

Microscòpia òptica avançada per a les ciències de la vida: de les seccions òptiques a la nanodissecció òptica

Lídia Bardia, Maria Marsal i Julien Colombelli

Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona

Correspondència: Julien Colombelli. Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona.

Carrer de Baldri Reixac, 10. 08028 Barcelona. Adreça electrònica: julien.colombelli@irbbarcelona.org.

DOI: 10.2436/20.1501.02.154

ISSN (ed. impresa): 0212-3037

ISSN (ed. digital): 2013-9802

<http://revistes.iec.cat/index.php/TSCB>

Rebut: 16/10/2014

Acceptat: 10/04/2015

Resum

La microscòpia òptica ha patit una gran revolució en les darreres tres dècades amb l'arribada dels làsers i les proteïnes fluorescents. Sent capaços de marcar individualment molècules i proteïnes en cèl·lules i organismes vius, ara els científics poden observar múltiples components cel·lulars i proteïnes simultàniament, al llarg dels diferents compartiments i teixits, i també veure la interacció d'aquests entre si. Com que la microscòpia de fluorescència moderna està esdevenint una veritable microscòpia molecular amb tècniques específiques per a l'estudi de dinàmica de proteïnes com el FRAP o el FRET, la capacitat dels microscopis òptics de generar imatges altament resolutives, tant en la dimensió espacial com en la temporal, ha millorat dràsticament. En aquest capítol revisem els principis bàsics de la fluorescència, la preparació de mostres biològiques i els conceptes òptics darrere els quals es troba la capacitat de la microscòpia confocal de generar imatges tridimensionals a partir de seccions òptiques. També abordem tècniques basades en la manipulació amb làsers com la nanocirurgia per làser i en discutim aplicacions modernes dins de la biologia cel·lular i del desenvolupament, en especial l'ablació cel·lular i la cirurgia intracel·lular, les quals han esdevingut avui dia eines importants per interactuar amb teixits pluricel·lulars, ja que ens permeten avaluar forces i estats biomecànics de les cèl·lules durant processos importants del desenvolupament dels organismes. Finalment, expliquem els principis d'un dels últims avenços en l'adquisició d'imatges de fluorescència, la microscòpia en full de llum, que permet als científics esquivar les principals limitacions de les microscopies convencional i confocal, ja que ofereix les capacitats d'adquirir imatges en profunditat en llargs períodes de temps.

Paraules clau: microscòpia òptica, microscopi confocal, làser, fluorescència, full de llum.

Dels inicis a la microscòpia de fluorescència

Per als antics, el món físic era allò que podien veure. Però va succeir que l'home va interessar-se per conèixer un univers més gran, en tota la seva dimensió, amb l'ajuda dels primers telescopis, i també un món més petit, el que existia per sota dels límits del que es podia percebre amb l'ull humà. A principis del segle XVI es van dissenyar els primers microscopis simples, lents úniques per engrandir objectes petits, tot i que el terme *microscopi* es va emprar per primer cop per referir-se al microscopi compost de Galileu, que ell mateix anomenava *occholino* ('ull petit'). Però un bon microscopi no és aquell que només magnifica, sinó que és aquell en què la imatge generada és ben definida; així doncs, la bona qualitat del funcionament d'un microscopi està determinada per la capacitat de visualitzar i distingir objectes minúsculs

Advanced optical microscopy for life sciences: from optical sections to optical nanodissection

