

Inmunofluorescencia Multiplex

M en C Saraí G. De León Rodríguez
Universidad Galileo 18 de noviembre 2024



LNMA

Laboratorio Nacional de Microscopía Avanz



Galileo
UNIVERSIDAD



Saraí Gisel De León Rodríguez

Química Fármaco Bióloga ,UNAM.

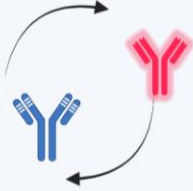
M en Ciencias Biológicas, UNAM

Estudiante Doctorado del Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.



Proyecto

Inmunofluorescencia
multiplex



Paciente con
melanoma



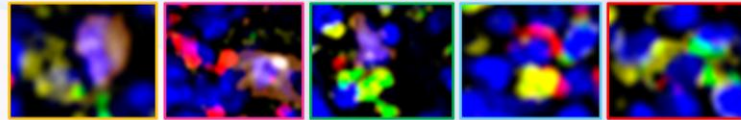
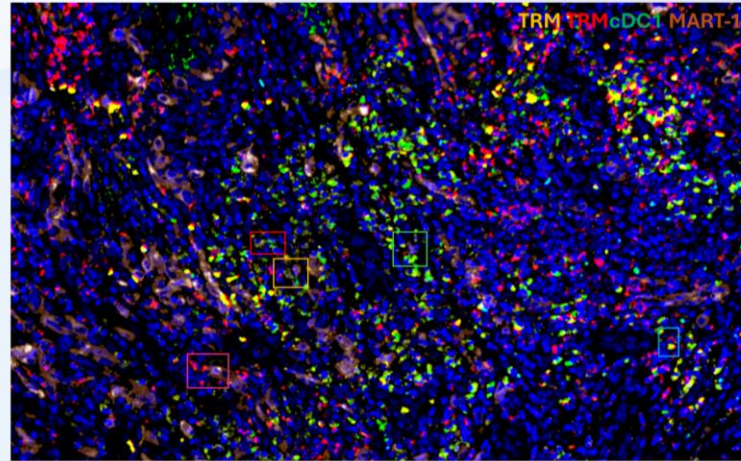
Microscopia
confocal



Inteligencia
Artificial

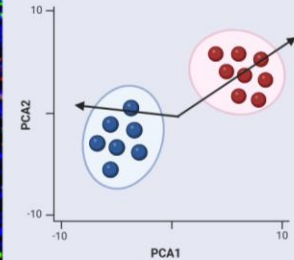


Estudio exhaustivo del microambiente tumoral



Ejemplos de interacciones celulares

Pronóstico y predicción
de respuesta



Temario



Importancia de los tejidos como fuente de información

Inmunofluorescencia multiplex

Protocolo experimental

Diseño de paneles de tinción

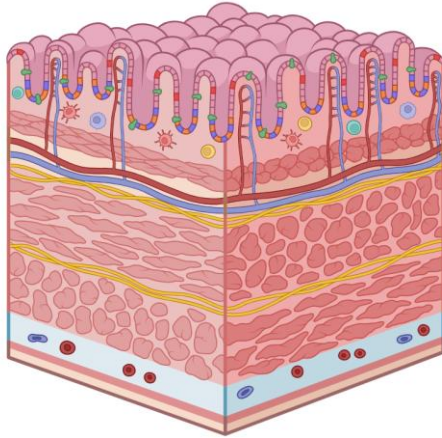
Dudas



Los tejidos como fuente de información

DNAseq, RNAseq, single-cell,
OMICAS

Disgregación del tejido=pérdida de la
información del contexto espacial

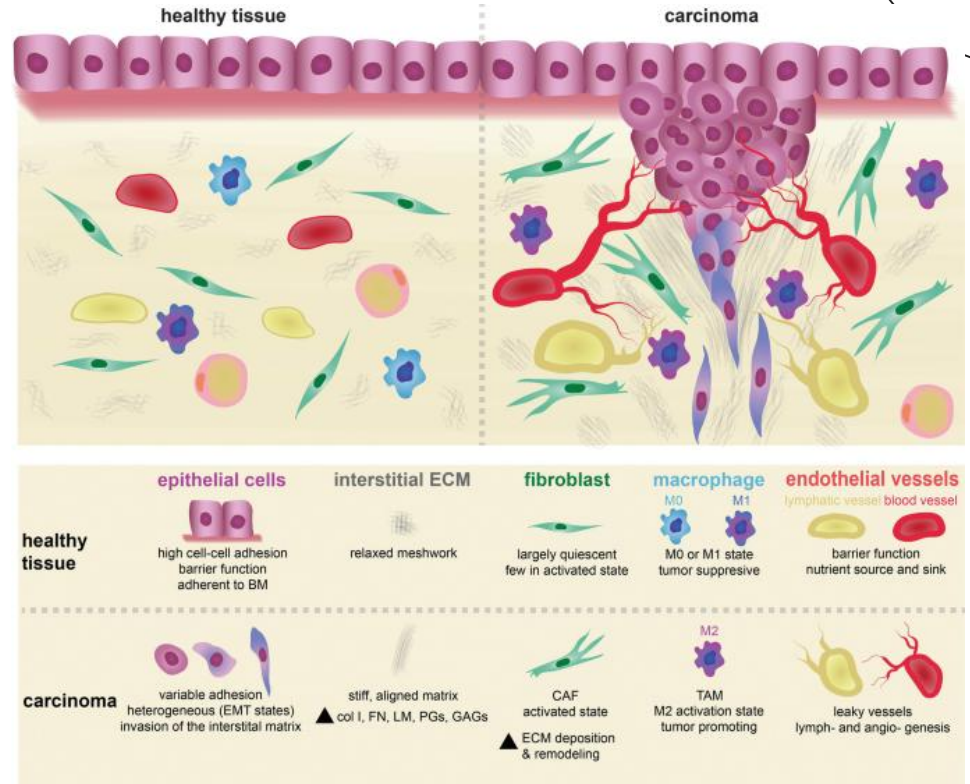


La arquitectura de los tejidos normales y enfermos influye fuertemente en el desarrollo y progresión de la enfermedad, así como en la respuesta y resistencia a tratamientos

Inmunofluorescencia vs transcriptómica especial- La proteómica refleja lo que está sucediendo en el fenómeno biológico

