

Métodos microscópicos que revelan una imagen holística de la muestra

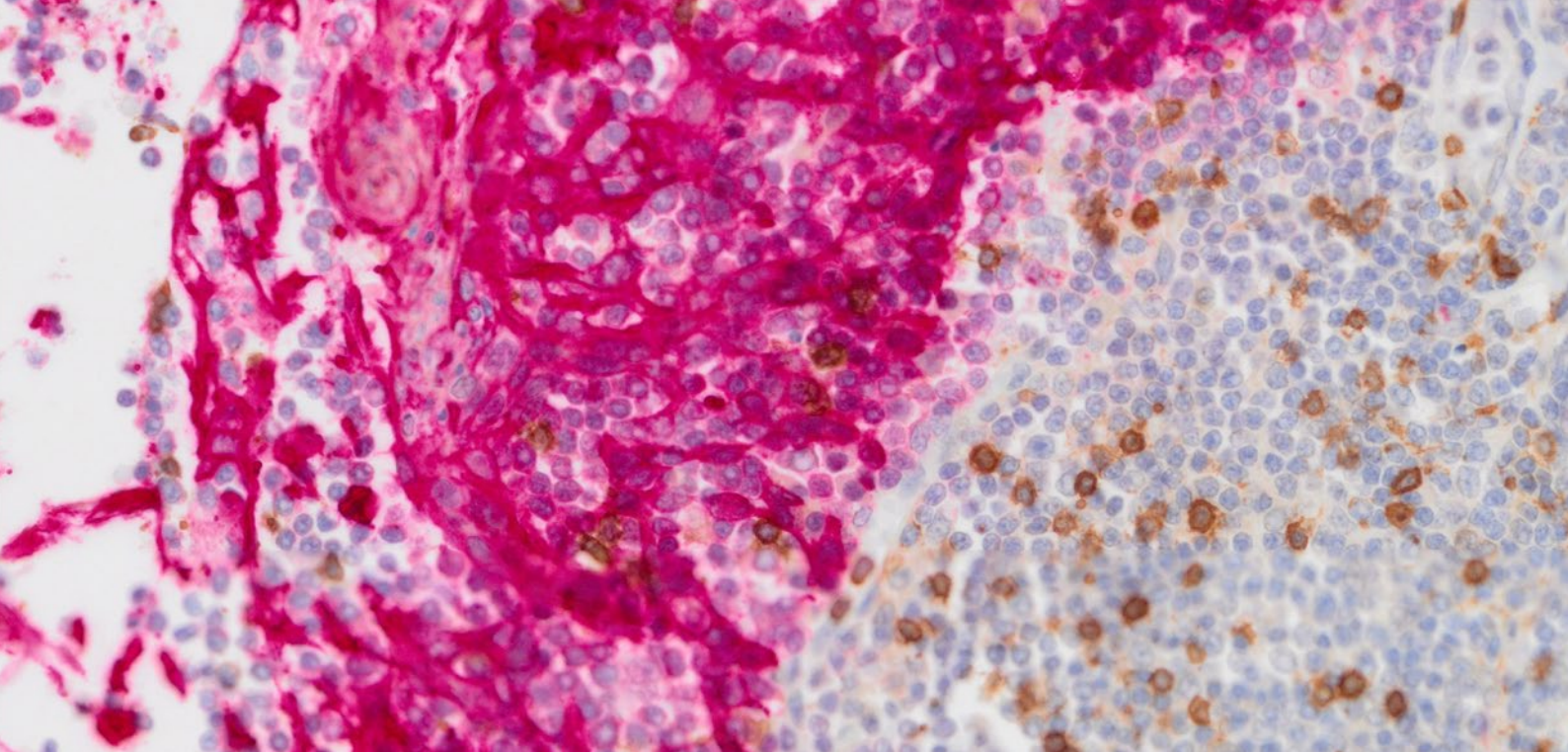
«El procesamiento de imágenes provenientes de portaobjetos completos y la multiplexación favorecen la obtención de un alto contenido de datos y la profundidad de los detalles, sin dejar de lado el enfoque sobre toda la muestra en el campo de visión»,

PALABRAS DE BRENDAN BRINKMAN, OLYMPUS CORP.

El procesamiento de imágenes de portaobjetos completos es un método que suele emplearse cuando los científicos tienen que obtener una imagen de una muestra relativamente grande en dos dimensiones que se extiende más allá del campo de visión de un solo microscopio. Las aplicaciones típicas incluyen el procesamiento de imágenes de tejidos histológicos que se han cortado en segmentos finos y colocado en un portaobjetos de vidrio.

