

¿CÓMO FUNCIONA?

La captura por microdissección láser, desvelando los secretos de una célula

Rafael A. Cañas y Fernando de la Torre

Investigadores contratados. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga
rcana@uma.es fdelatorre@uma.es

La captura por microdissección láser (*Laser Capture Microdissection*, LCM, en inglés) es una poderosa técnica de microscopía que permite el aislamiento y captura de tejidos o células individuales a partir de secciones histológicas o cultivos celulares. Desde principios del siglo XX se han ido cimentando las bases que dieron lugar a su desarrollo definitivo en 1996 por Emmert-Buck (1) y comercializado posteriormente por *Arcturus* (2). Esta técnica, principalmente desarrollada como una herramienta para los patólogos, se ha extendido a diferentes ramas de la medicina y la biología siendo un método establecido en la biología molecular, las neurociencias, la biología del desarrollo, la investigación del cáncer, la medicina forense, la proteómica, la metabolómica o la investigación de plantas. El gran potencial de la LCM reside en su capacidad de procesar muestras para su posterior análisis mediante otras técnicas (para la medida de la expresión génica, de proteínas, actividades enzimáticas o, incluso, metabolitos) permitiendo analizar las funciones de una célula o tejido concretos. Aunque el uso de la microdissección láser, sin captura, también permite realizar estudios de desarrollo, por ejemplo, permitiendo la eliminación física de una célula de un embrión. En la última década la LCM se ha convertido en un magnífico aliado de las técnicas de última generación para el análisis masivo del transcriptoma, el proteoma o el metaboloma aportando información global sobre los procesos que tienen lugar en determinados compartimentos tisulares.

Desde un punto de vista meramente biológico, el funcionamiento de esta técnica presenta numerosos puntos clave más allá del acto de realizar la microdissección, que se puede considerar como el punto menos problemático de todo el proceso (Figura 1). En primer lugar, hay que considerar la correcta preparación de las muestras histológicas que se puede tener como la parte fundamental de la LCM. Depende de varios factores, incluyéndose las muestras biológicas de partida y la molécula a extraer a la conclusión de la LCM. No todos los tejidos responden de la misma manera a un fijador por lo que se ha de probar cuál es el mejor fijador para un órgano o tejido concreto. Además el proceso de fijación también puede presentar variaciones, por ejemplo, si se trata de muestras vegetales se habrán de realizar pulsos de vacío para mejorar la

infiltración del fijador en las células debido a las paredes celulares. Otro elemento esencial en la selección de fijador es el tipo de moléculas a extraer una vez realizada la microdissección. Si se trata de DNA o RNA no son recomendables fijadores que provoquen modificaciones permanentes o daños en la molécula como el paraformaldehído por lo que se han de usar

61

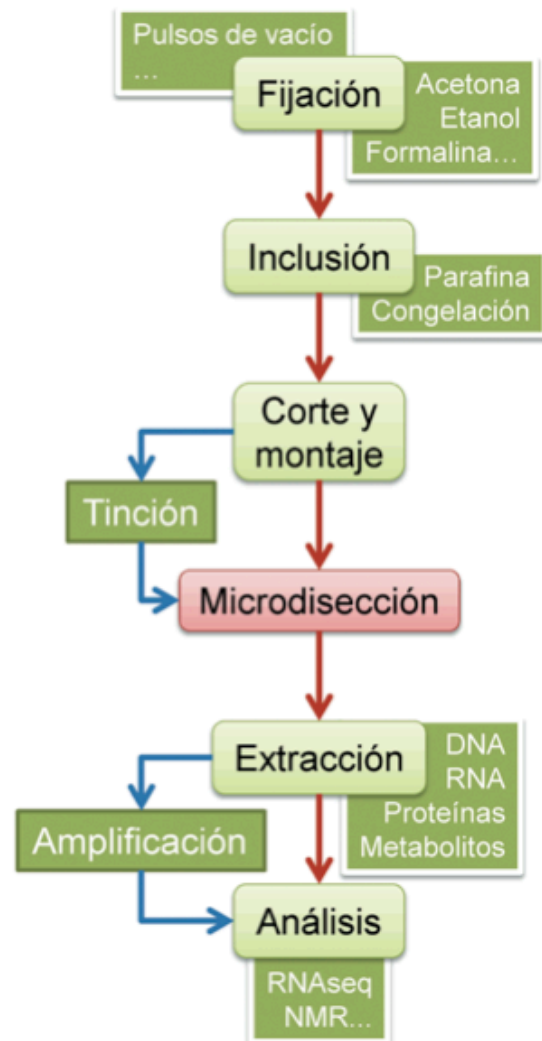


Figura 1: Esquema del flujo de trabajo en la LCM.

fijadores alternativos como la acetona, el etanol, la formalina, etc. Finalmente es importante el tipo de inclusión de la muestra: en parafina o en medio de congelación. Por ejemplo, si se opta por medios de congelación para cortar en un criostato existe la posibilidad de no realizar una fijación anterior a la inclusión mediante congelación rápida en nitrógeno. En ese caso la fijación se puede llevar a cabo sobre las secciones histológicas obtenidas tras cortar en el criostato.

