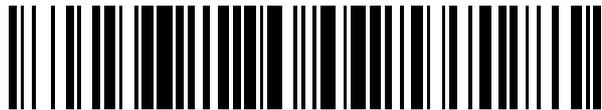


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 814**

21 Número de solicitud: 201100749

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

29.06.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.02.2013

Fecha de la concesión:

19.11.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

29.11.2013

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2012/000180

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (50.0%)
OTRI-PABELLÓN DE BRASIL, PASEO DE LAS
DELICIAS S/N
41012 SEVILLA (Sevilla) ES y
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (50.0%)**

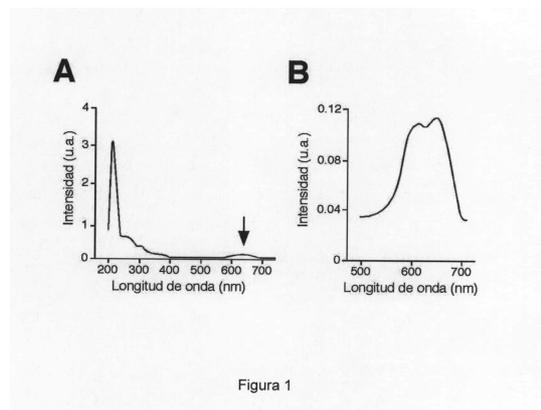
72 Inventor/es:

LEVITSKY, Konstantin L.;
VILLADIEGO LUQUE, Francisco Javier;
TOLEDO ARAL, Juan Jose y
LÓPEZ BARNEO, José

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA DETECTAR EL PRECIPITADO DE X-GAL U OTROS PRECIPITADOS OPACOS MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL**

57 Resumen:

La presente solicitud de patente se refiere a un procedimiento para la obtención de imágenes confocales de la tinción histológica Xgal, el cual se puede combinar con otros fluoróforos usados en inmunofluorescencia permitiendo por tanto el marcaje múltiple y la localización del precipitado Xgal a nivel celular. Además se reivindica un método correctivo que permite la visualización en microscopia confocal del precipitado Xgal y otros precipitados opacos.



ES 2 396 814 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para detectar el precipitado de X-gal u otros precipitados opacos mediante microscopía confocal,

5 **Sector de la Técnica**

El área científico-técnica en el que se desarrolla la invención es en el campo de la investigación biomédica y se refiere a un nuevo procedimiento para realizar adquisición de imágenes confocales de la tinción histológica Xgal, una técnica de amplio uso en el ámbito de la Biomedicina (Biología, Medicina experimental, Bioquímica, Farmacología....), así como al diseño de un software que automatice y facilite la adquisición de dichas imágenes.

El sector de actividad en el que se aplicaría la invención es en la investigación e industria biomédica, más concretamente en el campo de la microscopía confocal. Igualmente podría tener interés en el campo de las ciencias de los materiales.

15 **Estado de la técnica**

La tinción histológica Xgal se ha desarrollado en los últimos años como uno de los principales métodos de visualización de la expresión génica en animales de experimentación. Este método se basa en la utilización del gen bacteriano LacZ, que codifica la expresión de la enzima β -galactosidasa, como marcador de expresión génica (Sanchez *et al.*, 1996; Studer *et al.*, 1996). El sustrato empleado para visualizar la tinción Xgal es el 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopiranosida (Xgal). La adición de dicho sustrato, tras la correspondiente reacción de la β -galactosidasa, permite una fácil e inequívoca detección de expresión génica mediante un precipitado azul, el cuál puede ser visualizado mediante microscopía de campo claro. La tinción Xgal se puede realizar tanto en secciones de tejido como en órganos completos, siendo el método más utilizado para la inequívoca detección de la expresión génica mediante el uso de determinadas líneas de animales genéticamente modificados. Entre estas líneas de ratones genéticamente modificados se incluye la línea de ratones inducibles mediante la Cre-recombinasa ROSA-26 (Soriano, 1999) la cuál es la línea de animales más utilizada en estudios de visualización de la expresión génica.