El principio básico en el procesamiento de imágenes de portaobjetos completos es reunir digitalmente imágenes de alta magnificación con un campo de visión pequeño dentro de una visión panorámica más grande de la muestra. De forma bastante sencilla, este tipo de procesamiento de imágenes, a menudo conocido como procesamiento de imágenes digital de portaobjetos o microscopía virtual, proporciona un contexto biológico más completo de una imagen microscópica. La visualización de una o dos células aisladas con alta magnificación puede proporcionar información sobre una interacción o un mecanismo celular específico; pero, colocar dichas células en un contexto más amplio de los tejidos completos puede ofrecer una nueva dimensión a la investigación.

No es sólo una imagen macrométrica del tejido. La ventaja del procesamiento de imágenes de portaobjetos completos para el investigador es su visión macro a micro, en la que la resolución microscópica permite obtener una mayor cuantificación de las imágenes, ya sea si se ejecuta un recuento de núcleos en un tejido o se trazan axones en su largo recorrido a través del cerebro. «Macro a micro» es un proceso de trabajo típico que permite adquirir de forma automática una panorámica de la muestra y ofrece un mapa de resolución inferior para definir mejor la investigación a nivel macrométrico. Gracias a esta potente combinación de resolución y contexto biológico, el procesamiento automatizado de imágenes de portaobjetos completos ha pasado a ser un pilar imprescindible para muchos programas de investigación. Estos programas pueden incluir el archivo de diversas secciones del cerebro en serie hasta la catalogación de miles de muestras de un tipo de cáncer específico en la investigación oncológica, lo que permite una adquisición de imágenes de alto rendimiento para la reconstrucción de la sección serial.



Amígdala CD3 (rm), ImmPRESS Reagent (HRP) anti-ratón IgG con ImmPACT DAB (marrón), AE1/AE3(m) ImmPRESS (AP) (HRP) anti-conejo IgG con ImmPACT Vector Red (rojo). Contratinción con Hematoxilina QS (azul). Datos de imagen por cortesía de Vector Labs.

Durante años, estos sistemas se han limitado a dos únicos modos de procesamiento de imágenes: campo claro y epifluorescencia. En el procesamiento de imágenes de campo claro, la luz blanca transmitida pasa por la muestra y los tejidos se visualizan por medio de colorantes cromogénicos. No obstante, a no ser que se esté usando colorantes como la hematoxilina y la eosina (H&E), el campo claro no ofrecerá un contraste innato. El procesamiento de imágenes de epifluorescencia, por otro lado, permite marcar anticuerpos específicos y proporciona un nivel superior de focalización molecular. También permite superponer un número superior de colorantes para expandir el campo de la multiplexación.

En la actualidad, pueden usarse diversos tipos de contrastes intrínsecos con sistemas modernos para un procesamiento de imágenes de portaobjetos completos. Estos contrastes algunas veces necesitan filtros o sistemas ópticos simples que realzan su efecto en una muestra sin necesidad de usar colorantes especiales. Los tipos existentes son:

Fase y polarización — La fase y polarización pueden ser incluidas en las imágenes de portaobjetos completos para obtener diversos niveles de contraste basados en la luz polarizada o la iluminación de anillo de fase.

Procesamiento de imágenes de campo oscuro — El procesamiento de imágenes de campo oscuro utiliza las diferencias en el índice de refracción de las estructuras membranosas del tejido. Aunque pueden usarse algunos colorantes para realzar el campo oscuro, la técnica puede estar completamente exenta de marcado y puede ofrecer un nivel de contraste que es comparable a la fluorescencia. Sin embargo, este modo de observación puede ser sensible al polvo.

Adquisición con apilamiento en Z — Podemos dar por sentado que las imágenes de portaobjetos completos solo pueden capturarse a partir de un solo plano. Sin embargo, con muchos sistemas de procesamiento de imágenes de portaobjetos completos disponibles actualmente en el mercado, es posible dar un enfoque a través del apilamiento en Z, o varios planos del tejido, a fin de conservar el volumen completo de datos o una imagen más enfocada. Otras ventajas serían la posibilidad de:

- Adquirir varios planos con una resolución más alta.
- Visualizar muestras de hasta 100 μm de espesor.
- Visualizar con todos los métodos de observación disponibles.
- Obtener fácilmente información de todas las dimensiones de la muestra.
- Calcular proyecciones (deconvolución, valor máximo de z o imágenes de focalización extendida [EFI]).

Inmersión en aceite — Durante muchos años, no ha sido posible usar la inmersión en aceite entre la lente y el portaobjetos de vidrio dentro de un sistema de procesamiento de imágenes de portaobjetos completos con el fin de conseguir la resolución más alta. Sin embargo, ahora sí es posible gracias a los mecanismos automáticos de dispensación de aceite que mejoran la capacidad del sistema al recopilar imágenes de alta resolución.

