

Microscopía a dos fotones de tejidos biológicos

Two photon microscopy of biological tissues

Juan M. Bueno^(*,S), Emilio J. Gualda y Pablo Artal^(S)

Laboratorio de Óptica, Centro de Investigación en Óptica y Nanofísica, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100, Murcia, España.

(*) Email: bueno@um.es

S: miembro de SEDOPTICA / SEDOPTICA member

Recibido / Received: 20/10/2009. Versión revisada / Revised version: 17/02/2010. Aceptado / Accepted: 18/02/2010

RESUMEN:

Se ha desarrollado un microscopio de fluorescencia no lineal aplicado al análisis de tejidos biológicos. El uso de luz infrarroja y la incorporación de un sistema de barrido y una unidad contadora de fotones permiten el registro de imágenes de alta resolución, incluso en capas profundas de las muestras. La señal registrada corresponde a fluorescencia endógena y las muestras analizadas no necesitan preparación previa (fijado y teñido). La naturaleza autoconfocal del fenómeno no lineal permite el seccionado óptico de los tejidos, así como la reconstrucción de imágenes tridimensionales. Se muestran imágenes de fluorescencia no lineal en muestras vegetales y animales. Se ha puesto especial énfasis en el análisis de las diferentes capas del tejido retiniano localizando las posibles fuentes de fluorescencia intrínseca.

Palabras clave: Microscopía No Lineal, Fluorescencia a Dos Fotones, Retina.

ABSTRACT:

A non-linear fluorescence microscope has been developed for the analysis of biological tissues. The use of infrared light and the combination of a scanning unit and photon counting allows in-depth high resolution imaging. The registered fluorescent signal is intrinsic, and then fixation and staining procedures are not required. The autoconfocality on the non-linear phenomena allows optical sectioning and volume rendering reconstruction of tissues under analysis. Non-linear fluorescent images of a number of vegetal and animal tissues are shown. A special attention has been paid to the sources of intrinsic fluorescence in the different layers of retinal tissues.

Key words: Non-Linear Microscopy, Two-Photon Fluorescence, Retinal Tissue.

REFERENCIAS Y ENLACES

- [1] P. J. Campagnola, L. M. Loew, "Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms", *Nat. Biotechnol.* **21**, 1356-1360 (2003).
- [2] J. A. Squier, M. Müller, G. J. Brakenhoff, K. R. Wilson, "Third harmonic generation microscopy," *Opt. Express* **9**, 315-324 (1998).
- [3] W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, W. W. Webb, "Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation", *P. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 7075-7080 (2003).
- [4] M. Göppert-Mayer, "Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen", *Ann. Phys.* **9**, 273-294 (1931).
- [5] W. Denk, D. W. Piston, W. W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy", *Science* **248**, 73-76 (1990).
- [6] H. H. Strain, M. R. Thomas, J. J. Katz, "Spectral absorption properties of ordinary and fully deuteriated chlorophylls a and b", *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 306-311 (1963).
- [7] Y. Imanishi, K. H. Lodowski, Y. Koutalos, "Two-photon microscopy: shedding light on the chemistry of vision", *Biochemistry* **46**, 9674-9684 (2007).

- [8] T. E. Odgen, "Nerve fiber layer of the primate retina: morphological analysis", *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* **25**, 19–29 (1984).
- [9] R. T. A. Megens, S. Reitsma, P. H. M. Schiffers, R. H. P. Hilgers, J. G. R. De Mey, D. W. Slaaf, M. G. A. Oude Egbrink, M. A. M. J. van Zandvoort, "Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries", *J. Vasc. Res.* **44**, 87-98 (2007).
- [10] D. Schweitzer, S. Schenke, M. Hammer, F. Schweitzer, S. Jentsch, E. Birckner, W. Becker, A. Bergmann, "Towards metabolic mapping of the human retina", *Microsc. Res. Techniq.* **70**, 410-419 (2007).
- [11] S. Huang, A. A. Heikal, W. W. Webb, "Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein", *Biophys. J.* **82**, 2811–2825 (2002).
- [12] <http://www.fundacionglaucoma.org>
- [13] Y. Imanishi, M. L. Batten, D. W. Piston, W. Baehr, K. Palczewski, "Non-invasive two-photon imaging reveals retinyl ester storage structures in the eye", *J. Cell. Biol.* **164**, 373-383 (2004).
- [14] A. Bindewald-Wittich, M. Han, S. Schmitz-Valckenberg, S. R. Snyder, G. Giese, J. F. Bille, F. G. Holz, "Two-photon-excited fluorescence imaging of human RPE cells with a femtosecond Ti:Sapphire laser," *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* **47**, 4553-4557 (2006).