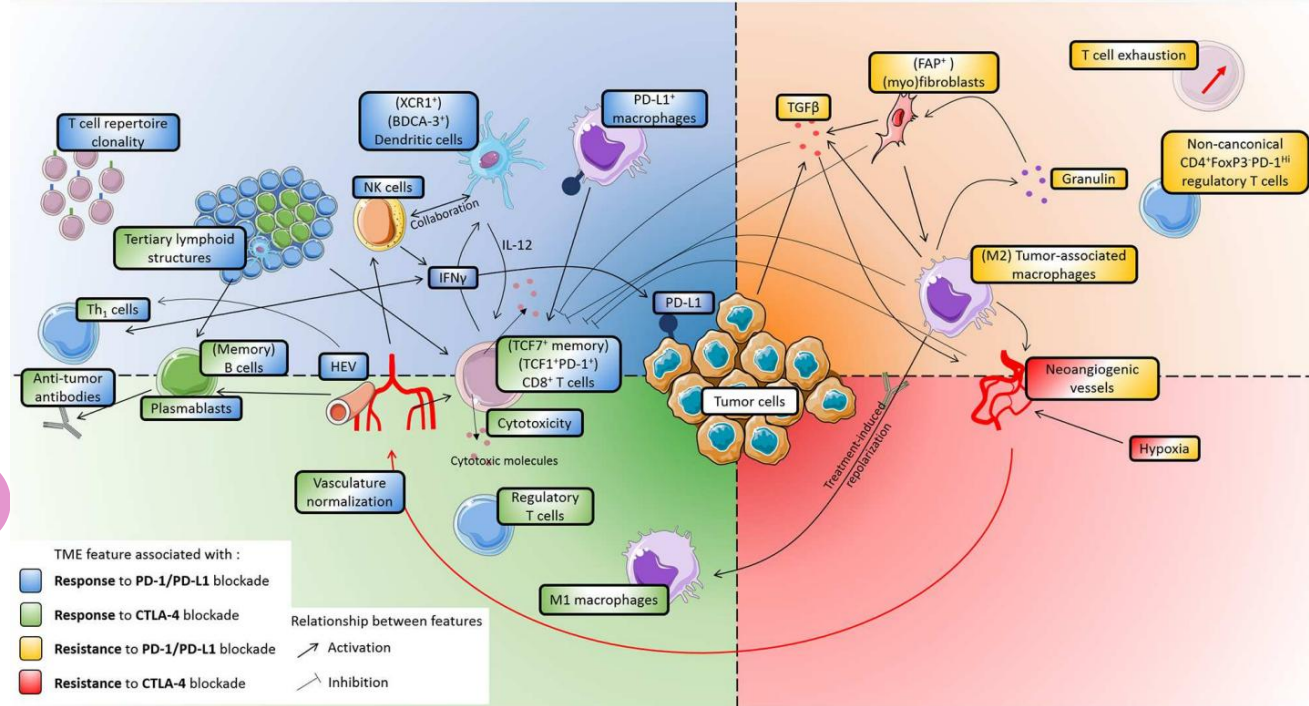
El microambiente tumoral

Un ejemplo claro de la importancia del tejido es el cáncer



El microambiente tumoral

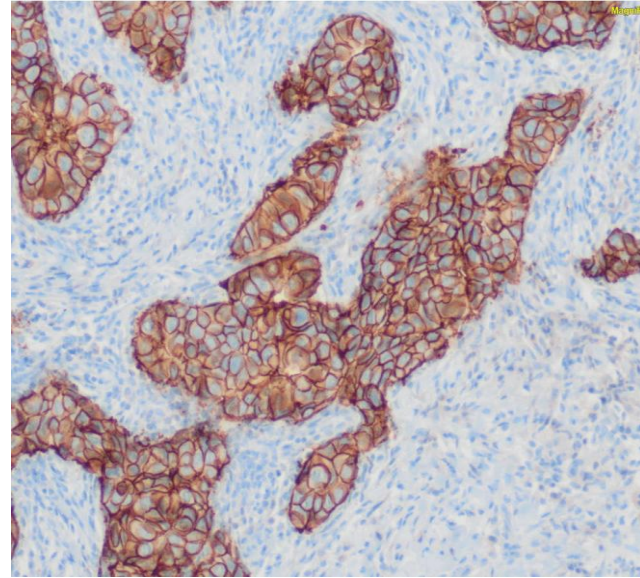
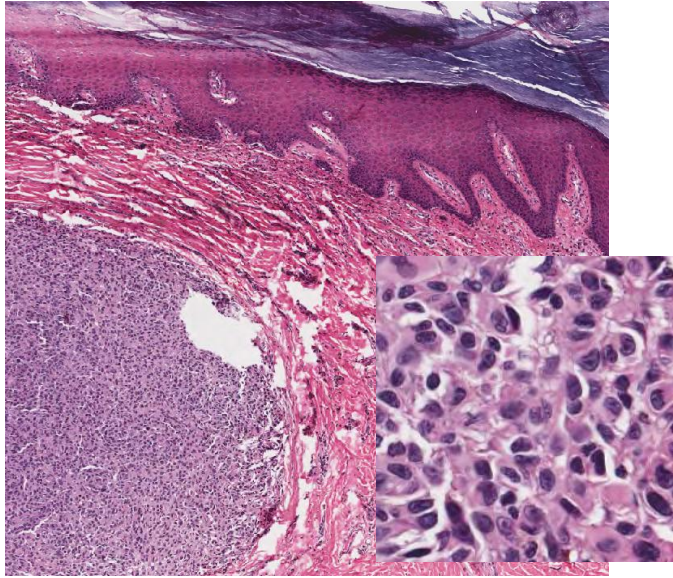
La integración de diferentes elementos en la respuesta a tratamiento