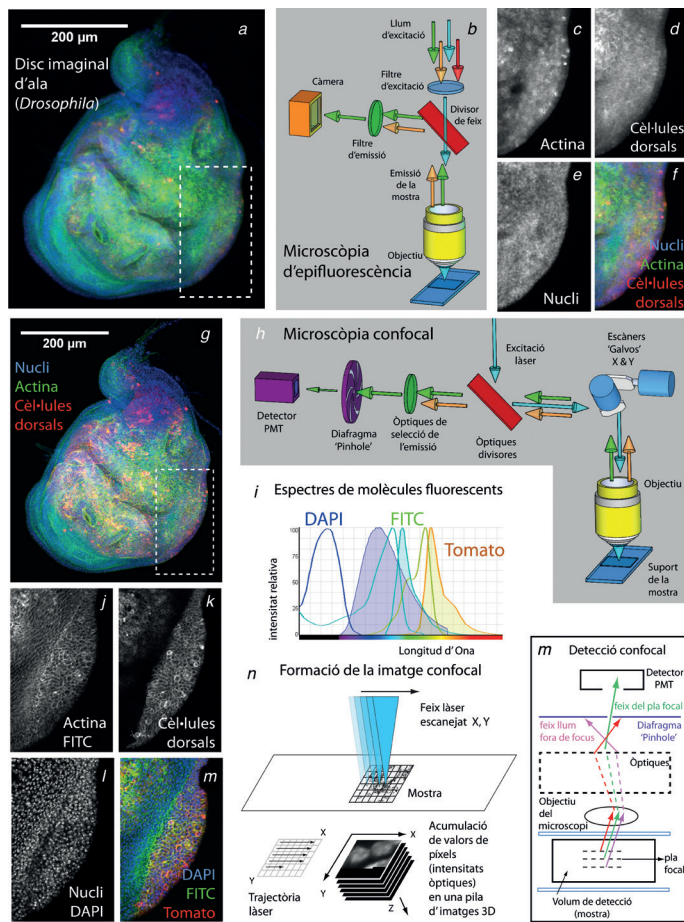
Summary

Optical microscopy has undergone several revolutions in the past three decades with the advent of lasers and fluorescent proteins. By being able to label single molecules and proteins in living cells and organisms, scientists can now observe multiple cellular components and proteins simultaneously, moving across compartments and tissues and interacting with each other. As modern fluorescence microscopy is turning into truly molecular microscopy with specific techniques for the study of protein dynamics like FRAP or FRET, the capability of optical microscopes to generate highly resolved images, both in spatial and temporal dimensions, is also dramatically improving. In this chapter, we review the basic principles of fluorescence, the preparation of biological samples and the optical concepts behind the capability of confocal microscopy to generate three-dimensional images on the basis of optical sections. We also approach laser-based manipulation techniques such as laser nanosurgery and discuss modern applications in cell and development biology, in particular how cell ablation and intracellular surgery have now become important tools for interacting with multicellular tissues since they allow the probing of forces and biomechanical states of cells during important development processes of organisms. Lastly, we set forth the principles of one of the latest advances in fluorescence imaging, light sheet microscopy, which allows experimentalists to circumvent several major limitations of conventional and confocal microscopy by offering the capability of imaging deeply and for very long periods of time.

Keywords: optical microscopy, confocal microscope, laser, fluorescence, light sheet.

en la mostra. Al segle XIX, diferents científics, Abbe, Rayleigh i Airy entre d'altres, van treballar per poder definir un criteri que predigués acuradament el nivell de detall que un microscopi és capaç de resoldre.

Avui sabem que moltes de les qüestions biològiques més rellevants s'han pogut respondre gràcies als microscopis òptics, i que moltes de les encara no respostes són potencialment abordables. El coneixement de les propietats de la llum, la millora tècnica de les lents i les fonts de llum, l'explotació de les capacitats dels microscopis per millorar la resolució fins a superar els límits imposats per la naturalesa de la llum, fan que la microscòpia òptica sigui una eina essencial per a molts dels estudis biològics. Avui dia les tècniques modernes de microscòpia òptica ofereixen la resolució temporal i espacial necessàries



↑ Figura 1. Principis de la microscòpia de camp ampli i confocal.

Comparem les configuracions òptiques així com les imatges resultants de les microscòpies d'epifluorescència i confocal en *a* i *h*, utilitzant com a mostra model un mateix disc imaginal d'ala de *Drosophila*, formada per diverses capes multicel·lulars i amb tres marcatges: DAPI per marcar els nuclis, faloidina-FITC per marcar l'actina de les cèl·lules i una proteïna fluorescent vermella expressada en les cèl·lules dorsals. En *b*, l'esquema simple d'un microscopi d'epifluorescència mostra que l'excitació i l'emissió estan separades mitjançant un divisor de feix de llum i que s'utilitzen filtres d'amplitud de banda fixa per capturar la llum emesa. Un microscopi confocal, en canvi, té moltes implementacions diferents, però una manera genèrica de representar-lo es mostra en *h*. Un làser escaneja a través de l'objectiu per excitar la mostra punt per punt, i l'emissió es recull al llarg del camí òptic on es produirà el filtratge espectral, així com el filtratge espacial clau en la tècnica amb l'ús d'un *pinhole* per produir l'efecte de seccionament òptic. En *n* representem l'efecte de l'escaneig al llarg de la mostra i es mostra el camí del làser i com la imatge és formada tot recollint intensitats òptiques, píxel per píxel, mentre que en *m* mostrem el principi del seccionament òptic, és a dir, l'efecte produït pel *pinhole* que permet descartar els raigs de fora del pla d'enfocament. En *i* es mostren els espectres d'emissió i absorció dels tres fluorocroms usats. L'efecte confocal és sobretot visible quan es compara *j*, *k*, *l* i *m* (epifluorescència) amb *c*, *d*, *e* i *f* (confocal), en què es poden veure clarament imatges molt més nítides així com el rebuig axial de la llum provinent del fons de la mostra. Les imatges en *a* i *g* són projeccions màximes de la mostra sencera, mentre que *c-f* i *j-m* són plans únics. Les imatges en color s'han generat combinant les intensitats de cada canal i assignant a cadascun un color fals diferent, i no representen les propietats espectrals dels fluorocroms. Barra d'escala en *a* i *g*: 0,2 mm.

per permetre estudiar la localització precisa, i dinàmica, de molècules i proteïnes en cèl·lules, teixits, òrgans i, fins i tot en organismes vius.

Tot i que les estructures dins d'una cèl·lula difereixen les unes de les altres, sovint no som capaços de veure-les. Si, a més, no les podem tenir, com podríem distingir-les? Sens dubte, per a la biologia cel·lular i la biomedicina, l'avenc per excel·lència va ser l'aparició de la microscòpia de fluorescència. L'aplicació d'un ampli ventall de fluorocroms ha fet possible la identificació de cèl·lules i components subcel·lulars amb una alta especificitat. Els fluorocroms han d'estar acoblats a proteïnes i d'aquesta manera se'n pot veure la localització. Mitjançant la utilització de marcatges fluorescents múltiples, diferents sondes poden identificar diverses molècules diana simultàniament (vegeu la figura 1). Hi ha fluorocroms naturals, però també se n'estan desenvolupant molts de sintètics, amb els perfils d'excitació i emissió coneguts, que cobreixen àmpliament tot l'espectre de llum (vegeu la figura 1i). Però sobretot, la possibilitat d'expressar *in vivo* proteïnes fluorescents com la GFP (*green fluorescent protein*) i els seus derivats, ha permès comprendre com treballen les cèl·lules vives (Prasher, 1995). Aquestes proteïnes fluorescents es poden expressar selectivament en els diferents òrgans cel·lulars. La microscòpia de fluorescència va ser una revolució en si mateixa i va impulsar el desenvolupament d'altres tècniques, com la microscòpia confocal i la multifotònica, que ens permeten la visualització en tres dimensions.