El único sistema para la visualización de la expresión génica que rivaliza con la tinción Xgal es la proteína fluorescente verde (GFP, del inglés "Green Fluorescence Protein"), sin embargo la tinción Xgal ofrece un menor umbral de detección y una mejor relación señal-ruido que la GFP. No obstante la tinción Xgal tiene una gran desventaja frente a la GFP, ya que no permite realizar adquisiciones con microscopía confocal. Esto impide que aunque se combine con un segundo marcador (ya sea mediante inmunofluorescencia o la propia GFP) se pueda realizar una correcta localización celular del precipitado Xgal en secciones de tejido, imposibilitando determinar de forma fehaciente el tipo celular responsable de dicha expresión génica (Seymour *et al.*, 2007). La gran desventaja que supone el hecho de no poder adquirir imágenes confocales con la tinción Xgal se intenta salvar mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra la enzima β -galactosidasa. Sin embargo, esta solución ofrece los problemas clásicos de la inmunofluorescencia: un umbral de detección alto y una gran susceptibilidad a ofrecer falsos positivos. Recientemente se ha descrito un método que permite la visualización fluorescente del precipitado Xgal y por tanto la realización de microscopía confocal (Matei *et al.*, 2006). Sin embargo este método requiere un complejo proceso previo de fotoactivación del precipitado Xgal mediante un láser de zafiro dopado con titanio, el cuál no es comúnmente instalado en la mayoría de microscopios confocales. Además, este método de fotoactivación del precipitado Xgal resulta en la emisión de fluorescencia en el ancho rango de espectro de la luz visible (500-620), lo que imposibilita la utilización de los fluoróforos con las excitaciones en la zona del espectro de emisión que abarca de la zona verde hasta la roja más comúnmente utilizados para realizar colocación de subestructuras.

50 **Explicación de la invención**

La tinción histológica Xgal permite una fácil e inequívoca detección de expresión génica mediante su visualización con microscopía de campo claro. No obstante actualmente la tinción Xgal no permite realizar adquisiciones con microscopía confocal, lo que impide que aunque se combine con un segundo marcador se pueda realizar una correcta localización celular del precipitado Xgal en secciones de tejido.

El procedimiento objeto de la presente invención posibilita la adquisición de imágenes confocales del precipitado Xgal sin ningún proceso previo de fotoactivación, y consiste en la excitación del precipitado Xgal con una longitud de onda por encima de los 600 nm y la detección de la emisión de la fluorescencia a las longitudes de ondas más largas. Además, un adecuado procesamiento de dicha emisión de fluorescencia con un método correctivo permite la adquisición de imágenes confocales, localizando de manera inequívoca a nivel celular el precipitado Xgal. La obtención de imágenes de fluorescencia por el precipitado Xgal permite combinar este procedimiento con el uso de otros fluoróforos normalmente utilizados en inmunofluorescencia. Esto permite una fácil determinación de la célula

en que está localizado el precipitado al combinar este procedimiento con inmunofluorescencia para marcadores específicos del tipo celular en cuestión.

5 El procedimiento que esta patente propone posibilita la adquisición de imágenes confocales del precipitado Xgal. Para poder adquirir imágenes confocales de una muestra con el precipitado Xgal en secciones de tejido es necesario que al excitar el precipitado se pueda obtener una imagen fluorescente de éste. Por tanto en un primer abordaje se purificó el precipitado Xgal procedente de bacterias que expresaban β -galactosidasa y que fueron tratadas con el sustrato Xgal. Una vez purificado el precipitado Xgal se realizó el espectro de absorción el cual se muestra en la Figura 1A, en dicho espectro se observa además de un gran pico de absorción en la zona de ultravioleta un pequeño pico de absorción en la zona por encima de 600 nm y hasta 700 nm, que se representa ampliado en la Figura 1B. Esto posibilita que excitando el precipitado Xgal con un haz de luz coherente por encima de los 600 nm éste produce una emisión con una longitud de onda superior a 650 nm (Figura 2).