1. Introducción

En microscopía cada vez se hacen más necesarios sistemas capaces de distinguir estructuras biológicas complicadas con mayor contraste y resolución. Sin embargo, debido a que la mayoría de los tejidos biológicos están constituidos básicamente por agua, la utilización de métodos convencionales de microscopía no siempre permite discernir entre los distintos elementos adyacentes. La búsqueda de nuevas alternativas constituye un campo de investigación dinámico, destacando técnicas basadas en el barrido láser confocal (del inglés *confocal scanning laser microscopy*, CSLM).

Sin embargo, en las últimas décadas se ha experimentado un gran desarrollo de nuevas técnicas de microscopía que permiten la obtención de imágenes de alta resolución aprovechando diferentes fenómenos físicos que se producen a nivel molecular en tejidos biológicos [1-3]. Entre ellas cabe destacar la microscopía multifotónica que se está convirtiendo en un importante complemento a la ya tradicional microscopía confocal en campos como la Biología o Biomedicina donde la alta resolución y la adquisición de imágenes tridimensionales juegan un papel esencial en el desarrollo de la investigación.

En el presente artículo se presenta el microscopio no lineal desarrollado en el Laboratorio de Óptica de la Universidad de Murcia. Se muestran algunos ejemplos de imágenes de fluorescencia no-lineal (multifotónica) obtenidas en diferentes muestras biológicas, haciendo especial hincapié en los tejidos retinianos de muestras animales, algunos de

los cuales no aparecen con anterioridad en la literatura.

2. Métodos

2a. Teoría: microscopía a dos fotones

La fluorescencia es un proceso por el que una molécula, también llamada fluoróforo, emite un fotón tras haber sido excitada previamente por la absorción de otro fotón de mayor energía. La molécula sufre un proceso a tres pasos: excitación, conversión interna de energía y emisión, que puede repetirse indefinidamente mientras dicha molécula conserve su estructura original. Sin embargo es posible que ciertos enlaces sometidos a "tensiones" resulten dañados dando lugar a lo que se conoce como blanqueado de la molécula (*photobleaching* en inglés) y provocando una pérdida de la capacidad de la molécula de emitir fluorescencia.

Bajo ciertas circunstancias es posible llevar a cabo el proceso de excitación de la molécula mediante la absorción casi simultánea ($\sim 10^{-16}$ s) de dos o más fotones de baja energía en lugar de la absorción de un único fotón de gran energía. Este fenómeno se conoce con el nombre de fluorescencia no lineal o fluorescencia de excitación multifotónica y fue predicho teóricamente en 1931 por Goppert-Mayer [4]. Un fotón excita el fluoróforo desde su estado relajado hacia un estado intermedio virtual, mientras que el segundo fotón finalmente excita la molécula hasta su estado excitado real.

Aunque en condiciones normales estas transiciones multifotónicas son poco probables, es

posible el desarrollo de microscopios basados en este efecto mediante la utilización de una fuente de iluminación adecuada. En concreto esto fue posible a partir de 1990 [5], gracias a la utilización láseres de pulsos ultracortos, con pulsos en el rango de femtosegundos y frecuencias de repetición de decenas de MHz. En estas condiciones experimentales se puede alcanzar una alta densidad de fotones, aumentando de esta forma la probabilidad de absorción simultánea de dos fotones. Esto permite por ejemplo, que la absorción simultánea de dos fotones infrarrojos excite una transición molecular correspondiente a energías en el rango del UV. El uso de radiación infrarroja es una ventaja, sobre todo en aplicaciones biológicas y médicas, ya que la radiación UV puede afectar seriamente a los tejidos irradiados. Además el uso de luz infrarroja permite penetrar más profundamente dentro de los tejidos biológicos (~700 micras), debido a la débil absorción del agua a estas longitudes de onda y la reducción del *scattering* tipo Rayleigh.

