

Metodología para correlacionar información multidimensional combinando microscopia de fluorescencia con microscopia electrónica de transmisión

Autor: Ing. Jorge Ibañez

Director: Dr. Javier Adur – Codirector: Dra. María Isabel Colombo

RESUMEN

Los últimos avances ocurridos con diferentes técnicas de microscopía han sido fundamentales para el progreso de las ciencias de la vida, y muchas de éstas han contribuido en el último siglo a nuevos descubrimientos. Actualmente, se encuentran disponibles una diversa gama de microscopías como: la electrónica de transmisión y barrido, de fluorescencia, de fuerza atómica, de barrido laser confocal, imágenes por resonancia magnética, dispersión de rayos X de ángulo pequeño y múltiples microscopías de superresolución; donde cada una de ellas proporcionan resultados valiosos para comprender el objeto en estudio.

Sin embargo, la investigación de varios procesos biológicos, requiere un enfoque multiparamétrico que permita, por ejemplo, abordar la estructura y la organización espacio-temporal de las organelas, y también entender la transducción de señales químicas y fuerzas involucradas en las interacciones célula-célula. Si bien las microscopías actuales, están bien desarrolladas para observar cada una de estos fenómenos, ninguna de ellas puede ofrecer una lectura simultánea de todas las características; lo que limita el contenido de información de una observación. Por ejemplo, aunque la microscopía electrónica es capaz de revelar el diseño estructural de las células y la disposición macromolecular de las proteínas, no puede seguir directamente su dinámica en células vivas. Esto último sí se puede lograr con la microscopía de fluorescencia, requiriendo de un marcador o etiqueta, pero la resolución espacial obtenida es del orden de los 200 nm.

Una solución, es combinar y correlacionar diferentes lecturas (óptica/electrónica) del mismo espécimen, lo que abre nuevas vías para comprender las relaciones estructura-función en la investigación biomédica. Así es como nace la microscopia de correlación óptica y electrónica (CLEM) del acrónimo en inglés (*Correlative Light Electron Microscopy*), cuyos enfoques correlativos plantean nuevos desafíos relacionados con la preparación de la muestra, la estabilidad del instrumento, la recuperación de la región de interés y el análisis de datos.

OBJETIVOS

Debido a que el campo de la técnica de CLEM es relativamente nuevo, las capacidades de los diversos enfoques aún no se han explorado en su totalidad, y persisten las incertidumbres cuando se considera la mejor opción de estrategia y flujo de trabajo para el experimento correlativo. Con esto en mente y con el objetivo de aportar una metodología sistematizada que permita correlacionar repetida veces un mismo evento-estructura en forma confiable; se desarrolló la siguiente tesis doctoral.

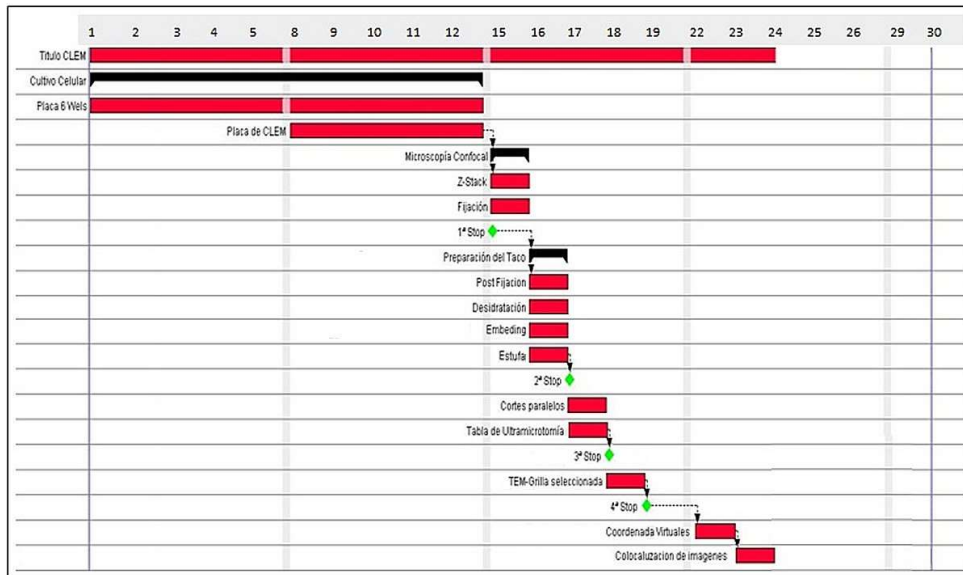
Como objetivos específicos se planteó diseñar un método, que genere cortes mecánicos con gran exactitud, que permita certificar que los cortes ultrafinos para microscopia electrónica sean perfectamente paralelos a los cortes de la microscopía óptica. Identificar estructuras, las cuales ya marcadas, comparten información de tipo relacional tanto en los dominios de la microscopia óptica (bajo poder resolutivo) como en la microscopia electrónica (alto poder resolutivo). Construir, a partir de las estructuras anteriores, un modelo de coordenadas virtuales que asegure una correlación con la microscopia electrónica. Y finalmente, proponer un índice estadístico que permita verificar la precisión de la correlación