La combinación de los modos de procesamiento de imágenes, o el procesamiento de imágenes multimodo, es más efectiva si se utiliza con la especificidad molecular alcanzada con las técnicas de marcado de anticuerpos. No obstante, han aparecido muchas situaciones complejas a la hora de marcar de forma eficiente y cuantitativa con fluorescencia.

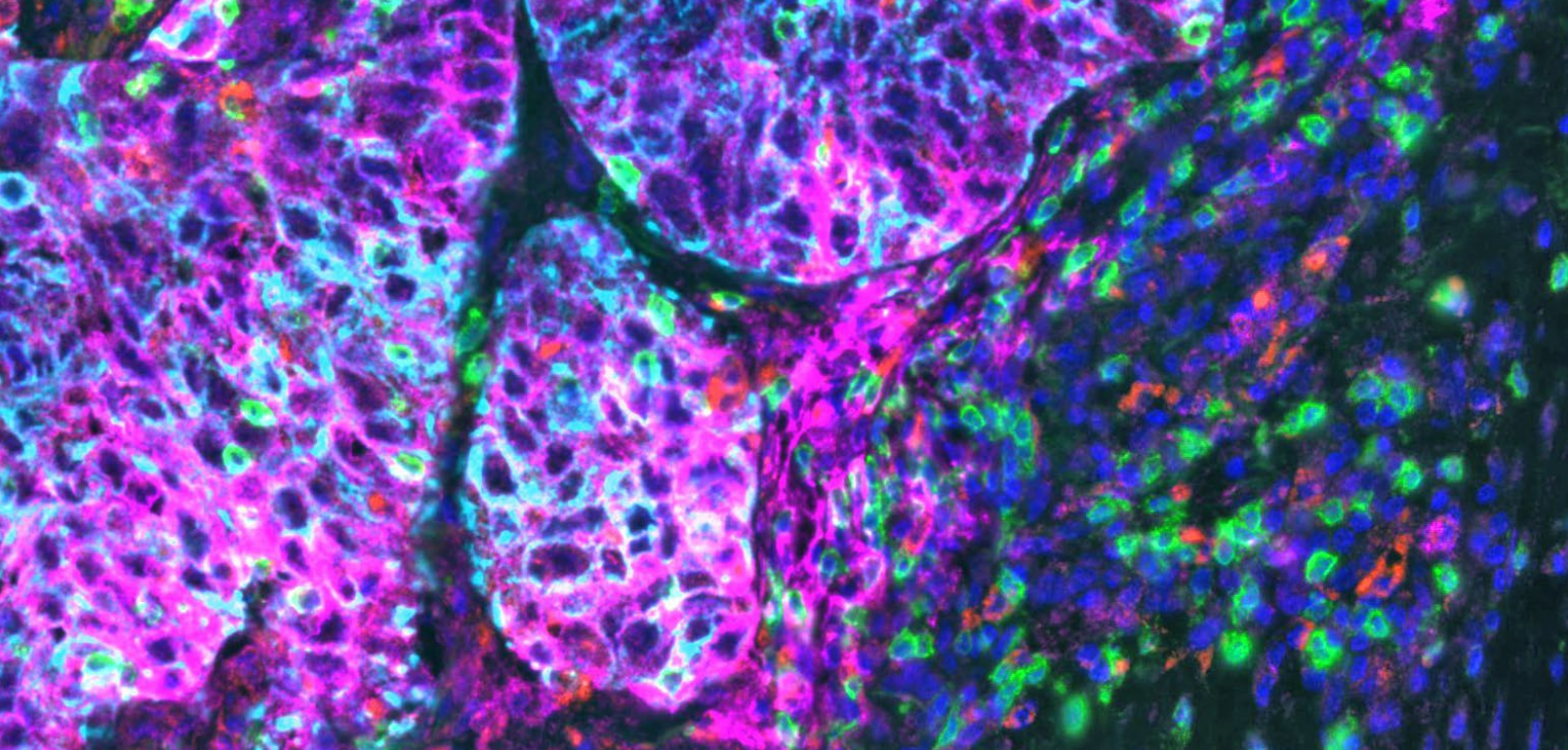


Imagen de tejido pulmonar tomada con un escáner VS200 a 20X y teñida con un kit múltiplex Ultivue PD-L1; Dapi: Contratación de DNA, FITC: CD8, TRITC: CD68, Cy5: PD-L1, Cy7: panCK. Datos de imagen por cortesía de Ultivue Inc.