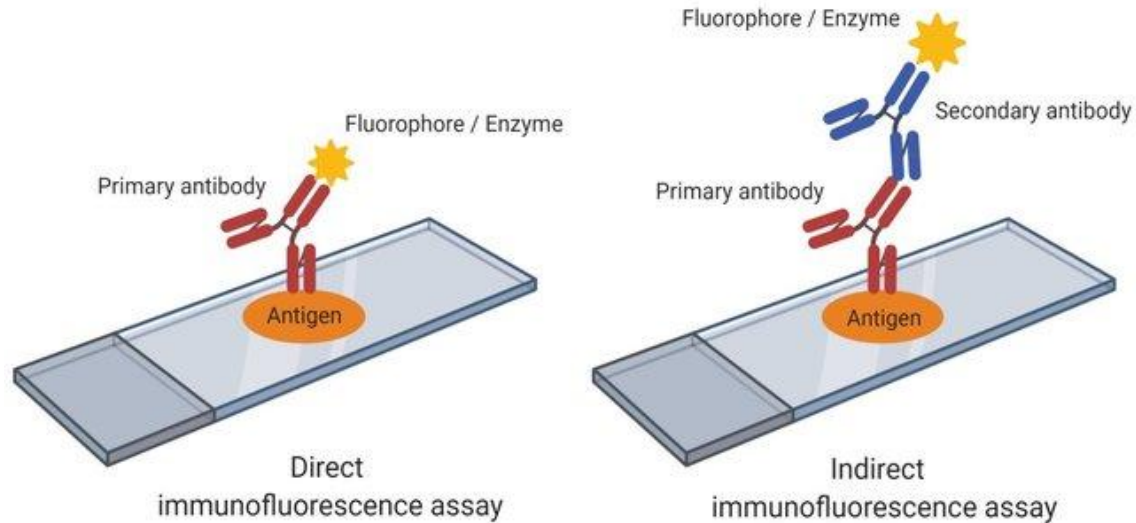
doi: 10.3389/fimmu.2020.00784

La patología clásica

Ha sido y seguirá siendo una de las herramientas más utilizadas en diagnóstico y elección de tratamiento



Fundamentos: Inmunofluorescencia





¿Por qué usar inmunofluorescencia multiplex?

Pregunta de investigación :

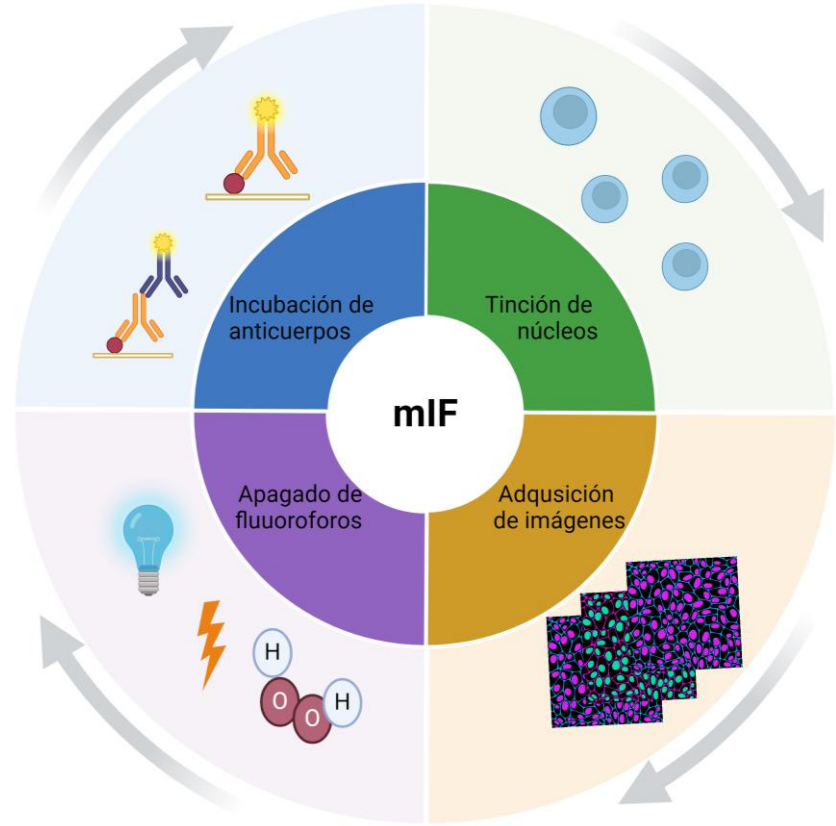
- Fenotipificación compleja
- Caracterización de funcionalidad
- Interacción celular

Muestras limitadas

Inmunofluorescencia multiplex

Técnica que permite generar imágenes multidimensionales de un tejido a través de un proceso iterativo (ciclo).

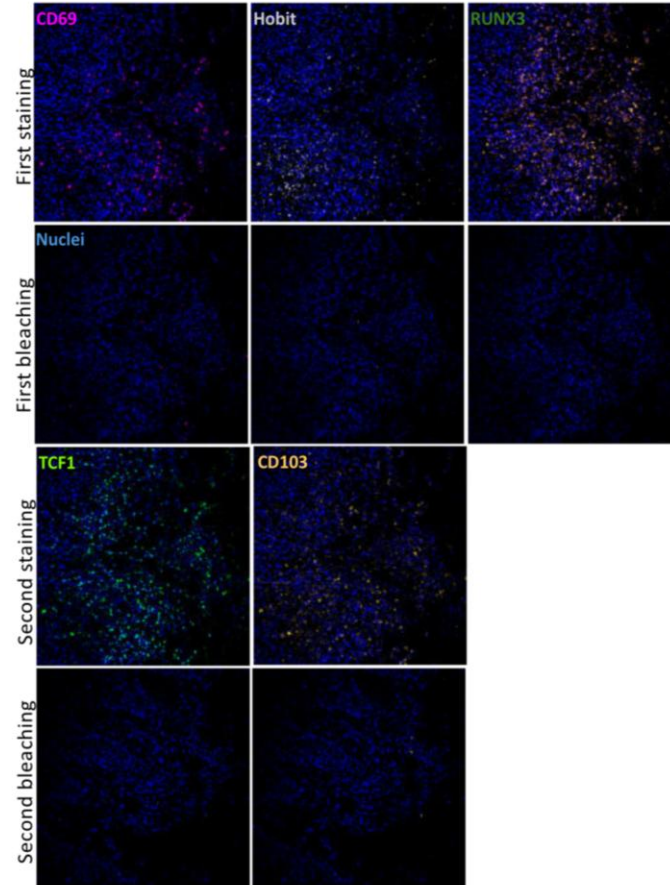
Obtención repetida de imágenes de fluorescencia de baja complejidad que posteriormente se ensamblan en una imagen más compleja



Ejemplo

- Tinción con un ciclo de apagado

A





Highly multiplexed immunofluorescence imaging of human tissues and tumors using t-CyCIF and conventional optical microscopes

tissue-based cyclic immunofluorescence (t-CyCIF)

Jia-Ren Lin^{1,2†}, Benjamin Izar^{1,2,3,4†}, Shu Wang^{1,5}, Clarence Yapp¹, Shaolin Mei^{1,3}, Parin M Shah³, Sandro Santagata^{1,2,6,7}, Peter K Sorger^{1,2*}