Sin lugar a dudas, la ventaja principal de la microscopía multifotónica consiste en que debido a su naturaleza no lineal, la probabilidad de absorción depende cuadráticamente de la intensidad de excitación, y por tanto sólo será posible en un pequeño volumen (< 1 femtolitro) alrededor del punto focal (autoconfocalidad). Comparado con la fluorescencia lineal, donde la fluorescencia se produce a lo largo de todo el camino de iluminación, las técnicas de microscopía no lineal permiten la reducción de los efectos adversos como fototoxicidad y blanqueado de los fluoróforos a dicho volumen focal. El registro de la señal de fluorescencia es más eficiente, lo que resulta beneficioso para el estudio de tejidos que habitualmente contienen altos niveles de *scattering*. Dado que la señal de fluorescencia se genera en un volumen reducido, toda la señal detectable se puede registrar sin importar el camino óptico seguido por dichos fotones, mejorando la relación señal-ruido. Debido a esta autoconfocalidad el diseño del microscopio se simplifica, pues se elimina la necesidad de tener un *pinhole* delante del detector para eliminar la luz proveniente de fuera del foco. Finalmente, también permite la obtención de reconstrucciones tridimensionales de una forma sencilla, a partir de la colección de imágenes a diferentes planos, con una alta resolución axial (~2 micras) y lateral (~400 nm).

2b. Sistema experimental

Se ha desarrollado un microscopio no lineal cuyo esquema se muestra en la Fig. 1. Su estructura es flexible y permite modificaciones para su adaptabilidad en diferentes condiciones experimentales que puedan surgir. Como soporte se utilizó un microscopio invertido (Nikon TE2000-U) modificado adecuadamente. La fuente de luz fue un haz colimado procedente de un láser de Titanio-Zafiro de pulsos ultracortos (Mira 900f, Coherent, St. Clara, CA, USA), que genera pulsos de 120 fs a una frecuencia de 76 MHz y una potencia media máxima de 1 Watio. Esta fuente es sintonizable de tal forma que la longitud de onda de la luz emitida (λ_{in}) puede variar de forma controlada entre 700 y 980 nm. La combinación de dos espejos galvanométricos no resonantes produce un barrido en el plano XY. El control del foco en la dirección Z se llevó acabo con un motor DC, que además permite el barrido de la muestra en profundidad. Para la focalización del haz láser se han utilizado objetivos de distancia de trabajo larga (20x, NA=0.5 y 100x, NA=0.8).

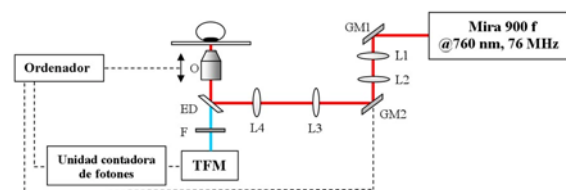


Fig. 1. Esquema del microscopio (no lineal) a 2 fotones.

La señal de fluorescencia no lineal producida en la muestra se recoge en modo reflexión con el mismo objetivo y atraviesa un espejo dichroico (ED) que separa la longitud de onda de excitación (λ_{in}) de la de fluorescencia ($\lambda_{out} > \lambda_{in}/2$). La luz pasa un filtro paso alta y llega al sistema de registro formado por un tubo fotomultiplicador (TFM) con una unidad contadora de fotones. Todo el sistema está totalmente automatizado y controlado por ordenador a través de un software especialmente diseñado en nuestro laboratorio. Aunque la dimensión del barrido sobre la muestra y la velocidad de registro se pueden modificar, la configuración utilizada permite el registro de imágenes de 250×250 píxeles a 1 Hz. La potencia de la luz en el plano de la muestra fue entre 2 y 10 mW dependiendo del tipo de muestra utilizada.

Se han utilizado diferentes muestras biológicas: hojas de plantas y pétalos de flores, y tejidos oculares, tales como un ojo compuesto de polilla y retinas ex-vivo de ojos de cerdo y vaca.

En particular, los globos oculares de cerdo y vaca utilizados en este estudio se obtuvieron de un matadero local y fueron extraídos unos minutos tras la muerte del animal. Seguidamente se transportaron al laboratorio para su análisis en un contenedor con solución salina. Una vez en el laboratorio, se separaron la córnea, el iris y el cristalino para extraer la retina, que también se separó del epitelio pigmentario (RPE, del inglés *retinal pigment epithelium*). La retina se colocó en un contenedor especial usado como porta-objetos cuyo parte inferior es una ventana de 170 μm de espesor. Dicho contenedor estaba lleno de solución salina para evitar la deshidratación de las muestras durante el tiempo que duran las medidas. Dependiendo del tipo de experimento, sobre el porta se colocó, bien la retina neurosensorial, bien el RPE (adherido de forma natural a la coroides y la esclera). Los tejidos ni se fijaron ni se tiñeron, de forma que toda la señal registrada corresponde a la propia autofluorescencia. Solamente la muestra de la Fig. 5 que sirve como test, se fijó y tiñó.