Multiplexación en la inmuno-oncología

La multiplexación ha pasado a ser una herramienta útil en los estudios inmuno-oncológicos en el caso de tumores muy complejos. El número de células, los diversos métodos de invasión en el tumor y la relación entre el sistema inmunitario, el tumor y los distintos fármacos usados para combatir las enfermedades cancerígenas son factores importantes. Otro factor que agrava más la complejidad es el número de sustancias activas aprobadas para tratar los diversos tipos de cánceres. ¿De qué forma un inmuno-oncólogo puede prescribir el fármaco adecuado y determinar el plan de tratamiento idóneo?

La multiplexación ya existe desde hace algún tiempo, pero los fabricantes han trabajado duro para desarrollar un nuevo grupo de herramientas que puedan aplicarse y desplegarse de forma más amplia en diversas ubicaciones del tejido. La multiplexación resulta compleja porque requiere softwares, personal y equipos especializados para poder realizar un ensayo y aplicarlo en un tumor específico. El proceso de marcado múltiple, generalmente requerido, puede precisar de algoritmos de alineación de imágenes especializados, así como personal formado que sepa usar los equipos de escaneo de alta precisión, cuyo objetivo es el reconocimiento del tejido y la entrega de una imagen lista para su realineación.

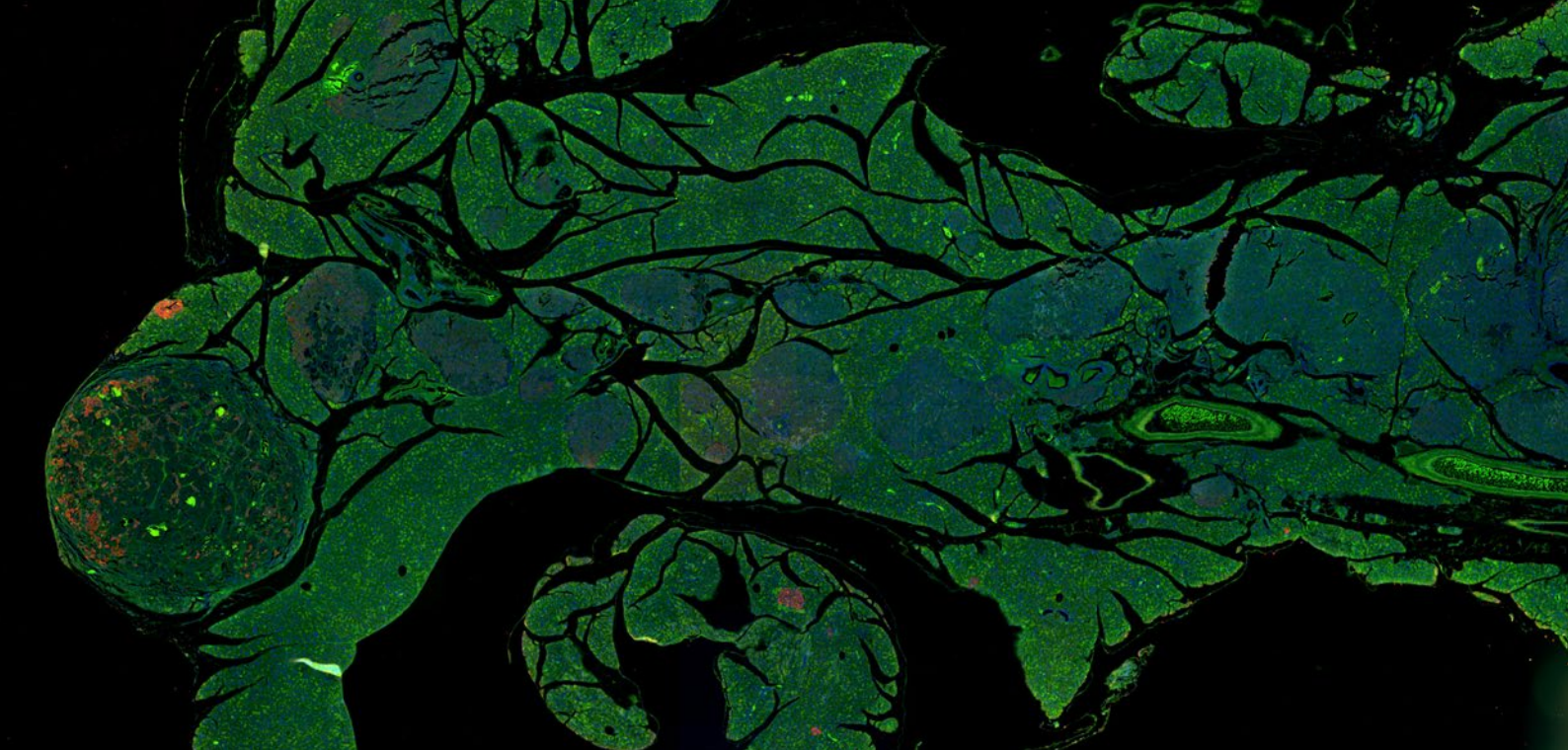
Los fabricantes han solventado las necesidades y los problemas del pasado que hacían que este tipo de ensayo no se utilizara con frecuencia. Para racionalizar la tecnología y ajustarla a los requisitos de flujo de trabajo que pueden escalar en última instancia, los elementos tecnológicos indispensables serían: multiplexación de alto nivel que solvete la pluralidad de objetivos, elucidación de la heterogeneidad celular y escasez de muestras; procesamiento de imágenes de portaobjetos completo que capture la morfología de la muestra, interacciones celulares e infiltración inmune; compatibilidad del flujo de trabajo que ofrezca un alto nivel de rendimiento, gastos de capital mínimos e implementación sencilla, y *software* que pueda identificar los fenotipos complejos con coexpresión/colocalización y expresión diferencial.