La microscòpia de fluorescència explota la capacitat d'una àmplia família de molècules d'emetre fotons de llum quan són excitées. El punt clau en aquest mecanisme és el desplaçament entre l'espectre d'emissió i la llum incident d'excitació. El fotó emès té menys energia i, per tant, una longitud d'ona més gran, i així doncs, excitar amb llum blava resultarà en l'emissió de fotons de longitud d'ona més gran, en el rang dels verds. Hi ha una varietat enorme de molècules i proteïnes fluorescents, tantes que virtualment tots els colors de l'espectre visible poden ser emesos. Com que les llums d'excitació i emissió són espectralment diferents, és fàcil separar-les amb filtres òptics, com mostrem en la figura 1b.

En la microscòpia de fluorescència convencional (vegeu les figures 1a-f), s'utilitza un filtre d'excitació per restringir l'espectre de llum incident (com per exemple una làmpada de mercuri o de LED). Aquest filtre d'excitació es posa entre la font de llum i un divisor de feix de llum, que sovint és un mirall diroic que reflecteix les longituds d'ona curtes de l'excitació cap a la mostra a observar i transmet la longitud d'ona més llarga de l'emissió cap al detector. Una de les diferències principals entre un microscopi convencional de fluorescència i un microscopi confocal és la manera d'il·luminar la mostra. En el primer, tota la mostra s'il·lumina amb una font de llum d'ampli espectre, com la llum blanca, mentre que en el segon, la il·luminació s'aconsegueix escanejant amb un o més feixos de llum enfocats, provinents de làsers, sobre la mostra, línia per línia (vegeu les figures 1h, n).

Els làsers (*light amplification by stimulated emission of radiation* o amplificació de llum per emissió estimulada de radiació) són components essencials en els microscopis confocals, perquè poden dur un feix de llum suficient i de qualitat a un sol punt.

En un medi actiu (com gas, cristall, líquid), la llum s'emet per una descàrrega elèctrica o òptica (estimulació). A continuació, aquests fotons es multiplicaran, i circularan endavant i endarrere en una cavitat ressonant, on s'emetraran més fotons. Els làsers amplifiquen la llum i produeixen feixos coherents, que poden ser molt intensos, altament direccionals i molt purs en freqüència. N'hi ha de diferents tipus en funció del medi que genera l'acció làser: gas, estat sòlid, líquid o semiconductors. Els làsers de gas poden emetre diferents línies d'excitació simultà-

niament, mentre que els d'estat sòlid típicament emeten una longitud d'ona específica. Recentment, s'han introduït làsers blancs personalitzables en la microscòpia confocal i permeten seleccionar qualsevol longitud d'ona de l'espectre visible per a l'excitació de les molècules fluorescentes. Gràcies a l'ampli ventall de longituds d'ona disponibles, pràcticament qualsevol fluorocrom pot ser excitat si la longitud d'ona del làser coincideix amb el pic d'absorció de la molècula.

Com acabem de veure, doncs, la microscòpia òptica engloba l'ús i desenvolupament de moltes tècniques així com de diferents equips que permetran la realització d'aplicacions diverses.

La microscòpia làser confocal

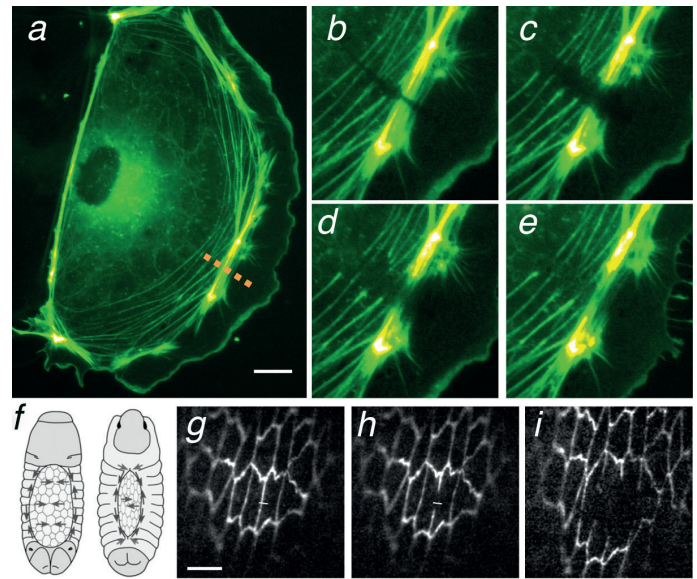
És una de les tècniques de microscòpia òptica més utilitzades en els últims temps en moltes de les branques de la ciència pels seus grans avantatges respecte a la microscòpia òptica convencional. Fou patentada el 1961, però no va ser fins als anys vuitanta que van aparèixer els primers models comercials; actualment són una eina molt usada en la recerca de molts investigadors.

Un microscopi òptic confocal és un equip capaç d'obtenir imatges tridimensionals d'un objecte fluorescent però amb més nitidesa, contrast i resolució que l'obtinguda amb la microscòpia de fluorescència convencional. Entenem resolució com la mínima separació entre dos punts en la qual dos objectes es poden resoldre o diferenciar, tant en profunditat, eix vertical o eix Z, com en l'eix horitzontal o eixos XY de la mostra, i permetrà resoldre millor (separar) partícules petites, fins als 200 nm de mida.