¹Laboratory of Systems Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, United States; ²Ludwig Center for Cancer Research at Harvard, Harvard Medical School, Boston, United States; ³Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, United States; ⁴Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, United States; ⁵Harvard Graduate Program in Biophysics, Harvard University, Cambridge, United States; ⁶Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, United States; ⁷Department of Oncologic Pathology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, United States

Protocolo

Desparafinización de
tejido

Recuperación
antigénica y
permeabilización

Incubación con
anticuerpos primarios

Adquisición de
imágenes

Tinción de nucleos

Incubación con
anticuerpos
secundarios

Bleaching

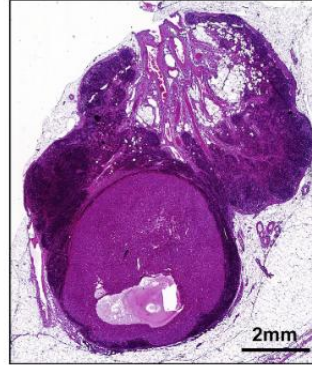
Incubación con
anticuerpos acoplados
y tinción de núcleos



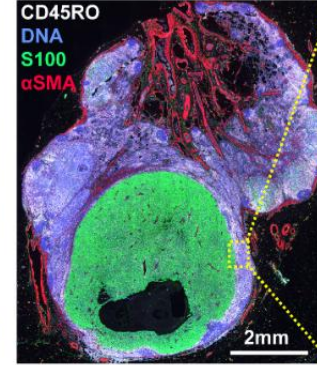
Adquisición de las imágenes

- No requerimos equipo especializado: Confocal, Epifluorescencia
- Imágenes desde especímenes completos hasta microscopia de resolución
- Montaje con PBS 1x Glicerol 10%

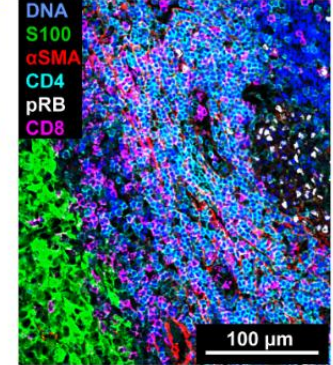
A. White light illumination
H&E staining (9.5 x 11 mm)



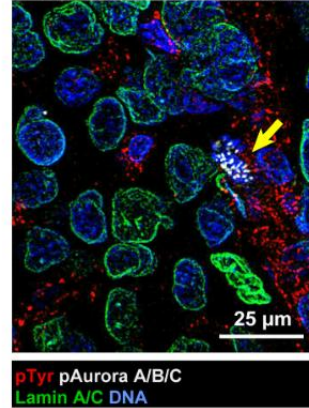
B. Slide scanner
165 stiched 700 x 800 µm fields



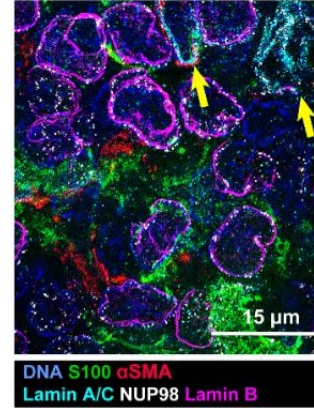
C. Slide scanner
Single Field



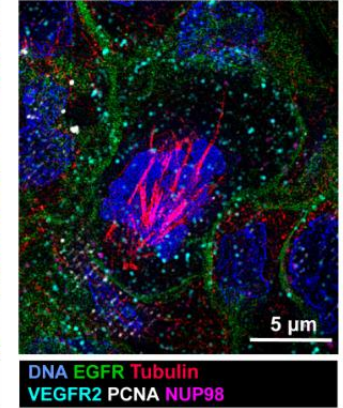
D. 60X 0.95 NA Confocal Image



E. 60X OMX Image



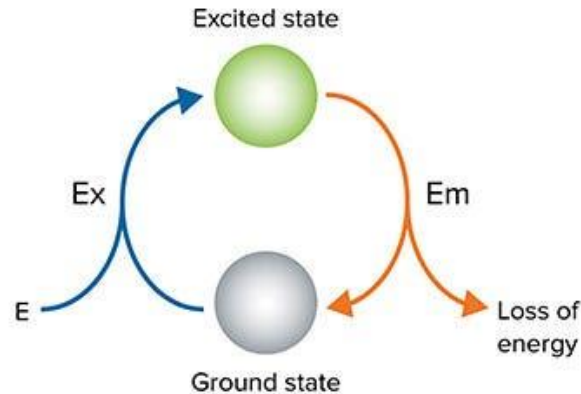
F. 60X OMX Image (Breast Xenograft)



Bleaching de anticuerpos

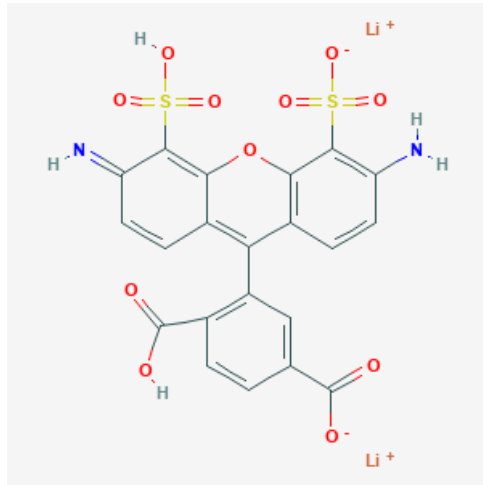
Fluorescencia: fenómeno físico de emisión de luz de una molécula debido a la excitación de sus electrones.

La fluorescencia es la propiedad de algunos átomos y moléculas de absorber luz a una longitud de onda determinada (la excitación: Ex) seguido por la emisión (Em) de luz de corta duración a una longitud de onda más larga.



Bleaching de anticuerpos

El **fotoblanqueamiento** es el proceso por el cual un fluoróforo pierde su capacidad para fluorescer de manera permanente debido a la exposición prolongada a la luz o reacciones químicas que alteran su estructura.