METODOLOGIA Y RESULTADOS

Hasta el desarrollo del presente trabajo solamente en un centro (Instituto de Histología y Embriología "Dr. Mario H. Burgos" – IHEM CONICET-Universidad Nacional de Cuyo Mendoza) se estaba probando en forma elemental la tecnología de CLEM. Una de las causas por

la cual aún no se ha desarrollado masivamente la técnica es porque: “No existe en todo el país una metodología sistematizada que permita realizar CLEM en forma precisa y confiable”; afirmación que hacen muchos de los investigadores y profesionales que trabajan con microscopia. Para dar una solución a esta visión, es donde la presente tesis realiza su mayor aporte. Así, en el presente trabajo se desarrollaron una secuencia de procesos especializados y novedosos, para implementar una estrategia experimental que permita correlacionar información entre la microscopia óptica y la electrónica, repetida veces en forma confiable.

En el siguiente diagrama de Gantt se indican los diferentes procesos ordenados de CLEM y los puntos críticos a considerar. El estudio CLEM a realizar dura 24 días, de los cuales, 12 son dedicados al cultivo celular. A partir del día 8 se tripsiniza para continuar el cultivo en placas de CLEM. Día 15 se realiza microscopia confocal capturando los planos de interés y la posterior fijación (día 15-16, con dos pasos críticos, z-stack y fijación). El proceso se puede detener de ser necesario, sin perjuicio de la muestra capturada (1° Stop, punto verde). En los días 16-17 se realiza la preparación del taco (postfijación, deshidratación, embedding y polimerización del taco en estufa a 37°C), segundo stop sin perjuicio de la muestra. El día 17-18, se obtienen los cortes paralelos a los planos confocales, por ultramicrotomía e interferencia luminosa y se ordenan en las grillas para TEM en la tabla de ultramicrotomía. Tercer stop. En los días 18-19 observación de imágenes en el TEM de las grillas seleccionadas, último stop. Finalmente por medio de la técnica de coordenadas virtuales se correlacionan los planos (colocalización).