Es generaran imatges seriadades de seccions òptiques, no físiques, de la mostra tot basant-se en un principi molt similar al del microscopi òptic convencional de fluorescència però usant uns diafragmes anomenats *pinhole* ('forat de la mida d'una agulla') localitzats al camí òptic de detecció. El *pinhole* és, doncs, la clau de l'èxit. Gràcies a aquest filtratge espacial, tota la informació que hi passa a través serà la informació provinent del pla focal (pla de la imatge de la figura 1m), i aquesta és la que es capturarà, i en quedarà exclosa la que prové d'altres plans fora de focus, de manera que s'eliminaran així els feixos de llum provinents de plans inferiors i superiors al d'enfocament (Boyde, 1988).

Amb l'ús del làser s'obté més excitació dels fluorocroms de la mostra en profunditat a través d'un escaneig línia per línia o el moviment del feix de llum al llarg de la mostra (vegeu la figura 1n), que anirà donant lloc a l'aparició de les diferents imatges seriadades (vegeu la figura 1h). Els fluorocroms emetran fotons que travessaran el camí òptic de detecció (vegeu la figura 1h) a través del *pinhole* i seran capturats per uns detectors. Ara els fotons es transformaran en electrons, tot amplificant el senyal però també el soroll que s'origina. Finalment aquest senyal es transformarà en imatge digital, es convertirà la intensitat òptica en valors de grisos a la imatge i s'ompliran tots els píxels seqüencialment, en les tres dimensions. En la figura 1h se n'explica el funcionament.

Com hem vist, el principal mode de captura del microscopi òptic confocal és l'adquisició en profunditat d'imatges individuals seriadades de mostres tridimensionals, i aquestes poden estar fixades o vives. Les mostres són marcades amb un o diversos colorants al llarg de l'espectre, tot depenent de la diversitat del que es vol visualitzar. Les adquisicions poden ser en un únic punt del temps, i llavors es coneixen com a adquisició en XY, si són només d'una secció òptica, o bé XYZ si són d'adquisicions de seccions òptiques en sèrie. Poden ser també en forma de pel·lícula, i llavors s'adquireixen molts punts en el temps, i s'observen



↑ Figura 2. Estudi de les forces en cèl·lules i teixits amb la nanodissecció per làser. Cèl·lula de mamífer d'una línia immortalitzada d'*Hypsiprymodon moschatus*, un ratolí marsupial que expressa GFP associada a l'actina, en a-e. Un làser polsant escaneja al llarg de diverses fibres d'actina (fibres d'estrès), i indueix un dany local sense afectar la viabilitat cel·lular. Després del tall, les fibres comencen a retreure's, i se'n veu la contractilitat intrínseca. Després de 20 s (d) les fibres comencen un procés de reparació que durà a la restauració de la contractilitat per repolimerització de l'actina. Les cèl·lules poden percebre pèrdues i guanyes de les forces intracel·lulars i organitzar els mecanismes per reparar-les i equilibrar-les. Aquest efecte és part d'un fenomen ampli conegut com a mecanosensibilitat. En f ensenyem un esquema del tancament dorsal en l'embrió de *Drosophila* en què les forces implicades en tancar el teixit durant el desenvolupament estan representades amb fletxes. El teixit del centre se sotmet a cirurgia per làser de g fins a i: ablació de dues cèl·lules veïnes dirigint una línia molt petita de làser (aproximadament de 2 µm de llargada) a la seva membrana comuna d'unió. Poc després del tall, en escala de segons, la ferida s'obre, a causa del teixit circumdant, que es contrau intrínsecament. La retracció de les vores cel·lulars és una prova de les forces de contracció presents en els teixits. Barra d'escala: 10 µm.

així processos dinàmics en mostres vives; en aquest cas són adquisicions XYT, i poden ser també en 4 dimensions, XYZT.

Aplicacions de la microscòpia làser confocal

Les aplicacions principals dins el camp de la biologia en són moltes i molt diverses. Així, per exemple, es poden dur a terme des d'estudis de l'expressió de proteïnes en diferents línies de cèl·lules fins a l'estudi del desenvolupament *in vivo* de moltes espècies animals i vegetals (Pawley, 1989).

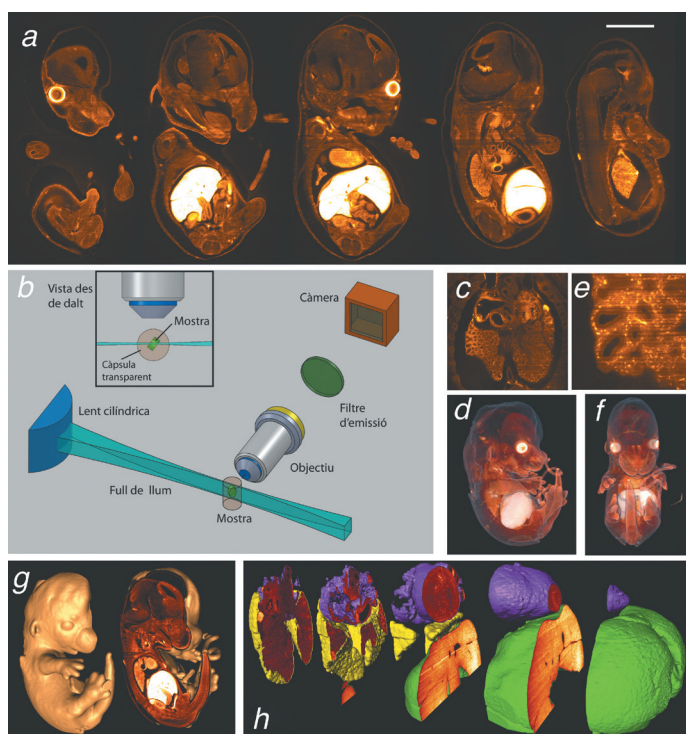
Fem un esment especial a l'ús *in vivo* de cèl·lules mare embrionàries fluorescentes, les quals han permès en els darrers temps gràcies al microscopi ser capturades en mode pel·lícula o XYZT, i s'han vist els processos de diferenciació que pateixen al llarg del temps. Per tant, assolir la visualització en tres dimensions ha estat possible gràcies a la microscòpia confocal i ha permès als biòlegs del desenvolupament, per exemple, estudiar *in vivo* com i cap a on les cèl·lules migren per acabar formant part dels diferents teixits i òrgans. En aquest sentit, els estudis en la biologia del càncer també s'han vist impulsats gràcies al fet que aquesta tècnica permet visualitzar *in vivo* la compartimentació de cèl·