En la LCM cada tipo de inclusión tiene unas ventajas sobre el otro. Mientras que la parafina puede conseguir una mayor integridad estructural, las muestras congeladas permiten mantener mejor la integridad de las moléculas a extraer. El uso de cada tipo de inclusión dependerá, por tanto, de las necesidades puntuales como de las capacidades del laboratorio donde se desarrolla la LCM. La inclusión con parafina conlleva un proceso de deshidratación de las muestras y, finalmente, de sustitución del contenido líquido de las muestras por parafina. Esto requiere un tiempo de manipulación de las muestras que puede conllevar la degradación de las moléculas de interés, por ejemplo el RNA, a pesar de estar fijadas. Por ello son usuales los procedimientos abreviados de inclusión de las muestras tanto convencionales como los que incluyen las microondas para mejorar y acelerar la infiltración del medio histológico. Las muestras incluidas en parafina han de ser muy bien deshidratadas puesto que una vez que las secciones histológicas van a ser usadas las enzimas endógenas como las RNAsas pueden empezar a actuar. En cuanto a las muestras congeladas la inclusión se hace por congelación sea con isopentano enfriado en nitrógeno líquido, congelación más gradual a mayor temperatura, o directamente en nitrógeno líquido, congelación más rápida a menor temperatura. Dependiendo del tipo de muestra se puede realizar sin ningún tratamiento previo o haciendo pre-incubaciones en agentes osmoprotectores como la sacarosa que mejoran la integridad estructural de las muestras congeladas.

La obtención de las secciones histológicas dependerá del medio de inclusión aunque en ambos casos es importante la conservación de las secciones hasta su uso en el LCM. Se suelen obtener secciones de un grosor de 10 μm aunque éste se puede modificar según las necesidades. Las secciones obtenidas a partir de muestras incluidas en parafina una vez montadas en portaobjetos para LCM han de ser bien secadas y conservadas protegidas de la humedad. En el caso de las mues-

tras congeladas las secciones se pueden guardar montadas sobre un portaobjetos para LCM a -80°C hasta su uso. Justo antes de la microdissección se pueden teñir las secciones histológicas para poder identificar las áreas de interés que se desean separar del tejido. Se pueden hacer tinciones convencionales, como la eosina-hematoxilina, como inmunohistoquímicas. En cualquier caso, los protocolos que se usan son abreviados y se han de tomar todas las precauciones posibles respecto a los productos empleados para evitar la degradación de las moléculas a extraer. En algunos casos, como en tejidos vegetales con grandes paredes celulares, se puede realizar la LCM sin ningún tipo de tinción lo que aumenta en cierta medida las posibilidades de éxito.

La LCM en sí es el más sencillo de todos los pasos a realizar. El microdisector láser es básicamente un microscopio óptico, al que se le puede acoplar fluorescencia, con un láser y un sistema de captura de las muestras diseccionadas. Adicionalmente el microscopio posee una cámara conectada a un ordenador con el que se realiza la selección de los tejidos o células que han de ser aislados de las secciones histológicas o cultivos celulares. El sistema fue inicialmente comercializado por Arcturus (2) aunque con el tiempo han aparecido diversas compañías que han desarrollado sus propios equipos con algunas diferencias entre todos ellos. Existen láseres de infrarrojo y de UV, todos diseñados para evitar daños a las muestras capturadas. El sistema de captura es distinto en cada equipo, puede ser mediante un film adhesivo (*Arcturus*, *MMI*), por una catapulta de onda de presión inducida por un láser (*Zeiss*) o simplemente por gravedad (*Leica*) (Tabla 1). Cada casa comercial posee un conjunto de consumibles propio. Los portaobjetos para LCM poseen una membrana sobre la que se aposentan las secciones histológicas y que al realizarse la microdissección se desprende del portaobjetos junto con la muestra seleccionada para su posterior captura. Estos portaobjetos pueden variar dependiendo de si son de cristal o marcos de acero y del tipo de polímero de la membrana sobre la que realmente se aposenta la sección histológica. El uso de un tipo de polímero u otro depende de la aplicación final del LCM y si el material puede interferir en los procesos posteriores. Además de portas también se pueden encontrar otros accesorios para la LCM como placas de Petri especiales para cultivos celulares que permiten la selección de células individuales bien para hacer subcultivos o para realizar análisis