15 El hecho de que al excitar el precipitado Xgal con una longitud de onda por encima de 600 nm éste produzca una emisión con una longitud de onda superior a 650 nm permite obtener una imagen fluorescente del precipitado mediante el microscopio confocal. En la figura 3 se exponen imágenes obtenidas mediante microscopía confocal excitando el precipitado Xgal a distintas longitudes de onda. Como se muestra en dicha figura la excitación del precipitado con una longitud de onda de 633 nm permite obtener una imagen fluorescente de éste mediante microscopía confocal.

20 No obstante, al trasladar dicha invención a secciones de tejido se obtiene una imagen fluorescente con una mala relación señal/ruido (véase Figura 5A-B). En el procedimiento objeto de la invención se propone un proceso que permite mejorar dicha relación señal/ruido. Este consiste en sustraer de la imagen digital de fluorescencia la señal digital de la transmitancia de la sección en estudio, que es obtenida mediante escaneo simultáneo de la señal de luz transmitida. Es importante que el haz de luz coherente utilizado para la detección de la señal de luz transmitida sea por encima de los 600 nm, ya que en estas longitudes de onda la luz del haz tiene la mayor dispersión, por ello se obtiene una imagen más contrastada. Esta adquisición nos permite ajustar los valores de transmitancia a mínimos (cercanos a 0) para el precipitado Xgal (Figura 4).

30 La sustracción de la señal de transmisión en las zonas de la sección donde exista precipitado Xgal no disminuirá la señal de fluorescencia, ya que dicho precipitado es opaco por lo que absorbe toda la luz y por tanto tendría un valor de transmitancia cercano a 0 (Figura 4). Sin embargo en las zonas de la sección donde no estuviera el precipitado Xgal los valores de absorbancia serán mayores, esto permite que al restar dichos valores de la imagen de fluorescencia se disminuye en gran medida la señal inespecífica (Figura 5C). Por tanto al sustraer los valores de la transmitancia de la sección de la imagen de fluorescencia obtenida se consigue una señal fluorescente del precipitado Xgal totalmente nítida y localizada, la cuál coincide perfectamente en el mismo plano confocal con el precipitado Xgal (Figura 5C-D). El hecho de poder obtener una señal fluorescente nítida e inequívoca del precipitado Xgal permite la adquisición de imágenes confocales de dicho precipitado.

40 En el caso de los precipitados fluorescentes el procedimiento contempla una mejora de relación señal-ruido respecto a la señal fluorescente detectada por método clásico de adquisición en microscopía confocal con el haz de luz coherente de excitación correspondiente al espectro de excitación de molécula a estudiar junto al escaneo simultáneo de la señal de luz transmitida. Es importante que el haz de luz coherente utilizado para la detección de la señal de luz transmitida sea por encima de los 600 nm. La sustracción de la imagen digital de fluorescencia la señal digital de la transmitancia de la sección en estudio daría lugar a una nítida imagen fluorescente del precipitado.

45 Además, si en la muestra existe marcaje de otras estructuras no opacas pero en el mismo rango del espectro de excitación, el procedimiento aquí descrito permite distinguir entre estas estructuras. Después de la sustracción de la imagen digital de fluorescencia la señal digital de la transmitancia en la imagen resultante no va a aparecer la señal fluorescente de las estructuras translúcidas.

50 La sustracción en su turno de la señal digital fluorescente (sin corregir) a la señal fluorescente (corregida para las estructuras opacas) nos daría como resultado una nueva imagen fluorescente solamente de estructuras translúcidas. De este modo se puede resolver las señales fluorescentes con el mismo marcador de estructuras opacas de las translúcidas.

55 Las muestras opacas que no tienen fluorescencia, en principio, en microscopía clásica se podría adquirir por reflexión de la luz de láser de excitación. Pero en las muestras que tienen tanto zonas opacas, como translúcidas, la posición de elementos opacos en conjunto con las zonas transparentes y marcadas con fluorescencia se podría realizar con el mismo procedimiento de corrección que en este caso sería el de la sustracción de la señal digital de reflexión el de la transmitancia de la sección en estudio.