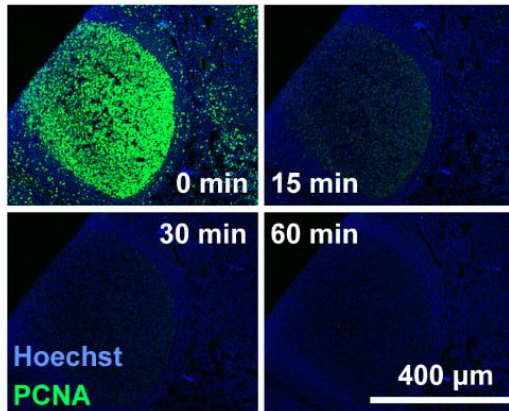
AF488

Luz, medio rico en oxígeno, medio básico

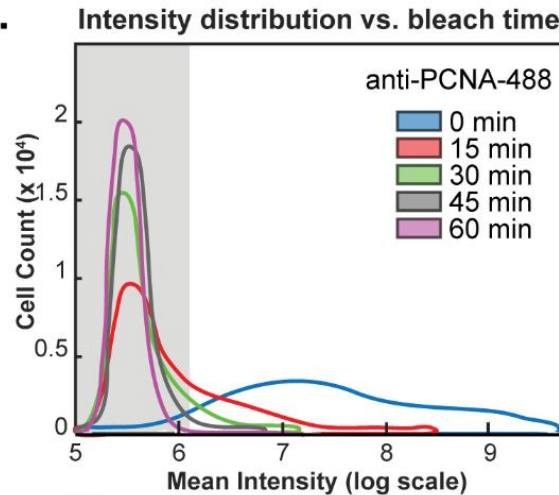
Bleaching de anticuerpos

Solución oxidante H₂O₂ 4.6% y NaOH 24mM en presencia de luz blanca 1h, reduce 102 to 103-fold la fluorescencia

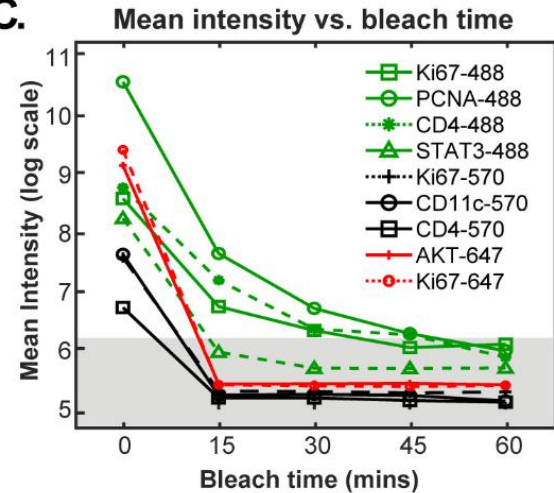
A. Images during bleaching



B.



C.



Bleaching de anticuerpos



Recambio de solución blanqueadora a los 30 minutos.

Paso crítico: Lavados posteriores al bleaching

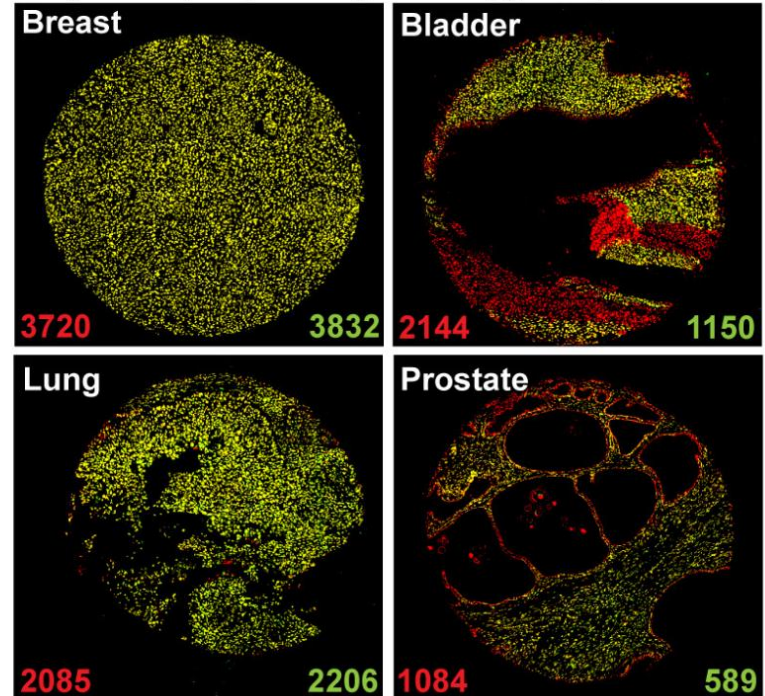
Integridad del tejido

- Robustez es la arquitectura del tejido
- Áreas con baja celularidad pierden núcleos con facilidad
- Tiempo de fijación
- Vejez de los bloques y de las laminillas.

*Piel normal, glioblastomas, cáncer de ovario
melanoma más de 15 ciclos*

Tejidos lábiles buscar reducir la
manipulación del tejido

D. Cycle 1 (red) vs. Cycle 10 (green)





Ventajas y desventajas

En una sola laminilla puedo evaluar una gran cantidad de marcadores

Fácil implementación

Fenotipificación profunda

Requiere más tiempo experimental


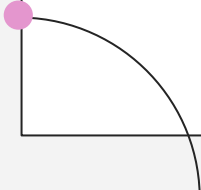
Requiero de anticuerpos acoplados a altas concentraciones \$\$\$

No todas las muestras son candidatas





Consideraciones prácticas

- *También puede aplicarse a cultivo celulares 3% H₂O₂ and 20 mM NaOH*
<https://doi.org/10.1038/ncomms9390>
 - *Asesoramiento patológico es esencial.*
 - *Soluciones frescas.*
 - *Planeación del experimento, tanto paneles como tiempos.*
ej. 12 marcadores llevarían una semana continua de experimento
- 
- 



Diseño de páneles

Estandarización de títulos y bleaching antes de realizar experimento.

La mIF permite utilizar inmunofluorescencia indirecta en un ciclo.

Considerar abundancia del antígeno- Saturación de epítomos y degradación del tejido.