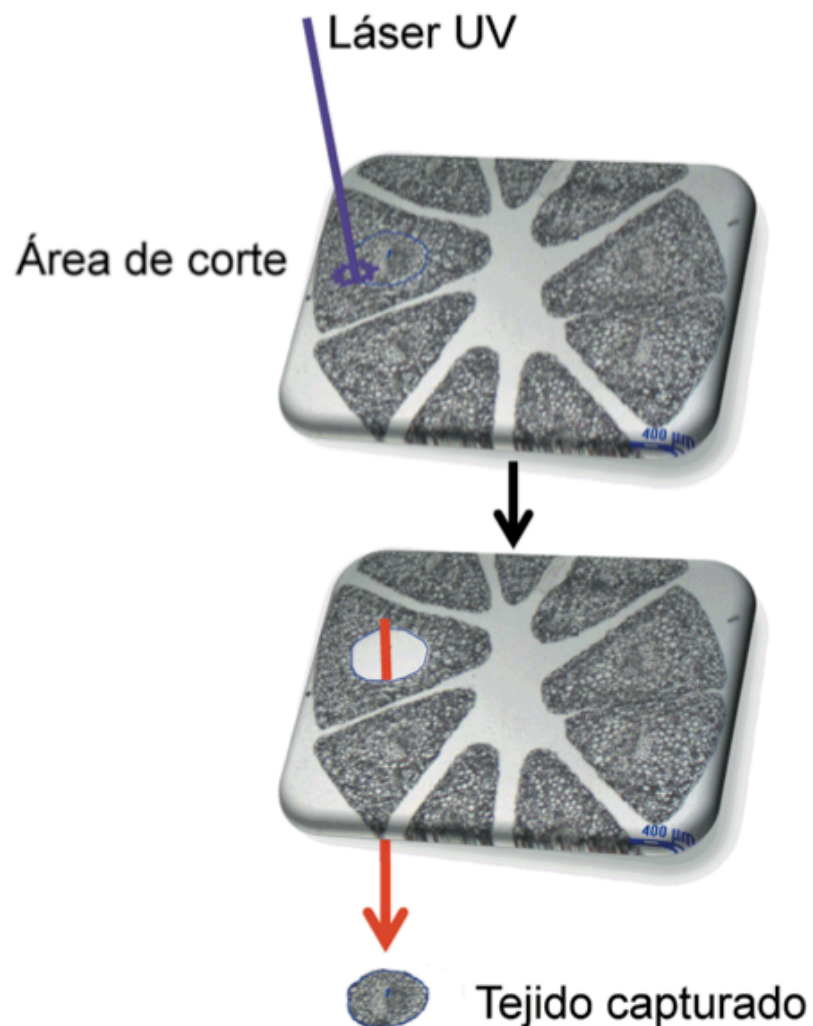
Tabla 1: Tipos de equipos LCM.

Compañía	Sistema	Captura	Láser	Longitud de onda
Arcturus	Arcturus ^{XT}	Membrana CapSure	IR	810 nm
Leica	LMD7000	Gravedad	UV	349 nm
MMI	CellCut Plus	Tapón adhesivo	UV	355 nm
Zeiss	PALM MicroBeam	Catapulta por onda de presión	UV	337 nm

(2,3). Básicamente el proceso de microdissección consiste en la selección de las células o tejidos a cortar en la pantalla de un ordenador, el corte de las partes seleccionadas por parte del láser y su captura en un tubo (Figura 2). Evidentemente existe la posibilidad de realizarlo todo de manera manual o automática mediante el uso del software del equipo. Los parámetros para el corte con el láser pueden cambiar dependiendo del aumento, de la muestra y del portaobjetos con los que se trabaje. El corte se realiza mediante el láser, según el tipo de equipo la modulación de su intensidad, su frecuencia o el ancho del corte podrán ser modificados para cada muestra. Finalmente, una vez obtenidos los cortes se han procesar para la realización de los subsecuentes análisis. Dependiendo del tipo de análisis las muestras pueden ser almacenadas en un $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. En la actualidad existen kits comerciales para la extracción de DNA y RNA de muestras aisladas por LCM. El número de células o la cantidad de tejido aislado dependerá de las necesidades de los análisis posteriores aunque, generalmente, las cantidades que se pueden obtener son muy limitadas, por lo que el uso de ciertas técnicas dependerá de reacciones de amplificación de las moléculas extraídas (4).

La LCM se ha convertido en un complemento indispensable para los análisis masivos de las funciones de los seres vivos. En este contexto un tipo de trabajos muy desarrollados hasta el momento son los atlas de expresión génica en los diferentes tejidos de un órgano e incluso en las distintos tipos celulares de un

tejido aunque la variedad de posibles usos de la LCM sea igual al número de técnicas que se puedan combinar con ella (2,3). La LCM puede aportar una información esencial para la interpretación de la gran masa de datos que generan las nuevas tecnologías contextualizando cada función.



63

Figura 2: Esquema de la microdissección láser.

Bibliografía citada:

1. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA. Láser capture microdissection. *Science* 274:998-1001, 1996
2. Página web del sistema LCM de Arcturus. <http://www.lifetechnologies.com/es/en/home/life-science/gene-expression-analysis-genotyping/láser-capture-microdissection.html>
3. Página web del sistema LCM de Leica en Leica Science Lab. <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/topics/láser-microdissection/>
4. Cañas RA, Canales J, Gómez-Maldonado J, Avila C, Cánovas FM. Transcriptome analysis in maritime pine using láser capture microdissection and 454 pyrosequencing. *Tree Physiology*. doi: 10.1093/treephys/tpt113, 2014