60

En la invención aquí descrita se propone un procedimiento que permite obtener imágenes confocales de la tinción histológica Xgal en secciones de tejido, lo cual supone un gran avance en el campo de la microscopía. Actualmente el sistema más utilizado para la visualización de la tinción Xgal es la microscopía de luz transmitida (Figura 6A). Esta técnica se puede combinar con otros marcadores celulares mediante inmunofluorescencia (Figura 6B), no obstante el hecho de no poder controlar la profundidad de campo impide definir el plano óptico en los que se localizan ambos marcajes, por lo que resulta imposible localizar de forma inequívoca la tinción Xgal a nivel celular en secciones de tejido (Figuras 6A-B).

La invención aquí descrita permite obtener del precipitado Xgal (Figura 6C) una imagen fluorescente mediante microscopía confocal (Figura 6E y tras método correctivo 6F). Esto supone el precipitado Xgal que se pueda emplazar en un plano óptico definido, con una profundidad de campo aproximada de 0,2 μm . Por ello esta invención permite localizar el precipitado Xgal (y por tanto la demostración de expresión génica) a nivel celular en secciones de tejido. No obstante, la gran ventaja de este procedimiento frente a otros existentes (Matei *et al.*, 2005) es que la imagen fluorescente obtenida del precipitado Xgal se puede combinar con otros fluoróforos comúnmente usados en inmunofluorescencia (con excitaciones desde longitudes de onda 458 nm a 594 nm). Por tanto con el procedimiento aquí descrito se puede combinar la adquisición de imágenes confocales de la tinción Xgal con la técnica de inmunofluorescencia (véase en la Figura 6D inmunofluorescencia para el marcador Tirosina Hidroxilasa puesta de manifiesto con el fluoróforo Alexa 568).

Esto permite el marcaje múltiple, y que mediante la utilización de marcadores específicos para los distintos tipos celulares se pueda localizar inequívocamente el precipitado Xgal a nivel celular en secciones de tejido multicelulares (ejemplos de marcaje múltiple y localización en secciones de tejido en Figuras 6G-H).

Además en esta solicitud de patente se reivindica un producto de instrucciones electrónicas que automatice y facilite el procedimiento de adquisición de imágenes confocales del precipitado Xgal, de forma que dicho procedimiento pueda ser llevado a cabo por un usuario no experto en microscopía confocal.

Para ello se propone el siguiente conjunto de instrucciones electrónicas:

En un microscopio confocal:

1. Enfocar el precipitado de Xgal con la luz blanca del microscopio.
2. Pasar a la adquisición con el sistema confocal.
3. Excitar la sección a estudiar con un haz de luz coherente por encima de los 600 nm.
4. Ajustar la potencia de láser adecuada para obtener la señal suficiente.
5. Activar la lectura de la fluorescencia en el rango desde 5-10 nm por encima de la luz de excitación hasta 750 nm.
6. Ajustar la ganancia de fotomultiplicador de fluorescencia.
7. Activar el fotomultiplicador para la luz transmitida.
8. Realizando barridos con el mismo láser ajustar la ganancia de fotomultiplicador de luz transmitida hasta para ver el precipitado de color negro en escala de grises.
9. Definir número de barridos a promediar para obtener una señal de fluorescencia del precipitado lo más limpia posible.
10. Realizar la sustracción de los valores de la transmitancia de la sección a los valores de la imagen fluorescente obtenida. Activar una ventana para presentar los datos de la sustracción.
11. Si la señal obtenida es débil multiplicar los datos de la señal obtenida por un factor entre 1,5 y 3 o se propone un ajuste fino de esta operación con una resistencia variable (potenciómetro).
12. Archivar o descartar los datos obtenidos.