lules canceroses, marcades amb fluorescència, en relació amb els teixits veïns durant els progressos d'expansió tumoral (Cortina *et al.*, 2007).

Com a exemple d'aplicacions més rellevants i més usades trobem el que es coneix com a estudi de la col·localització. Aquest permet saber si dues o més molècules en una mateixa mostra són molt properes o es troben en posicions espacials idèntiques (al mateix lloc), la qual cosa permet pensar que aquestes proteïnes podrien estar interaccionant, de manera directa o indirecta (Mauvezin *et al.*, 2012).

Una altra aplicació freqüentment usada és la d'immunofluorescència i detecció de sondes fluorescents, a través de l'ús de fluorocroms o marcadors específics per a una proteïna d'interès, o per a un determinat orgànu cel·lular. Això permet l'estudi de nombrosos fenòmens, com en són l'apoptosi (mort cel·lular), la proliferació i la localització cel·lular i subcel·lulars, així com la difusió i l'expressió de proteïnes, entre d'altres. En el cas de mostres fixades, les immunotincions amb l'ús d'anticossos primaris que s'uneixen a la proteïna de la qual es vol conèixer la localització són molt freqüents. Anticossos secundaris conjugats a

.....
 ↓ **Figura 3.** Adquisició d'imatges de mostres grans amb la microscòpia de fluorescència en full de llum. Adquisició d'imatges d'un embrió de ratolí en *a*, fixat i aclarit òpticament amb BABB, i muntat en una càpsula d'agarosa. La imatge es forma capturant l'autofluorescència movent la mostra a través del full de llum com es mostra en *b*. El full de llum es forma enfocant un làser collimat amb una lent cilíndrica, que enfoca només en una dimensió. El sistema de detecció és molt senzill perquè només es necessiten filtres d'emissió i una càmera, com en els microscopis d'epifluorescència convencionals. Aquesta configuració permet fer zoom per visualitzar els òrgans com el cor o els pulmons en *c*, o cèl·lules i túbuls als pulmons en *e*. El postprocessament de la imatge permet visualitzar l'embrió sencer, com mostrem en *d-f* (una projecció màxima amb transparència) o en *g* (representació de la superfície combinada a la vegada amb les dades originals en el pla de tall). Finalment, el poder de la tècnica es mostra en *h*, en què els òrgans van ser segmentats completament (groc: pulmons; verd: fetge; lila: cor) i es representen en segments per ensenyar les dades originals en els plans de tall. Barra d'escala: 1 mm.



fluorocroms s'uniran a aquests anticossos primaris, i permetran així la visualització de la seva presència i la localització cel·lular i subcel·lular.

El que es coneix com a fotoactivació, o la seva variant fotoconversió, han estat aplicacions per a models *in vivo*, molt revolucionàries en els últims temps (Bancaud *et al.*, 2010). Exploten els canvis conformacionals induïts en l'estructura química de les molècules fluorescents quan aquestes són excitades a longituds d'ona concretes pels làsers. S'usa en mostra viva i permet saber la vida mitjana d'una proteïna o si hi ha transport d'aquesta a escala intracel·lular. En la fotoactivació s'indueix l'alliberament de la fluorescència quan un làser concret excita la molècula. En la fotoconversió, en canvi, el que es produeix és un canvi en l'emissió de la molècula, i es passa d'una longitud d'ona a una altra, de manera que canvia de color en l'emissió (Ando *et al.*, 2002).

Seguint amb aplicacions noves trobem el FRAP i el FRET. El FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*, o recuperació de la fluorescència després del fotocremat) és una altra aplicació que permet l'observació del moviment intracel·lular perquè s'indueix l'extinció de la fluorescència en una zona concreta de la mostra, *in vivo* i a través de la captura en mode pel·lícula, es veu si existeix recuperació de la fluorescència en la zona concreta prèviament cremada. El FRAP permet veure dinamisme, difusió o desplaçament de les molècules que encara retenen la fluorescència i que reemplacen les extingides; per exemple, permet l'estudi del transport proteic entre diferents orgànuls cel·lulars, o entre el nucli i el citoplasma veient si hi ha compartimentació (Saulière-Nzeh Ndong *et al.*, 2010). El FRET (*Förster resonance energy transfer* o transferència d'energia per ressonància Förster) permet la detecció d'interaccions entre dues molècules biològiques (proteïnes, lípids, àcids nucleics). Caldrà que aquestes siguin properes i es trobin a uns 1-10 nm de distància. Quan la primera, coneguda com a molècula donadora, està sola, emetrà fluorescència en ser excitada apropiadament. Ara bé, quan hi ha la segona molècula, coneguda com a acceptora, suficientment a prop, la primera li transferirà energia, sense emetre fluorescència. És a dir, el que s'espera quan hi ha FRET és una disminució de la fluorescència del donador i un increment de la de l'acceptor (Sekar *et al.*, 2003).