Diseño de paneles EJERCICIO

CD8 CD4 VIMENTINA TUMOR

CD8-raton

CD8-FITC ratón

CD4-AF488 cabra

VIMENTINA-cabra

TUMOR-conejo

CD8-Ratón AF488

CD4-AF488

CD4-AF488

CD8-FITC

Opción 1

Vimentina-cabra AF594

TUMOR-conejo AF647

Opción 2

Vimentina-cabra AF594

TUMOR-conejo AF647

Diseño de paneles EJERCICIO

CD4 Conejo
CD4 AF488-Cabra
CD8 rata

CD8 AF488-Ratón
CD20-APC-Ratón
CD11c-conejo
CD11c-AF594-conejo
HLADR-rata
CD56 cabra
CD68-APC-Ratón
CD66b -PE
TUMOR-conejo
TUMOR-APC-conejo

CD4 CD8 CD20 CD11c HLA-DR CD56 CD68 CD66b TUMOR

CD11c-ConejoAF488

CD8 AF488

CD4 AF488

HLADR-Rata AF594

CD66b-PE

CD56-Cabra AF647

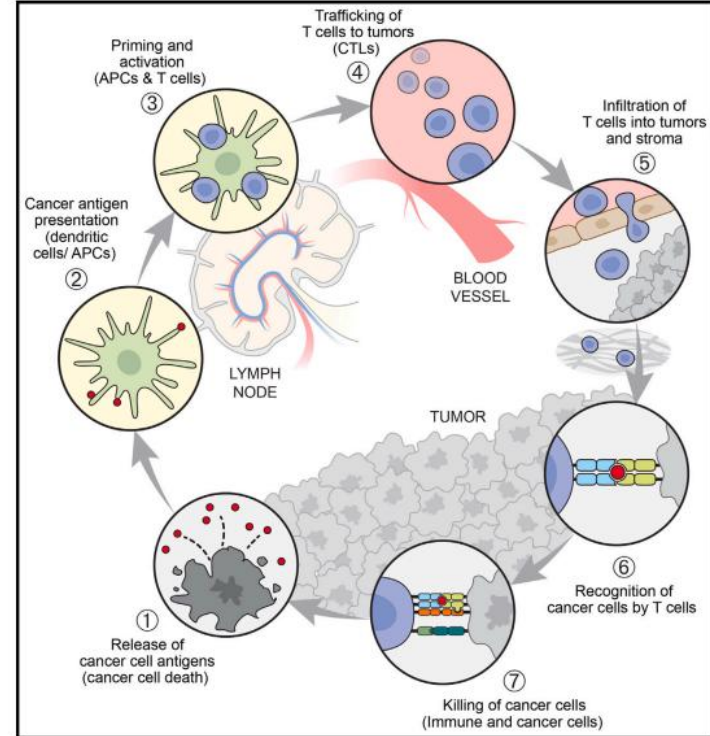
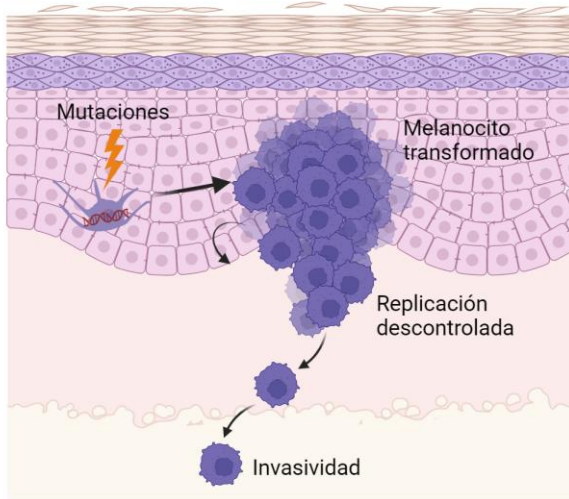
CD68-APC