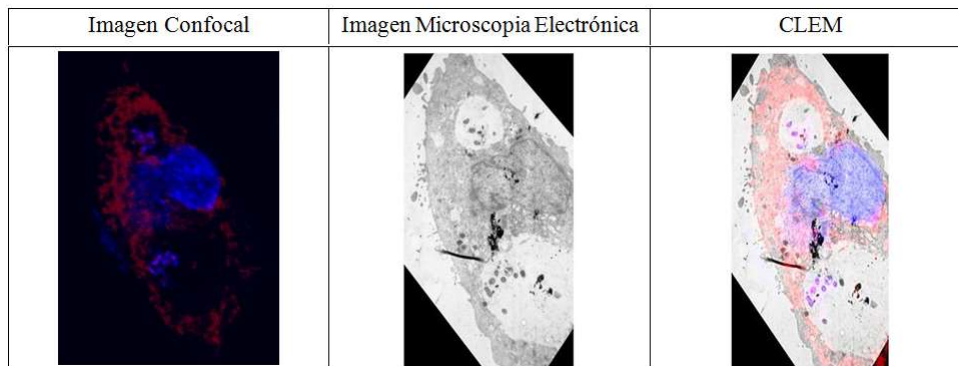


La presente tesis toma relevancia a partir del día 15, final del cultivo celular y principio de la observación por microscopia laser confocal. A partir de este punto se desarrollaron, una secuencia de procesos especializados y novedosos, que se diferencian de la metodología clásica. Principalmente se modificó el procedimiento para la preparación del taco, el cual sí o sí debe estar a 90° con respecto a la posición de la célula dentro del extremo del cilindro. Por lo tanto, se debe cumplir con dos situaciones esenciales: la verticalidad del cilindro y la centralidad de la célula; lo cual facilitará el ajuste en el ultramicrotomo y garantiza que los cortes ultrafinos seriados siempre resulten paralelos a los cortes confocales. Para esto, se diseñó un soporte que logra estandarizar la construcción del taco y minimizar las tareas de ajustes.

Otro de los procedimientos novedosos fue buscar una técnica que permita realizar cortes ultrafinos perfectamente paralelos a los cortes ópticos del microscopio confocal. Para ello, se propuso un método de interferencia luminosa, utilizando un led_RGB, basado en la difracción de franhofer. Con el mismo, se logró una eficiencia significativa con respecto a la metodología propuesta por los métodos clásicos. Al aplicar esta nueva técnica, se asegura que los cortes sobre el taco den como resultado planos paralelos a los seleccionados por microscopia confocal. La conjunción de

los cambios en la elaboración del taco y la incorporación de la técnica por difracción luminosa acortan significativamente los tiempos en la búsqueda del plano de interés.

Finalmente, tenemos una imagen confocal y su correspondiente imagen TEM, las cuales se deben correlacionar. El desafío aquí fue llevar a un mismo plano, imágenes provenientes de planos de observación diferentes. En esta tesis, se propuso una metodología de correlación denominada coordenadas virtuales. En la cual, cuando se adquiere el plano-imagen deseado por CSLM se lo interpreta como un mapa morfológico. Esto se convierte en una referencia realmente útil al seleccionar sobre él los puntos o coordenadas homologas ubicados en partes sobresalientes de su morfología. Estas coordenadas permiten construir un plano virtual, a partir de la creación de sus centroides, que permiten ver a las imágenes confocal y TEM como si hubieran sido tomadas con un mismo microscopio, facilitando así su comparación que luego se analiza en términos de correlación. Luego una matriz de transformación corrige factores de escalas, rotaciones y traslaciones de cada coordenada homologa generando un plano imagen virtual (con coordenadas virtuales) el cual se comporta como si hubiera sido tomada por un mismo microscopio pero con todo el potencial de cada microscopia realizada por separado. Realizada la correlación, en esta etapa se procedió a mejorar la precisión, exactitud y la reducción del tiempo de búsqueda en la correlación de imágenes. Para evitar trabajar con la subjetividad del operador/investigador, se propuso generar un índice que permitiera estadísticamente corroborar la exactitud de la correlación. Se generó así un índice de semejanza que se utilizó como indicador de colocalización. Trabajando con la estadística de los errores, se propuso que un índice de semejanza mayor al 50% indica que las imágenes son colocalizantes y la correlación entre ambas microscopias es válida. Con este índice se puede decir, que el mecanismo de selección de coordenadas homologas es exacto y preciso. En el siguiente gráfico se puede observar uno de los resultados obtenidos.



CONCLUSIONES

La metodología y desarrollos realizados en el presente trabajo permitieron:

- Identificar los pasos críticos de la técnica de CLEM y sistematizarlos para que la misma resulte precisa y repetible.
- Diseñar procedimientos novedosos: ingenieril para la realización de cortes ultrafinos paralelos y de programación para una correlación precisa.
- Implementar la metodología con técnicas existentes (microscopios ópticos y electrónicos) y a bajo costo.
- Reducir los tiempos del proceso de CLEM e independizar los resultados de la subjetividad del operador.
- Utilizar microscopía electrónica de transmisión (TEM) en la correlación, que no es habitual de hallar en el mercado, porque es de las más complejas de realizar.
- Generar un índice de semejanza que permite corroborar estadísticamente la precisión de la correlación.
- Encontrar nuevas respuestas biológicas en los modelos analizados.
- Generar un nuevo servicio dentro de las ofertas de microscopias actuales del IHM.