Descripción de las figuras

- 5 Figura 1.- Espectro de absorción del precipitado Xgal. Se muestra el espectro de absorción del precipitado Xgal (A) en el que se puede observar un pico de absorción por encima de los 600 nm, el cual se muestra ampliado en B.
- 10 Figura 2.- Espectro de emisión del precipitado Xgal. Se muestra el espectro de emisión del precipitado Xgal tras excitación con un haz de luz coherente por encima de 600 nm.
- 15 Figura 3.- Obtención de una imagen fluorescente del precipitado Xgal mediante microscopía confocal. Se exponen imágenes del precipitado Xgal obtenidas mediante microscopía confocal tras excitación a distintas longitudes de onda.
- 20 Nótese que al excitar dicho precipitado con una longitud de onda de 633 nm se obtiene una clara imagen fluorescente mediante microscopía confocal.
- 25 Figura 4.- Escala de valores de transmitancia. Según esta escala, en zonas opacas, como es el caso del precipitado Xgal, se obtendrán valores cercanos a 0 mientras que en zonas en las que no se encuentre el precipitado se obtendrán valores superiores de transmitancia.
- 30 Figura 5.- Método correctivo que permite una mejor visualización de la imagen fluorescente del precipitado Xgal obtenida por microscopía confocal.
- 35 Se muestra imagen de luz transmitida en una sección de tejido (B) y la imagen fluorescente, en la que se pueden observar precipitados Xgal, (A) obtenida mediante microscopía confocal tras la aplicación del procedimiento propuesto en el apartado IV-B1 (nótese la mala relación señal ruido de la imagen fluorescente mostrada en A). Tras la aplicación del método correctivo propuesto en el apartado IV-B2 se obtiene una señal fluorescente nítida y localizada (C) que coincide con los precipitados Xgal que se pueden observar mediante luz transmitida (D).
- 40 Figura 6.- A. Imagen de microscopía de campo claro de la tinción histológica Xgal, la cual aunque se combine con marcadores celulares mediante inmunofluorescencia (B, inmunofluorescencia para Tirosina Hidroxilasa-Alexa 568) no permite localizar de forma clara e inequívoca el precipitado Xgal a nivel celular en secciones de tejido. La invención propuesta permite la obtención de imágenes confocales fluorescentes (E y F tras método correctivo) del precipitado Xgal y se puede combinar con otros fluoróforos usados en inmunofluorescencia (D, inmunofluorescencia para Tirosina Hidroxilasa Alexa 568). Esto permite localizar de forma inequívoca el precipitado Xgal en secciones de tejido (G y H, secciones de 30 µm de tejido carotídeo tras tinción Xgal e inmunofluorescencia de Tirosina Hidroxilasa).
- 45 **Explicación detallada de la invención**
- 50 Como ejemplo de realización de la invención y de la enorme utilidad de ésta mostramos la determinación del tipo celular del cuerpo carotídeo (CC) responsable de la expresión de GDNF (mostrado por el precipitado Xgal).
- 55 Antes del descubrimiento de la invención aquí propuesta, en el laboratorio se realizó un estudio del tipo celular del CC responsable de la expresión del factor neurotrófico GDNF (puesto de manifiesto por el precipitado LacZ). Para realizar dicho trabajo fue necesario un estudio enormemente complejo y costoso mediante microscopía electrónica de la localización del precipitado Xgal a nivel celular, determinándose que las células responsables de dicha expresión son las células tipo I o glómicas (Villadiego *et al.*, 2005).
- 60 Con el procedimiento propuesto en esta solicitud de patente el estudio anteriormente descrito se puede realizar simplemente mediante la combinación de la tinción Xgal y una inmunofluorescencia del marcador de células glómicas tirosina hidroxilasa (TH), ambas técnicas rutinarias en un laboratorio de biomedicina. De esta forma por el procedimiento aquí descrito se pueden adquirir fácilmente imágenes confocales mostrando la colocalización del precipitado Xgal y el marcador TH en el mismo tipo celular, concretamente en las células tipo I o glómicas (Figuras 6G-H).