CD20-APC

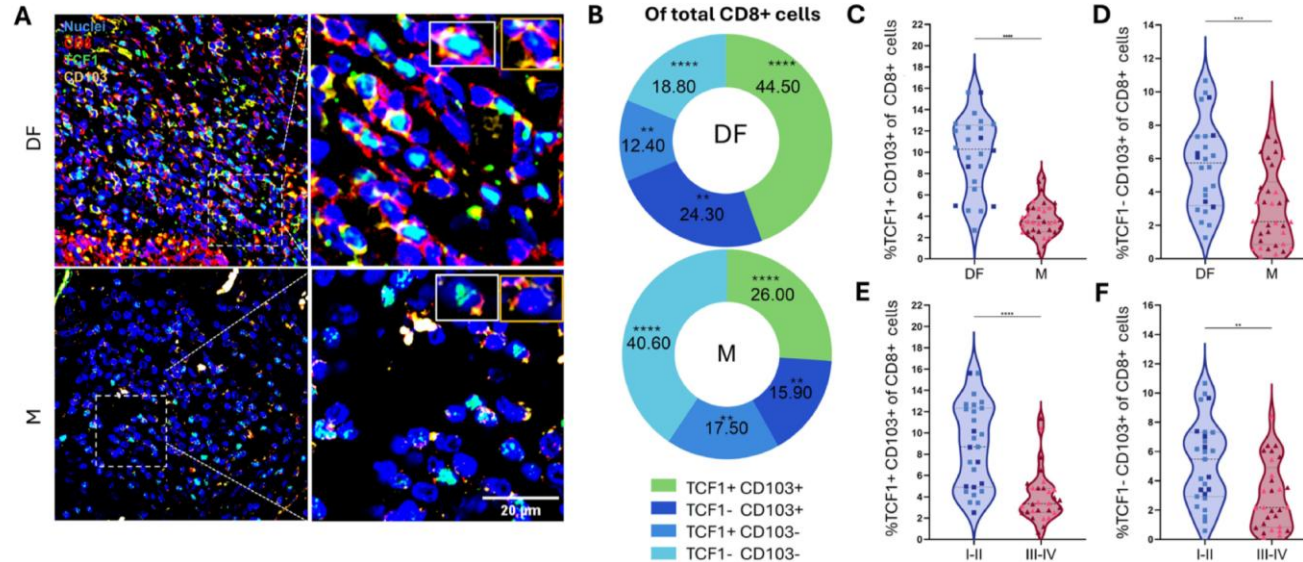
TUMOR-APC

El melanoma es un tumor altamente inmunogénico

B) Melanoma

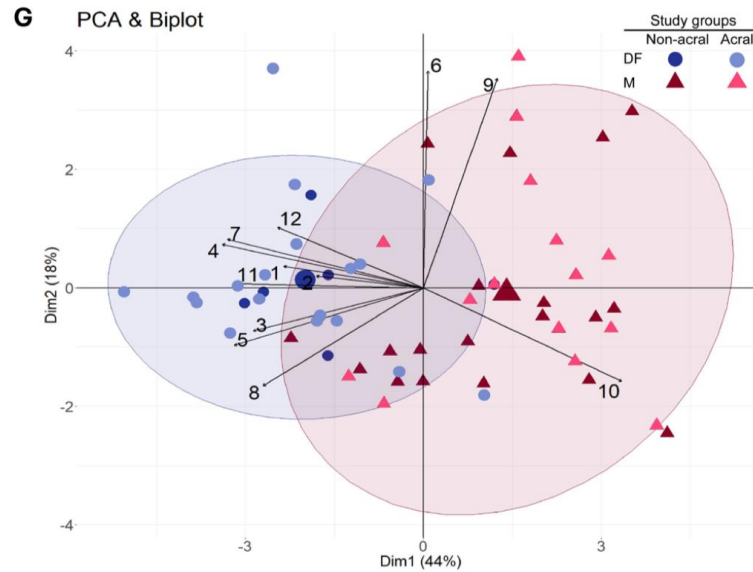


Resultados: análisis grandes

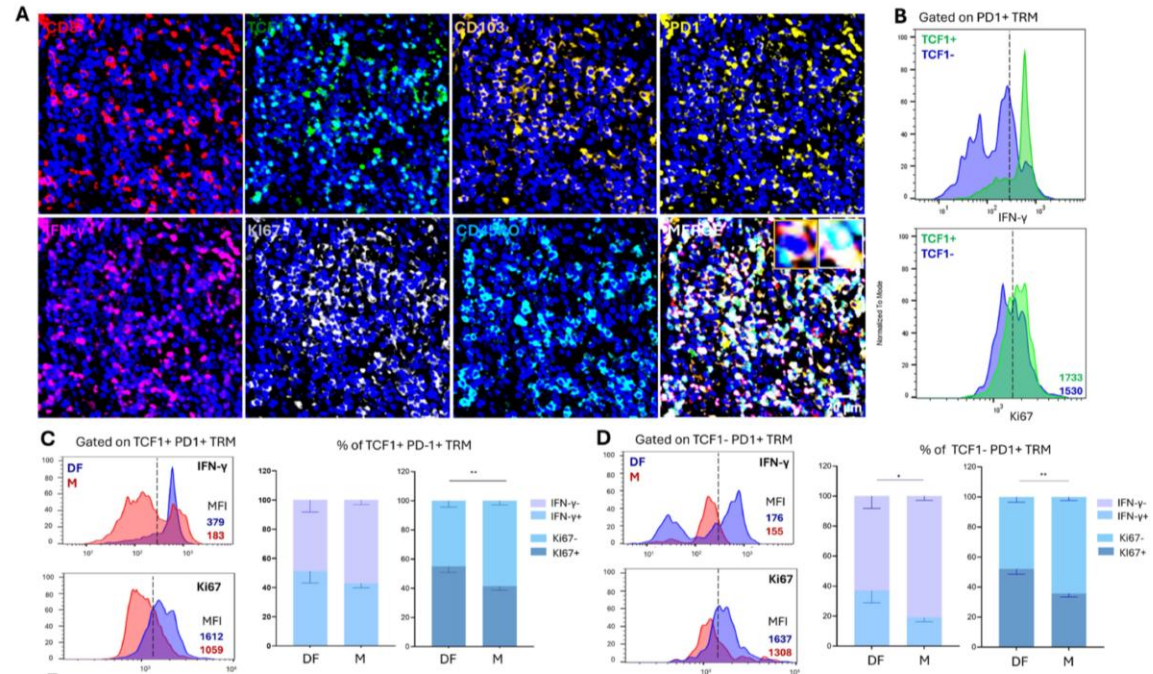


58 px x3= 174 imágenes en 2 horas

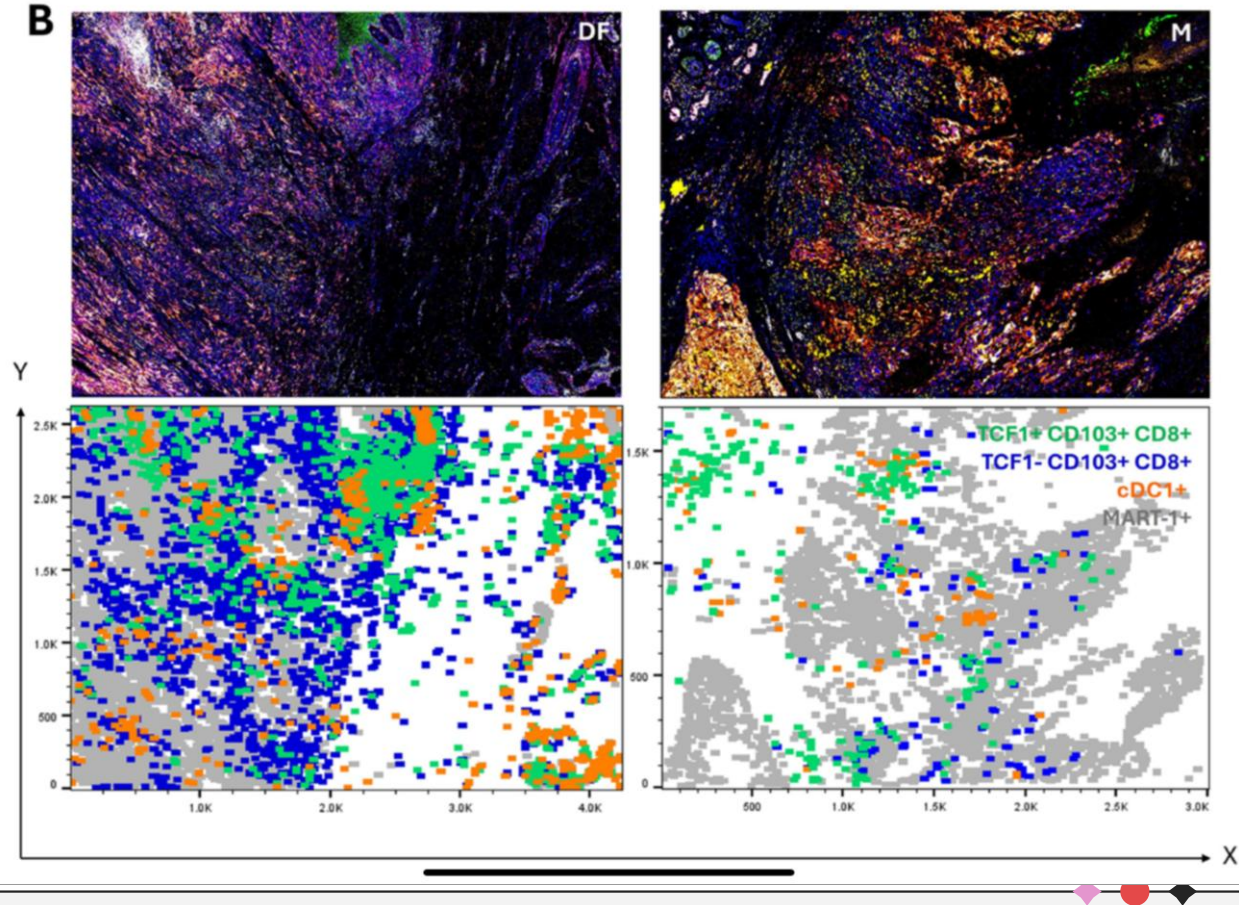
Resultados: construcción de bases de datos