3. Resultados

Para caracterizar el sistema experimental y testar su correcto funcionamiento, se comenzó con el análisis de varias muestras vegetales. En estas muestras la molécula fluorescente es principalmente la clorofila, responsable de la fotosíntesis, así como de otros pigmentos no especificados [6].

En las Fig. 2(a-b) se muestran imágenes de fluorescencia no lineal correspondientes a una hoja de palmera, donde puede apreciarse su estructura fibrilar. Mientras que la Fig. 2(a) muestra un área de $420 \times 420 \mu\text{m}^2$, la Fig. 2(b) presenta un área de $210 \times 210 \mu\text{m}^2$ con la misma resolución. La técnica es capaz de visualizar los cloroplastos, los organelos de las células vegetales con una alta concentración de clorofila y un tamaño entre 2 y 5 μm . En la Fig. 2(c) se presenta la imagen de fluorescencia a dos fotones correspondiente a una hoja de arbusto de jardín, donde se observa una estructura completamente diferente a la mostrada en la Fig. 2(a). En la Fig. 2(d) aparece la imagen de

obtenida a partir de un pétalo de la flor de la misma planta.

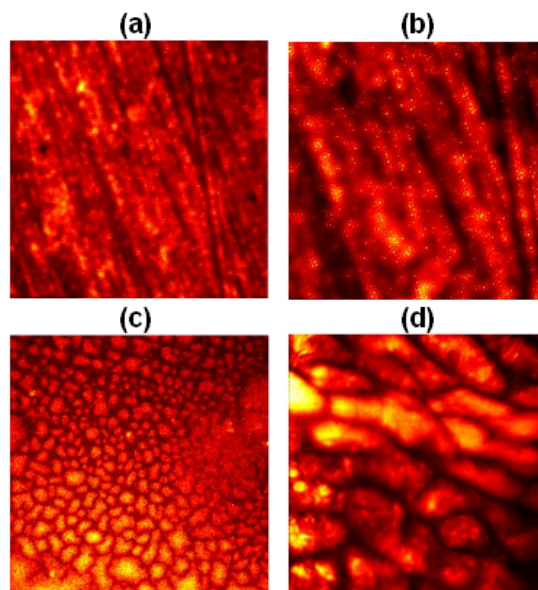


Fig. 2. Imágenes de autofluorescencia en diferentes muestra biológicas: hoja de palmera con $420 \times 420 \mu\text{m}^2$ (a) y $210 \times 210 \mu\text{m}^2$ (b); hoja (c) y pétalo de la flor (d) de una planta de jardín con $420 \times 420 \mu\text{m}^2$.

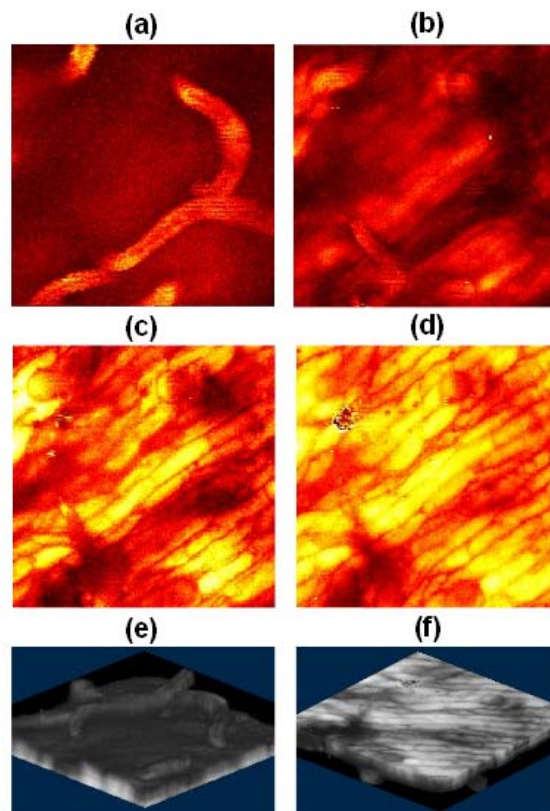


Fig. 3. (a-d) Imágenes de fluorescencia no lineal del nervio de una hoja; (e-f) reconstrucciones 3D.