- 65 Con este ejemplo se muestra que en la actualidad localizar inequívocamente a nivel celular el precipitado Xgal en secciones de tejido es un proceso muy complejo y costoso ya que requiere un estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica. Sin embargo con el procedimiento aquí descrito se puede localizar de forma sencilla e inequívoca el precipitado Xgal a nivel celular mediante la adquisición de imágenes confocales de dicho precipitado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para detectar el precipitado de Xgal mediante microscopía confocal sin proceso previo de fotoactivación, **caracterizado** porque comprende las etapas de:
- a) excitar la muestra con luz coherente de una longitud de onda del intervalo de 600-700 nm;
- b) recoger la señal de fluorescencia emitida por la muestra en el intervalo de longitud de onda cuyo límite inferior es un valor de longitud de onda 5-10 nm por encima de la luz de excitación y cuyo límite superior son 750 nm.
- 10 2. Procedimiento para detectar el precipitado de Xgal mediante microscopia confocal según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se recoge la señal emitida por la muestra en el intervalo de 650-750 nm.
- 15 3. Procedimiento para detectar el precipitado de Xgal mediante microscopía confocal según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque la longitud de onda de la luz de excitación es de 633 nm.
- 20 4. Procedimiento descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se realiza el escaneo de la señal transmitida por la sección de la muestra en estudio, de manera simultánea a la adquisición de la señal de fluorescencia/reflexión emitida por la muestra, tras lo cual se resta al valor de la señal del fluorescencia/reflexión el valor de la señal de transmitancia, de manera que la imagen fluorescente/reflexión final corresponde al resultado de dicha sustracción.
- 25 5. Procedimiento descrito según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el haz de luz coherente utilizado para la detección de la señal de luz transmitida tiene una longitud de onda superior a 600 nm.
- 30 6. Procedimiento descrito según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque comprende las etapas adicionales de:
- a) incubar la muestra con un compuesto que comprende un resto fluoróforo que emite en el intervalo de longitudes de onda de 458-594 nm;
- b) excitar la muestra con luz coherente con una longitud de onda capaz de excitar el resto fluoróforo y provocar la emisión de luz de fluorescencia por parte del mismo;
- 35 c) recoger la señal de fluorescencia emitida por la muestra con un valor de longitud de onda igual al valor de la luz de emisión de fluorescencia del resto fluoróforo.
- 40 7. Un producto de instrucciones electrónicas, **caracterizado** porque comprende un medio de lectura informático y un código de programa de lectura informático, registrado en el medio de lectura informático, adecuado para instruir a un sistema de procesamiento de datos de un sistema informático a realizar los cálculos relacionados con el método una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 45 8. Un producto de instrucciones electrónicas según la reivindicación 7, **caracterizado** porque comprende, además, un código de programa de lectura informático, registrado en el medio de lectura informático, adecuado para instruir al sistema de procesamiento de datos para controlar un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 50 9. Un sistema informático, que comprende un producto de programas informáticos y un sistema de procesamiento de datos configurado para recibir instrucciones leídas de la producción de programas informáticos, **caracterizado** por que el producto de programas informáticos es según la reivindicación 7 u 8.