La micro/nanocirurgia per làser

Hem vist com els làsers s'utilitzen de manera no invasiva per excitar fluorescència, generar imatges tridimensionals i estudiar la dinàmica de proteïnes. Però els làsers també tenen altres utilitats en els estudis de biologia: una de les tècniques més recents, que combina l'acció de làsers i la microscòpia, és la micro/nanocirurgia per làser. La manipulació i ablació per làser, altament precisa i dirigida a materials biològics, permet, per exemple, dur a terme experiments fins fa poc impossibles en la biologia cel·lular i del desenvolupament. Poc després de la invenció el 1960 del làser polsant de robí, els científics van començar a investigar el potencial de la radiació làser polsada per a aplicacions mèdiques. Ja s'anticipava llavors que els làsers servien per a la manipulació i destrucció de teixits biològics amb una precisió i selectivitat que no coneixia precedents. Avui dia, es poden ablacionar cèl·lules individuals i fins i tot es pot fer nanocirurgia intracel·lular, per exemple de determinats compartiments cel·lulars, *in vivo* sense perjudicar la viabilitat de la cèl·lula o teixit. Així doncs, recentment, polsos ultracurts (picosegons) de làsers ultraviolats i infraroig s'han utilitzat per tallar microtúbuls (Colombelli *et al.*, 2005) i fibres d'actina (Colombelli *et al.*, 2009) en el rang de micròmetres. Una de les aplicacions d'aquesta tècnica és l'estudi de les forces a les quals els teixits biològics

estan subjectes durant el desenvolupament o en la reparació de dany (Colombelli i Solon, 2013).

Ara ja es coneixen millor els mecanismes fonamentals que governen les interaccions làser-teixit biològic. Es coneix que el mecanisme d'ablació implica la formació d'un plasma, confinat en un punt de l'espai.

El volum d'energia que es diposita es pot controlar enfocant el làser, perquè la formació de plasma només té lloc en localitzacions en què el llinard d'irradiància determinat és superat (Vogel i Venugopalan, 2003). Caldrà, doncs, controlar la duració del pols, i fer talls precisos per obtenir polsos de làser curts, típicament per sota d'un nanosegon. Més enllà del rang de nanosegons, el plasma absorbeix massa energia i continua creixent, fins a induir un dany incontrolat a la mostra.

Controlant la freqüència i la densitat (distància entre polsos), així com l'energia de cada pols, es pot assolir una precisió de dissecció de 450 nm (Colombelli *et al.*, 2004). Amb l'equipament adequat, es pot irradiar *in vivo* amb llum polsada una estructura determinada i visualitzar-la simultàniament. El sistema de dissecció es pot implementar en un microscopi invertit, per exemple, ja sigui de fluorescència convencional o confocal, i amb els objectius adequats es pot fer cirurgia subcel·lular, i fins i tot de mostres gruixudes com embrions sencers, com detallem més avall. Per exemple, si tenim una proteïna del citoesquelet marcada fluorescentment, se'n pot estudiar la distribució abans i després de l'ablació per làser. Així, s'han fet estudis de correlació de la localització d'una proteïna i la distribució de forces (a escala cel·lular) al llarg dels filaments d'actina (Colombelli *et al.*, 2009), i s'ha demostrat que algunes proteïnes són mecanosensibles, reclutades on les cèl·lules exerceixen forces mecàniques, possiblement per activar vies moleculars i dur a terme una funció biològica en resposta a aquestes forces. Molts d'aquests estudis es fan en organismes model com *Drosophila melanogaster* (mosca del vinagre) o *Danio rerio* (peix zebra), *in vivo*, per entendre la contribució dels diferents teixits de l'embrió, quant a les forces que apliquen, durant els diferents processos morfogènètics. Per exemple el tancament dorsal durant la metamorfosi de *D. melanogaster*, on un teixit extraembrionari, l'amnioserosa, exerceix forces necessàries per a la formació del tòrax de la mosca adulta, estirant els teixits veïns per apropar-los i tancant el forat amb un efecte de cremallera. Aquestes forces s'han avaluat amb l'ablació per làser de les unions cel·lular a cel·lula de l'amnioserosa (Solon *et al.*, 2009). En un altre tipus d'estudis, els investigadors actualment s'han centrat a descobrir els mecanismes de la migració cel·lular en òrgans específics. En la formació de la tràquea en els embrions de *D. melanogaster*, ablacionar cèl·lules individuals al capdavant o al final d'un òrgan en formació permet demostrar si les cèl·lules migren individualment, o si requereixen la contribució de les cèl·lules veïnes per dur a terme un procés de migració col·lectiva.

Últimament, aquests estudis tenen implicacions molt importants per a la biologia del càncer, ja que ofereixen mecanismes alternatius, basats en senyals mecànics, per a la comprensió de comportaments cel·lulars bàsics, com la migració de les cèl·lules, la qual cosa qüestiona una explicació purament genètica per a moltes malalties.

Fins i tot, per a estudis *in vivo* de processos com la regeneració axonal, que són difícils i quasi impossibles en la majoria de vertebrats, s'ha emprat aquesta tecnologia. Aquest procés, essencial per al manteniment del sistema nerviós adult, tant després de lesions nervioses com en malalties neurodegeneratives, es pot estudiar amb aquesta tècnica

de microcirurgia per làser, tallant les cèl·lules nervioses que innerven un dels òrgans sensorials de *D. rerio* (Graciarena *et al.*, 2014).