Para mostrar las posibilidades de reconstrucción tridimensional de estructuras se ha analizado el nervio de la hoja de una planta (Fig. 3). La imagen 3D se ha generado a partir de 50 imágenes en planos separados 5 μm entre sí, mediante la utilización del motor DC. Las Fig. 3(a-d) muestran las imágenes obtenidas para cuatro planos diferentes, donde pueden apreciarse las células que forman la epidermis así como rizomas en el interior. En las Fig. 3(e-f) se presenta la reconstrucción 3D desde dos perspectivas diferentes (vistas superior e inferior).

La Fig. 4 muestra la imagen de un ojo de polilla. Los segmentos que forman el ojo compuesto emiten una señal de autofluorescencia elevada. Las Fig. 4(a-d) muestran el efecto autoconfoocal de forma muy gráfica: para cada posición del foco solamente se registra la señal procedente de ese plano focal, sin que contribuyan a la misma los planos adyacentes. Esto permite la reconstrucción 3D detallada del ojo compuesto (Fig. 4(e)), para lo que se han utilizado 30 imágenes en planos separados 5 μm entre sí. Finalmente la Fig. 4(f) muestra una imagen de autofluorescencia de alta resolución obtenida con el objetivo 100 \times , donde se puede observar la forma hexagonal de cada uno de los segmentos.

Como aplicación directa del instrumento desarrollado se ha estudiado la generación de señal de fluorescencia no lineal en tejidos retinianos de cerdos y vacas. La retina es un tejido transparente situado en la parte posterior del globo ocular que limita en su parte más interna (membrana limitante interna) con el cuerpo vítreo y en su parte más externa con la coroides (y ésta con la esclera). Tiene una estructura compleja y está compuesta por varias capas interconectadas [7].

Como primera aproximación para testear la eficacia del microscopio en este tipo de muestras se analizó un corte histológico de una retina de conejo. La muestra corresponde a una sección de 5 μm de espesor de retina fijada y teñida, colocada entre un portaobjetos y un cubreobjetos. El resultado se muestra en la Fig. 5. En la imagen se pueden observar claramente la estructura de las diferentes capas que conforman la retina, así como la coroides y la esclera.

Los resultados que siguen corresponden a muestras de retinas sin fijar ni teñir con lo cual toda la señal no lineal registrada y mostrada corresponde

a la fluorescencia endógena de la propia muestra. Prácticamente todas las capas de la retina muestran autofluorescencia debida a moléculas fluorescentes particulares en cada caso como se explica a continuación. Se irán mostrando imágenes de fluorescencia a dos fotones de las diferentes capas de la retina yendo desde la zona más interna a la más externa. Mientras no se diga lo contrario, todas las imágenes se han registrado con el objetivo 20 \times .

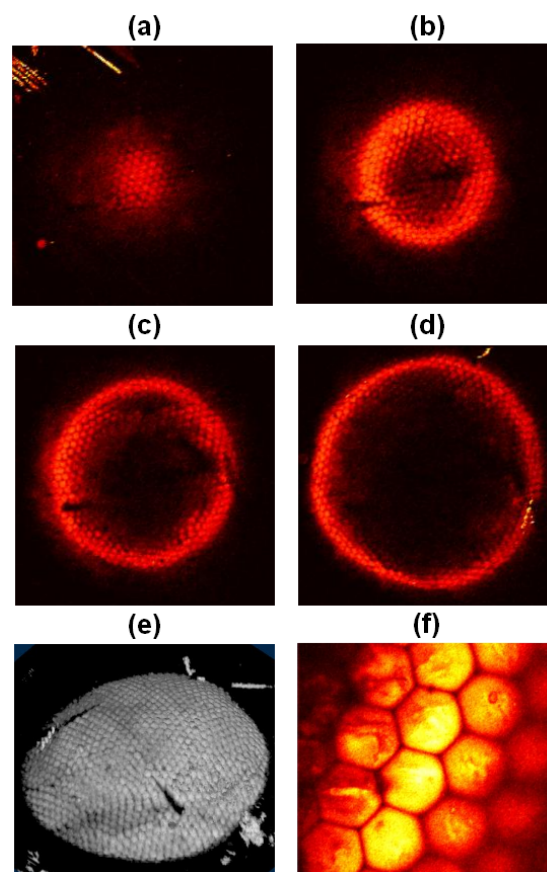


Fig. 4. Ojo compuesto de polilla. Imágenes de fluorescencia no lineal en diferentes planos (a-d); reconstrucción 3D del ojo compuesto (e); imagen de alta resolución de los segmentos del ojo compuesto obtenido con objetivo 100 \times (f).