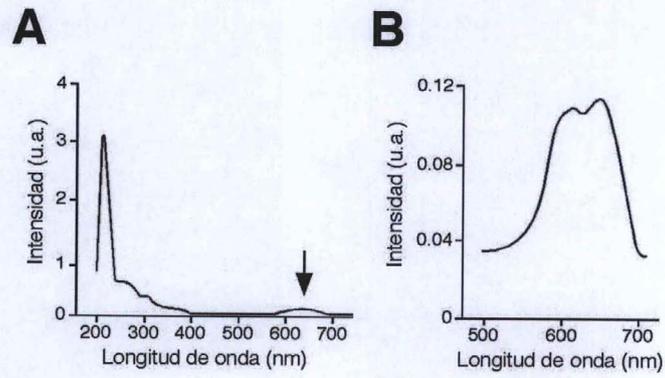


Figura 1

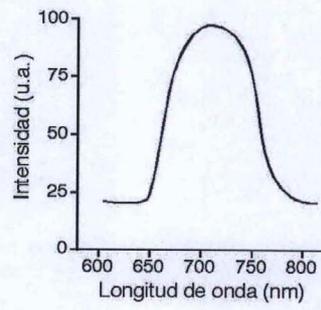


Figura 2

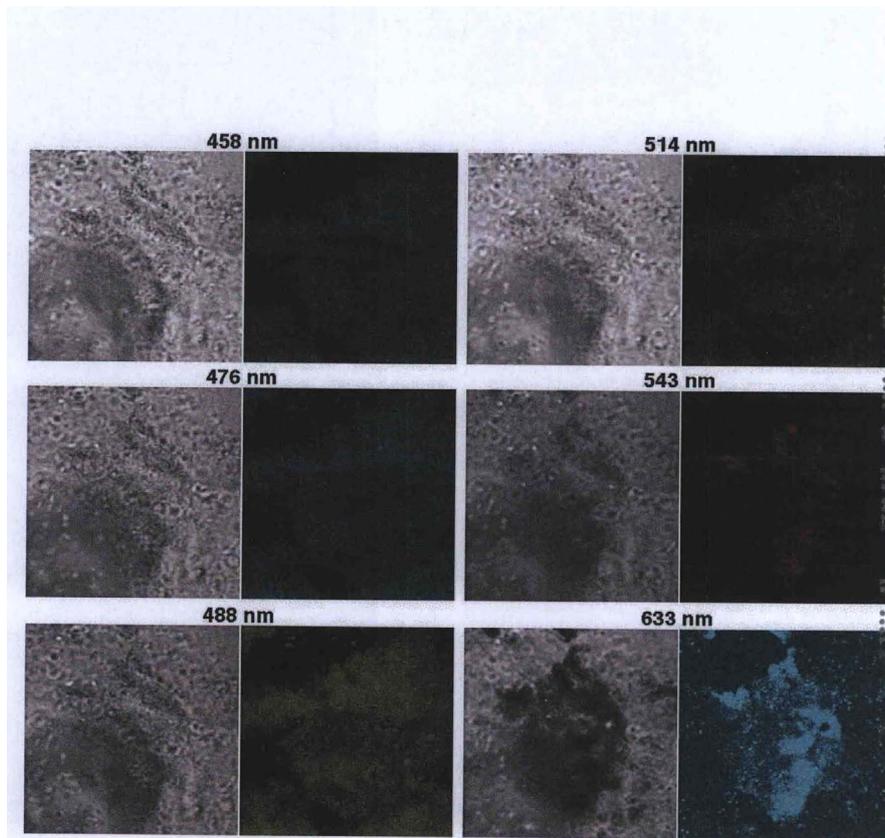
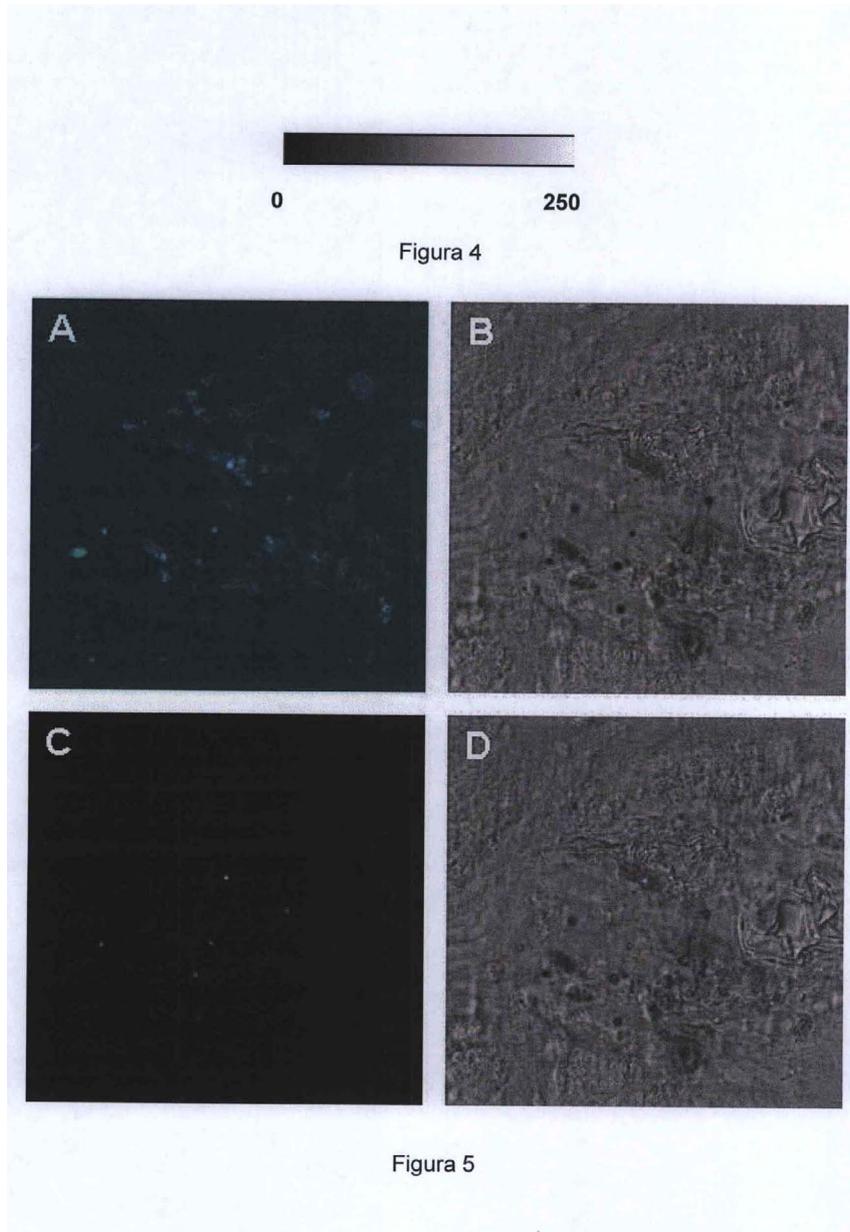