Microscòpia de fluorescència en full de llum (LSFM o SPIM)

És una tècnica nova que podem trobar dins de la microscòpia òptica, revolucionària en la velocitat d'adquisició, en la disminució de la fototoxicitat per a la mostra i en més profunditat d'escaneig tridimensional. Coneguda com a LSFM (*light-sheet fluorescence microscopy* o microscòpia de fluorescència en full de llum, també anomenada SPIM, *selective plane illumination microscopy*, Huisken *et al.*, 2004). Es va introduir fa uns deu anys per a la captura de la fluorescència de mostres *in vivo*.

La clau és en la il·luminació, que aquí és perpendicular a la direcció d'observació, com es mostra en la figura 3. El feix del làser enfoca en una sola direcció mitjançant l'ús de lents cilíndriques. Un full de llum molt fi, provinent d'aquest làser, és generat a la regió focal i il·lumina la mostra des del seu costat, mentre que la fluorescència és recollida per la part frontal en una secció molt estreta de la mostra, que també es pot il·luminar seqüencialment des dels dos costats.

La mostra, a la vegada, serà moguda a través d'aquest full de llum i es generarà un seguit d'imatges seriades, com en el cas del microscopi confocal, per poder-les finalment combinar i obtenir imatges en tres dimensions. Les imatges poden ser generades en fraccions de segon gràcies a l'ús de càmeres d'adquisicions molt ràpides, cosa que permet així l'estudi de processos dinàmics del desenvolupament, com el batec del cor de *D. rerio* (Mickleit *et al.*, 2014) o estudis morfogènètics en el desenvolupament de *D. melanogaster* (Krzic *et al.*, 2012). La velocitat d'adquisició que permet aquesta tècnica la fa òptima per a l'ús d'organismes vius en l'estudi del seu desenvolupament.

Els principals avantatges són la baixa fototoxicitat que es genera en la mostra, ja que el làser s'aplica molt poc temps a cada secció i no s'enfoca en un únic punt, sinó que és difós en full cap a la mostra (vegeu la figura 1n), l'increment en la velocitat durant l'adquisició, ja que no hi ha necessitat de *pinhole* o de cap filtratge geomètric, cosa que augmenta dràsticament l'eficiència en la detecció, i el poc fotocremat dels fluorocroms, amb la qual cosa es requereix molta menys potència de làser que en microscòpia òptica confocal.

Per a l'adquisició i penetració correcta del làser és necessari que les mostres siguin com més transparents millor, com en el cas de *D. rerio* o de l'embrió de *D. melanogaster*. Però per a certes mostres fixades hi ha la possibilitat d'aplicar un protocol d'aclariment previ, usant components químics que transparenten la mostra, per tal que quan el làser hi arriba pugui penetrar millor i no sigui dispersat cap als costats. Es generaran imatges més resolutives i amb més profunditat de captura, la qual cosa permet la visualització d'òrgans i organismes sencers. Hi ha diferents productes clarificants de les mostres fixades. El més usat és el BABB, barreja de benzil alcohol amb benzil benzoat (Dodt *et al.*, 2007) però aquesta barreja, abans de la deshidratació de la mostra, produeix la pèrdua o disminució de l'expressió del fluorocrom en les proteïnes fluorescents com la GFP i, per tant, han aparegut nous mètodes. El CLARITY (Chung *et al.*, 2013) és un compost molt prometedor usat actualment per transparentar les mostres amb una millor preservació de la fluorescència.

El tipus de mostres que s'utilitzen amb l'SPIM solen ser molt gruixudes i no poden ser visualitzades d'extrem a extrem. Per això, un altre dels avantatges de la tècnica és la possibilitat d'adquirir imatges de la mateixa mostra però des de diferents angles (*multiview acquisition*), ja

que el tipus de muntatge permet la rotació de la mostra (fet que no és possible en microscopis més convencionals), normalment encastada en un material com l'agarosa o similar. Caldrà un postprocessament de les dades per poder sumar la informació obtinguda des de diferents angles, tot incrementant així la resolució del microscopi.

Volem fer un esment especial a l'ultramicroscopi, un equip pensat per a la visualització d'estructures grans, a un nivell macroscòpic. A l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona se n'ha desenvolupat un amb el nom de MacroSPIM. Com a exemples de mostres utilitzades, trobem els diferents òrgans de ratolí o certs tumors injectats, que generen masses cel·lulars enormes, fins al rang de centímetres.

Fins ara, l'anàlisi de teixits, i en particular l'anàlisi de tumors en els teixits, sempre ha estat duta a terme en la mostra tenyida mateixa prèviament, fent-ne seccions seriades amb equips de microdissecció com el criòstat o el micròtom, entre d'altres. Aquest tipus de treball fet a través de seccions histològiques és d'interpretació difícil en tres dimensions si es pretén entendre la morfologia dels òrgans, i és molt difícil fer-ne la reconstrucció. Amb l'ajuda del MacroSPIM ens podem endinsar en la captura de fins a centímetres de gruix en mostres transparentades prèviament. És molt important en estudis de biomedicina, ja que, per exemple, es pot estudiar la vascularització de tumors sencers i començar a estudiar l'organització global del creixement tumoral en 3D dins de cada òrgan. I també, de manera molt important, la tècnica permet estudiar els defectes anatòmics i de desenvolupament que determinades mutacions tenen en els embrions.

Un escenari típic en recerca bàsica en oncologia és mutar proteïnes implicades en la proliferació del càncer tot introduint aquesta proteïna o molècula modificada a un organisme, generalment el ratolí. Però moltes proteïnes són tan importants que les seves mutacions resulten letals i impedeixen que els científics puguin obtenir una progènie viable per treballar-hi. En aquest cas, el MacroSPIM és molt útil perquè permet l'estudi sistemàtic de l'embrió, de qualsevol estadi i mida, per inferir el paper de les mutacions específiques en el seu desenvolupament, per exemple provocant hipertròfia d'òrgans en determinades condicions, defectes anatòmics, etc. És, per tant, una revolució en la interpretació de la tridimensionalitat de les estructures, i, com mostrem en la figu-

ra 3, les imatges ofereixen una representació similar a la ben coneguda tècnica TAC (MRI, *magnetic resonance imaging*), però òptica, amb la gran diferència que el macroSPIM proporciona resolució cel·lular en òrgans sencers.

