordan en profundidad y de manera individual desde los aspectos más básicos a las últimas aplicaciones de la microscopía de fluorescencia. Como fuente de información general, también son interesantes los *tutorials* disponibles en red de algunas casas comerciales²². La complejidad de la microscopía actual hace que las unidades o servicios públicos de microscopía –en torno al medio centenar en España– consten no sólo de microscopios, sino también de personal técnico especializado que manipula los equipos y asesora a los usuarios en el diseño experimental, la interpretación de los resultados, o el procesamiento de datos e imágenes²³.

Bibliografía



● Importante ●● Muy importante

1. Neumann M, Gabel D. Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem.* 2002;50:437-9.
2. ●● Lichtmann JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nat Methods.* 2005;2:910-9.
3. ●● Olenych SG, Claxton NS, Ottenberg GK, Davidson MW. The fluorescent protein color palette. *Curr Protocol Cell Biol.* 2007;21:21.5.
4. ●● Conchello JA, Lichtman JW. Optical sectioning microscopy. *Nat Methods.* 2005;2:920-31.
5. Rubart M. Two-Photon microscopy of cells and tissue. *Circ Res.* 2004;95:1154-66.
6. Tokunaga M, Imamoto N, Sakata-Sogawa K. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat Methods.* 2008;5:159-61.
7. Swedlow JR, Platani M. Live cell imaging using wide-field microscopy and deconvolution. *Cell Struct Funct.* 2002;27:335-41.
8. Bolte S, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microscopy.* 2006;224:213-32.
9. Brown CM. Fluorescence microscopy—avoiding the pitfalls. *J Cell Sci.* 2007;120:1703-5.
10. ● North AJ. Seeing is believing? A beginners' guide to practical pitfalls in image acquisition. *J Cell Biol.* 2006;172:9-18.
11. Feng D, Murshburn D, Jen D, Weinberg RJ, Taylor II RM, Burette A. Stepping into the third dimension. *J Neuroscience.* 2007;27:12757-60.
12. Lucitti J, Dickinson ME. Moving toward the light: using new technology to answer old questions. *Pediatr Res.* 2006;60:1-5.
13. Scope A, Andrade CB, Agero AL, Malvey J, Puig S, Rahadhyaksha M, et al. In vivo reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: consensus terminology glossary and illustrative images. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57:644-58.
14. Dhaliwal JS, Kaufman SC, Chiou AG. Current applications of clinical confocal microscopy. *Curr Opin Ophthalmol.* 2007;18:300-7.
15. Agero AL, Gill M, Ardigo M, Myskowsky P, Halpern AC, González S. In vivo reflectance confocal microscopy of mycosis fungoides: a preliminary study. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57:435-41.
16. Campos-Domínguez M, Suárez-Fernández R, Lázaro-Ochaita P. Métodos diagnósticos en las enfermedades ampollas subepidérmicas autoinmunes. *Actas Dermosifiliogr.* 2006;97:485-502.
17. Levenson RM, Mansfield JR. Multispectral imaging in biology and medicine: slices of life. *Cytometry A.* 2006;69:748-58.
18. Scoazec JY. Tissue and cell imaging in situ: potential for applications in pathology and endoscopy. *Gut.* 2003;52:iv1-6.
19. Shaner NC, Patterson GH, Davidson MW. Advances in fluorescence protein technology. *J Cell Sci.* 2007;120:4247-60.
20. Matsuda T, Miyakawa A, Nagai T. Direct measurement of protein dynamics inside cells using a rationally designed photoconvertible protein. *Nat Methods.* 2008;5:339-45.
21. Yuste R. Fluorescence microscopy today. *Nat Methods.* 2005;2:902-4.
22. Tutorial de las casas Nikon/Olympus. Disponible en: <http://www.microscopyu.com>, incluido un completo glosario de términos técnicos, <http://www.olympusconfocal.com/theory/glossary.html>
23. Rossner M, Yamada KM. What's in a picture? The temptation of image manipulation. *J Cell Biol.* 2004;166:11-5.