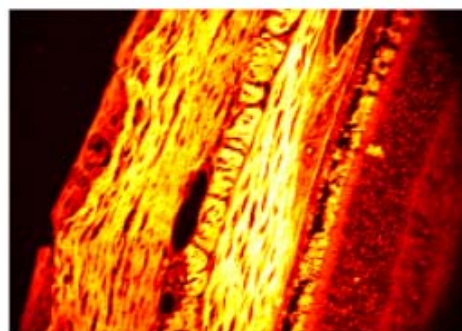


Fig. 5. Retina de conejo fijada y teñida con hematoxilina. Imagen una sección transversal (XZ) registrada con el microscopio a 2 fotones.

Las Fig. 6(a-b) muestran la estructura retiniana más interna que emite fluorescencia no lineal y que correspondiente a la capa de fibras nerviosas. Estas fibras cubren la retina y se dirigen hacia la cabeza del nervio óptico. Sus dimensiones oscilan entre 0.2 y 3.9 μm de diámetro, aunque suelen aparecer agrupadas en haces de 10 a 40 μm de diámetro [8]. Los vasos sanguíneos o capilares que irrigan la retina se encuentran justamente debajo de estas fibras nerviosas. En las Fig. 6(c-d) se puede apreciar que la fluorescencia que emiten es notable. Ésta se debe fundamentalmente a las células tanto epiteliales como endoteliales de las paredes de los capilares, así como la elastina y el colágeno [9].

Si se continúa registrando imágenes de secciones de la retina hacia dentro, se llega a la capa de células ganglionares (Fig. 7(a)). En esta zona la señal de fluorescencia procede del citoplasma de las células, mientras que el núcleo no muestra señal alguna. Dicha fluorescencia se atribuye fundamentalmente a dos fuentes localizadas en las mitocondrias de las células: las flavoproteínas y en particular el pigmento amarillo de la flavina adenina dinucleótido (FAD, del inglés *flavin adenine dinucleotide*) [10,11] y los nucleótidos pirimidínicos NAD(P)H [11]. El hecho de poder registrar imágenes de las células ganglionares sin que se hayan teñido previamente, puede ser esencial para aplicaciones clínicas y concretamente en el estudio del glaucoma. Esta patología ocular es una de las causas de ceguera más extendida en el mundo (después de las cataratas) y afecta al 68 millones de personas en todo el mundo, el 10% de las cuales son ciegos [12]. El resultado de la pérdida progresiva de este tipo de células solamente se puede detectar en etapas muy avanzadas de la patología cuando los tratamientos simplemente pueden ya ralentizar la pérdida de visión.

La Fig. 7(b) corresponde a la imagen de autofluorescencia de la capa nuclear externa. Las Fig. 7(c-d) muestran la distribución espacial de los fotorreceptores (capa retiniana más externa), concretamente las señales no lineales de los segmentos internos y externos. El segmento interno tanto de los conos como de los bastones contiene los orgánulos (estructuras suspendidas en el citoplasma) y el núcleo de la célula, y el segmento externo contiene los pigmentos. Así las fuentes de autofluorescencia en el segmento interno procede del NAD(H)P citoplasmático y de las flavinas mitocondriales, mientras que en el externo es

debida al todo-trans retinol [13] que se produce durante el ciclo visual.

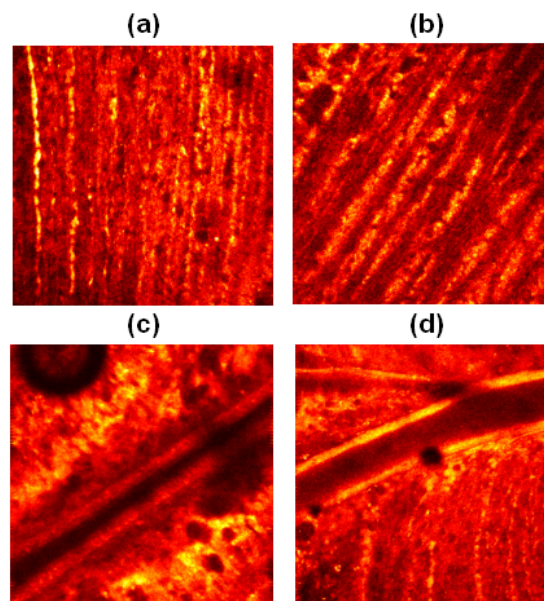


Fig. 6. Imágenes de autofluorescencia de la capa de fibras nerviosas de la retina de cerdo (a) y vaca (b) y en capilares retinianos de cerdo (c) y vaca (d). Las dimensiones son $210 \times 210 \mu\text{m}^2$.