Capacidad de reproducción y cuantificación de las imágenes

Algunas combinaciones específicas de tecnologías ópticas y colorantes pueden proporcionar el óptimo análisis descendente. El análisis de imágenes de baja calidad a partir de un grupo incorrecto de reactivos, una configuración óptica incorrecta o una adquisición insuficiente no proporcionará un buen análisis cuantitativo en la investigación. En última instancia, el objetivo del escáner de portaobjetos digital es medir y cuantificar algunos aspectos de los tejidos. Sin embargo, es necesario considerar algunos factores.

Óptica transmitida — Es importante tener una representación del color verdadera y reproducible en la coloración con hematoxilina y eosina. La óptica transmitida debería tener características espectrales que simulen las fuentes de luz halógenas para poder reproducir los colores violeta, cian y rosa.

Precisión y fidelidad del color — Además de tener las características espectrales de iluminación adecuadas, la cámara microscópica debe tener una excelente fidelidad del color y una extraordinaria precisión. Para representar correctamente el tejido debe usarse una cámara con corrección de color y el balance adecuado. La medición de las imágenes digitales puede resultar objetiva porque los distintos ajustes de adquisición generan resultados de imágenes diferentes, pero las cámaras con corrección del color y perfiles ICC (Consorcio Internacional del Color) replican a la perfección los niveles de color e intensidad en las pantallas de los ordenadores.



Páncreas teñido con Dapi, GFP y RFP. Datos de imagen por cortesía de Wenjin Chen, Instituto del Cáncer Rutgers de New Jersey.

Planitud de campo — En una serie de imágenes en las que el campo no es plano o donde no viene integrada una función de corrección, puede aparecer un efecto de halo en todos los campos de visión y ello dificulta la cuantificación. En tales casos, debe usarse la compensación no lineal y el filtrado de todos los campos de visión, lo que consume mucho tiempo y recursos. Considere la configuración óptica que le ayudará a maximizar la planitud del campo para poder conseguir un resultado cuantitativo mejorado.

Combinación de técnicas para lograr el mejor resultado

Debido a que las imágenes se pueden adquirir en volumen con un apilamiento en Z de enfoque múltiple, un científico o técnico puede mejorar y realizar el contraste de las imágenes usando métodos como la deconvolución, las proyecciones de máxima intensidad o vistas de enfoque extendido. Disponer de diversos métodos permite escoger el mejor enfoque para la imagen específica. En última instancia, la solución para el análisis cuantitativo es una combinación de un buen marcado, una buena óptica y un *software* que resista el análisis de segmentación, recopilando información estadística que es relevante a nivel biológico.



Este documento fue publicado originalmente por Laurin Publishing.

Conozca al autor

Brendan Brinkman ha dedicado muchos años de trabajo al campo de estudio de células madre y ha realizado estudios sobre la derivación de la neuroesfera de ratón primaria. Después de varios años como gerente de un laboratorio de procesamiento de imágenes en la Universidad de California, San Diego, empezó a trabajar con Olympus en el año 2007 para colaborar en la creación de sistemas innovadores. En el año 2017, después de 2 años y medio en Olympus Tokio, donde ayudó a desarrollar soluciones de última generación, Brinkman regresó a la instalación de Olympus en Waltham, Massachusetts, donde trabaja actualmente en la división Life Science New Business Strategy como director senior de mercadotecnia.