Finalment, un altre avantatge d'aquest sistema és que els investigadors mateixos el poden construir a un preu força assequible, sempre que tinguin uns coneixements previs imprescindibles d'òptica. Hi ha una plataforma d'accés obert en la qual es troba explicat pas per pas com es pot construir un SPIM o com es pot ampliar o adaptar-ne un d'existent. Aquesta plataforma es diu openSPIM (*openSPIM.org*) i també s'hi explica quines peces cal adquirir o dissenyar per construir correctament el sistema.

Què ens depara el futur?

Des dels inicis de la creació del primer microscopi òptic compost per Galileu fins al desenvolupament dels equips de microscòpia òptica més avançats que acabem d'explicar han passat uns quatre-cents anys, però realment ha estat en els darrers vint o trenta anys quan l'evolució en el desenvolupament d'aquests equips s'ha donat d'una manera més dràstica. Què ens depara el futur? Podrem arribar a combinar la super-resolució, de pocs nanòmetres, amb la visualització de mostres de centímetres de gruix, per exemple? Tindrem càmeres encara més sensibles i ràpides? Podrem seguir i visualitzar les cèl·lules, una per una, al llarg del desenvolupament d'un organisme viu, com alguns ja s'han aventurat a intentar? Sens dubte, apareixeran noves modificacions dels equips ja existents que ens permetran veure estructures des d'una perspectiva nova o nous sistemes fins ara inimaginables que apareixeran i formaran part de la història de la microscòpia òptica. Implementacions ara com ara impensables per als microscopistes experts en el camp donaran segur una aproximació a les respostes de les moltes qüestions biològiques plantejades i encara no resoltes.

Agraïments

Agraïm a Najate Benhra (IRB Barcelona) per la preparació de la mostra dels discs imaginals, a Helena González (IRB Barcelona) pels embrions de ratolí, i a Jérôme Solon (CRG) pels embrions de *Drosophila*.

Bibliografia

- ANDO, R. [et al.] (2002). «An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 (20): 12651-12656.
- BANCAUD, A. [et al.] (2010). «Fluorescence perturbation techniques to study mobility and molecular dynamics of proteins in live cells: FRAP, photoactivation, photoconversion, and FLIP». *Cold Spring Harb. Protoc.*, 12.
- BOYDE, A. (1988). «Confocal optical microscopy. Microscopy and analysis». January, 7-13.
- CHUNG, K. [et al.] (2013). «Structural and molecular interrogation of intact biological systems». *Nature*, 497 (7449): 332-337.
- COLOMBELLI, J. [et al.] (2004). «Ultraviolet diffraction limited nanosurgery of live biological tissues». *Rev. Sci. Instrum.*, 75: 472.
- (2005). «In vivo selective cytoskeleton dynamics quantification in interphase cells induced by pulsed ultraviolet laser nanosurgery». *Traffic*, 6 (12): 1093-1102.
- (2009). «Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization». *J. Cell Sci.*, 122 (10): 1665-1679.
- COLOMBELLI, J.; SOLON, J. (2013). «Force communication in multicellular tissues addressed by laser nanosurgery». *Cell Tissue Res.*, 352 (1): 133-147.
- CORTINA, C. [et al.] (2007). «EphB-ephrin-B interactions suppress colorectal cancer progression by compartmentalizing tumor cells». *Nat. Genet.*, 39 (11): 1376-1383.
- DODT, H. U. [et al.] (2007). «Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain». *Nat. Methods.*, 4 (4): 331-336.
- GRACIARENA M. [et al.] (2014). «Dynamics of axonal regeneration in adult and aging zebrafish reveal the promoting effect of a first lesion». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111 (4): 1610-1615.
- HUISKEN, J. [et al.] (2004). «Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy». *Science*, 305 (5686): 1007-1009.
- KRZIC, U. [et al.] (2012). «Multiview light-sheet microscope for rapid in toto imaging». *Nat. Methods*, 9 (7): 730-733.
- MAUVEZIN, C. [et al.] (2012). «DOR undergoes nucleo-cytoplasmic shuttling, which involves passage through the nucleolus». *FEBS Lett.*, 586 (19): 3179-3186.
- MICKOLEIT, M. [et al.] (2014). «High-resolution reconstruction of the beating zebrafish heart». *Nat. Methods*, 11 (9): 919-922.
- PAWLEY, J. B. (1989). *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer.
- PRASHER, D. C. (1995). «Using GFP to see the light». *Trends Genet.*, 11 (8): 320-323.
- SAULIÈRE-NZEH NDONG, A. [et al.] (2010). «Agonist-selective dynamic compartmentalization of human Mu opioid receptor as revealed by resolute FRAP analysis». *J. Biol. Chem.*, 285 (26): 20422.
- SEKAR, R. B. [et al.] (2003). «Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations». *J. Cell Biol.*, 160 (5): 629-633.
- SOLON, J. [et al.] (2009). «Pulsed forces timed by a ratchet-like mechanism drive directed tissue movement during dorsal closure». *Cell*, 137 (7): 1331-1342.
- VOGEL, A.; VENUGOPALAN, V. (2003). «Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues». *Chem. Rev.*, 103 (2): 577-644.