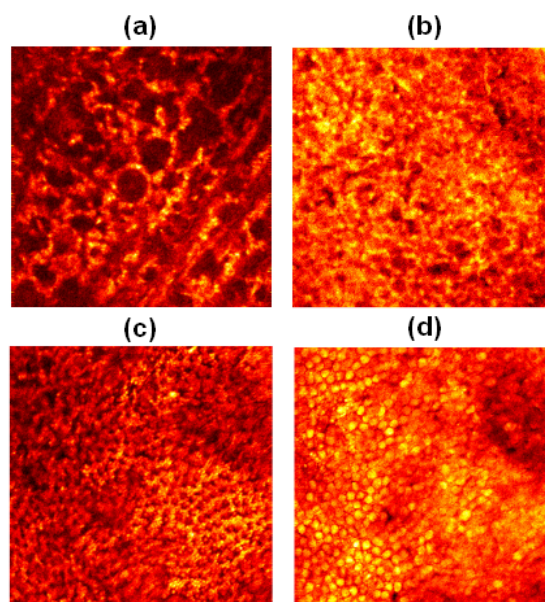


Fig. 7. Imágenes de fluorescencia a dos fotones en las diferentes capas de la retina de cerdo: células ganglionares (a); capa nuclear externa (b); segmentos internos (c) y externos de los fotorreceptores (d). Las dimensiones de todas imágenes son $210 \times 210 \mu\text{m}^2$.

Finalmente, en la Fig. 8 se presentan imágenes de células individuales del RPE. Tanto el patrón hexagonal de células RPE como gránulos individuales de lipofuscina son la principal fuente de autofluorescencia y emiten a una longitud de onda de alrededor de 550 nm [14]. Estos gránulos tienen un tamaño aproximado de 1 μm y son un residuo de la función digestiva de las células RPE. Su excesiva acumulación cerca de la membrana celular está normalmente asociado a un mayor riesgo de degeneración macular.

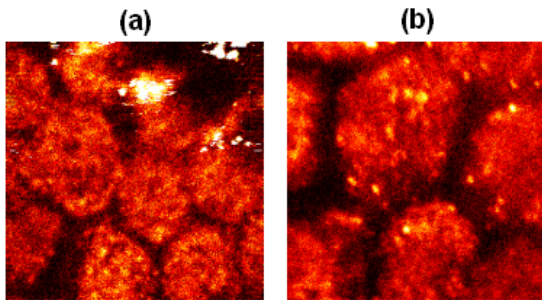


Fig. 8. Mosaico de células RPE en el cerdo (izquierda) y en la vaca (derecha) obtenidas con un objetivo 100 \times . Las dimensiones son 42 \times 42 μm^2 .

4. Conclusiones

Se ha construido un microscopio no lineal y se ha mostrado su potencial para el estudio de diversas muestras biológicas, incluyendo estructuras oculares *ex-vivo*. Debido a las características de esta técnica se pueden obtener imágenes de alta resolución de una forma rápida prácticamente inocua para el tejido estudiado. Es importante destacar que las muestras no han precisado de ningún tratamiento o manipulación especial y que las señales de fluorescencia se han obtenido a partir de la excitación de elementos intrínsecos. La

incorporación, actualmente en desarrollo, de sistemas para la corrección y/o manipulación del frente de onda, permitirán el aumento de la resolución lateral. Aunque actualmente las técnicas de microscopía multifotónica no pueden aplicarse a ojos en vivo, éstas presentan un enorme potencial como herramientas de diagnóstico y monitorización de patologías oculares, tales como glaucoma, degeneración macular, queratocono, o el seguimiento post-operatorio de cirugías.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (proyectos FIS2007-64765 y CONSOLIDER-INGENIO 2010, CSD2007-00033 SAUUL) y la Fundación Séneca de la Región de Murcia (proyecto 4524/GERM/06).