Figura 3



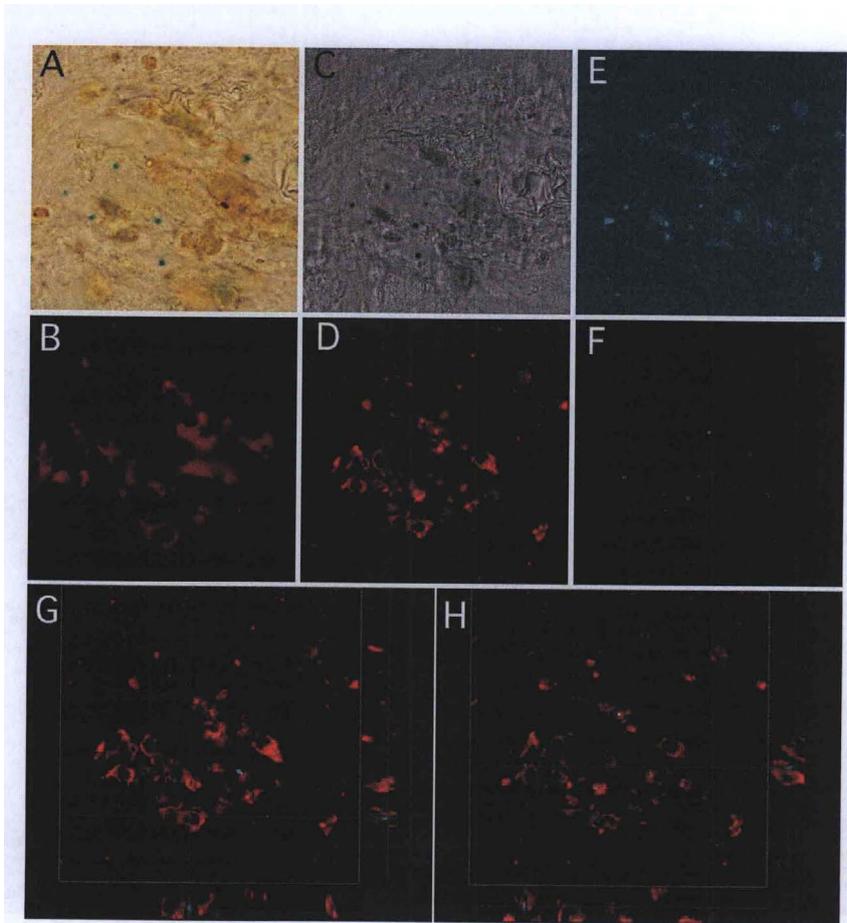


Figura 6