



## UN NUEVO MICROSCOPIO: SE PUEDE VER A TRAVÉS DE UN CRÁNEO INTACTO

Recientemente, un equipo de investigación dirigido por el profesor **CHOI Wonshik** en el Centro de Espectroscopía y Dinámica Molecular dentro del Instituto de Ciencias Básicas (IBS) en Seúl, Corea del Sur, logró un gran avance en la obtención de imágenes ópticas de tejido profundo. Desarrollaron un nuevo microscopio óptico que puede obtener imágenes a través del cráneo de un ratón intacto y adquirir un mapa microscópico de redes neuronales en los tejidos cerebrales sin perder resolución espacial. Tal descubrimiento fue publicado en *Nature* (*Seokchan, Y. et al. Laser scanning reflection-matrix microscopy for aberration-free imaging through intact mouse skull. Nature Communications, 2020; 11 (1) DOI: 10.1038/s41467-020-19550-x*).

El cráneo de un ratón es una barrera para la obtención de imágenes ópticas de alta resolución porque sus estructuras internas gruesas y no homogéneas inducen aberraciones complejas que varían drásticamente de una posición a otra. A menudo se requieren procedimientos invasivos que crean ventanas de cráneo delgado o de cráneo abierto para obtener imágenes microscópicas de los tejidos cerebrales subyacentes. Es por ello, que las estructuras finas del sistema nervioso del ratón son difíciles de visualizar debido al fuerte ruido de motas y la distorsión de la imagen.

Esto es problemático en la investigación de la neurociencia, donde el ratón se usa ampliamente como organismo modelo.

Debido a la limitación de las técnicas de imagen que se utilizan actualmente, el cráneo debe extraerse o adelgazarse para investigar microscópicamente las redes neuronales de los tejidos cerebrales subyacentes.

Por lo tanto, se han sugerido otras soluciones para lograr imágenes más profundas de los tejidos vivos. Por ejemplo, la microscopía de tres fotones se ha utilizado con éxito para obtener imágenes de neuronas debajo del cráneo del ratón en los últimos años. Sin embargo, la microscopía de tres fotones está limitada por una baja tasa de repetición del láser, ya que emplea una ventana de excitación en el rango de infrarrojos, que puede dañar el tejido vivo durante la obtención de imágenes in vivo. También tiene un poder de excitación excesivo, lo que significa que el fotoblanqueo es más extenso en comparación con el enfoque de dos fotones.

En este trabajo, los investigadores proponen una modalidad de imágenes sin etiquetas denominada **microscopía de matriz de reflexión de barrido láser (LS-RMM)** para registrar los mapas de amplitud y fase de ondas reflejadas en puntos no confocales, así como puntos confocales. El método propuesto permite encontrar y corregir computacionalmente hasta 10,000 modos angulares de aberraciones que varían cada  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  parche en el plano de la muestra.

Este nuevo microscopio se denomina microscopio de matriz de reflexión y combina los poderes del hardware y la óptica adaptativa computacional (AO), que es una tecnología desarrollada originalmente para la astronomía terrestre para corregir aberraciones ópticas. Mientras que el microscopio confocal convencional mide la señal de reflexión solo en el punto focal de iluminación y descarta

toda la luz desenfocada, el microscopio de matriz de reflexión registra todos los fotones dispersos en posiciones distintas del punto focal. Los fotones dispersos luego se corrigen computacionalmente usando un algoritmo AO novedoso llamado acumulación de bucle cerrado de dispersión simple (CLASS), que el equipo desarrolló en 2017. El algoritmo explota toda la luz dispersa para extraer selectivamente luz balística y corregir aberraciones ópticas severas. En comparación con los sistemas de microscopía AO más convencionales, que requieren reflectores puntuales brillantes u objetos fluorescentes como estrellas guía de manera similar al uso de AO en astronomía, el microscopio de matriz de reflexión funciona sin ningún etiquetado fluorescente y sin depender de las estructuras del objetivo. Además, el número de modos de aberración que pueden corregirse es más de 10 veces mayor que el de los sistemas AO convencionales.

Los autores logran realizar imágenes de reflectancia de axones mielinizados in vivo debajo de un cráneo de ratón intacto, con una resolución espacial limitada por difracción ideal de 450 nm (**ver figura**). Además, demuestran imágenes de fluorescencia de dos fotones a través del cráneo de dendritas neuronales y sus espinas mediante la corrección física de las aberraciones identificadas en la matriz de reflexión.