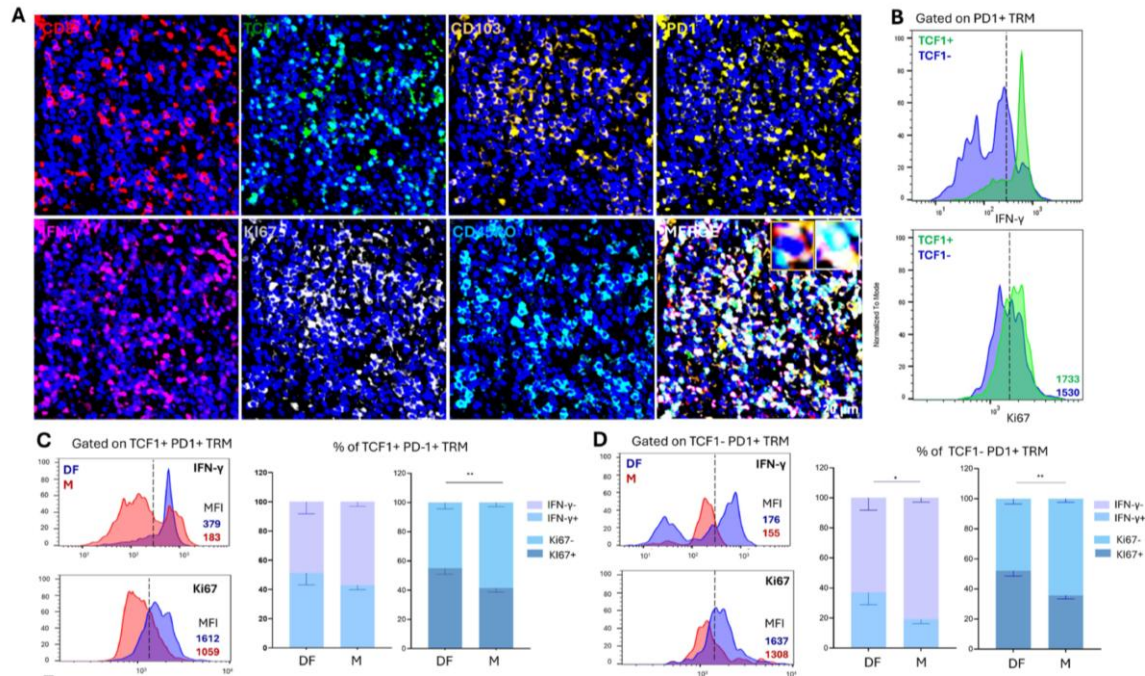
Resultados: evaluación de expresión de marcadores



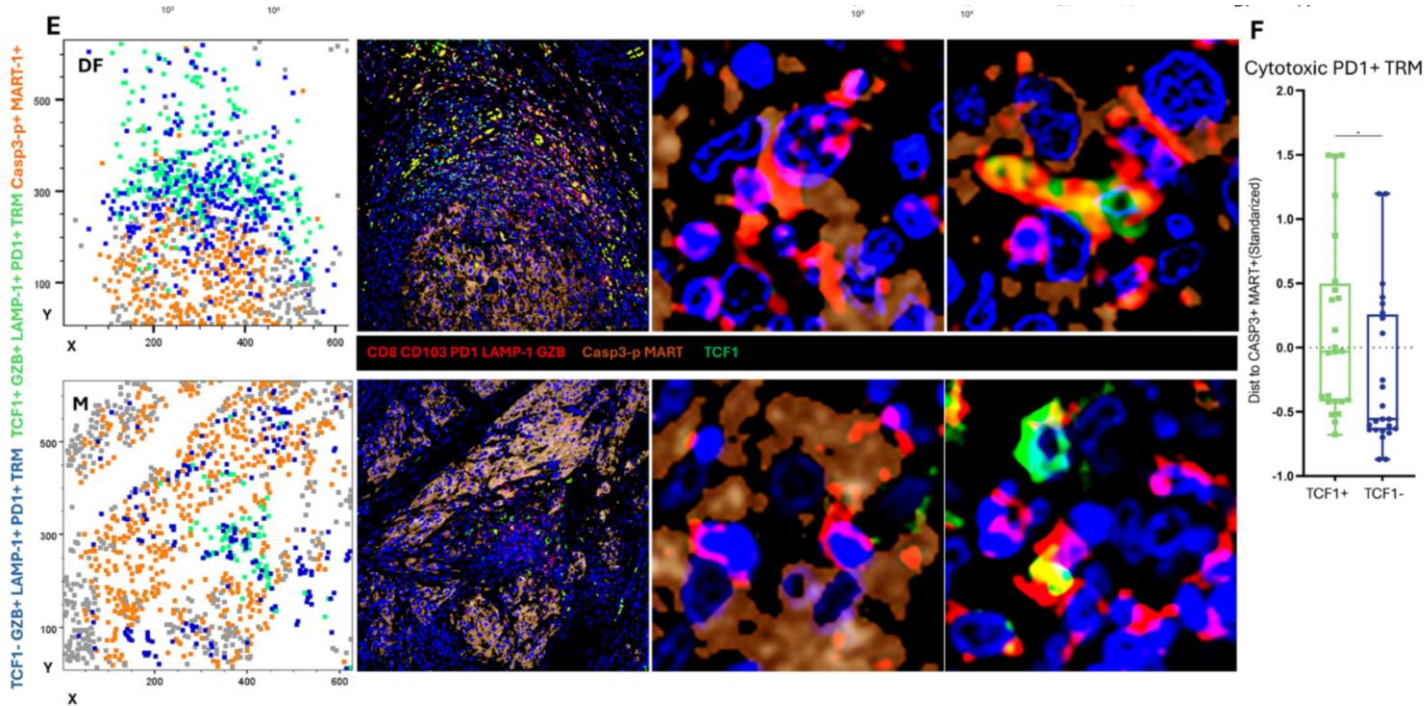
Resultados localización

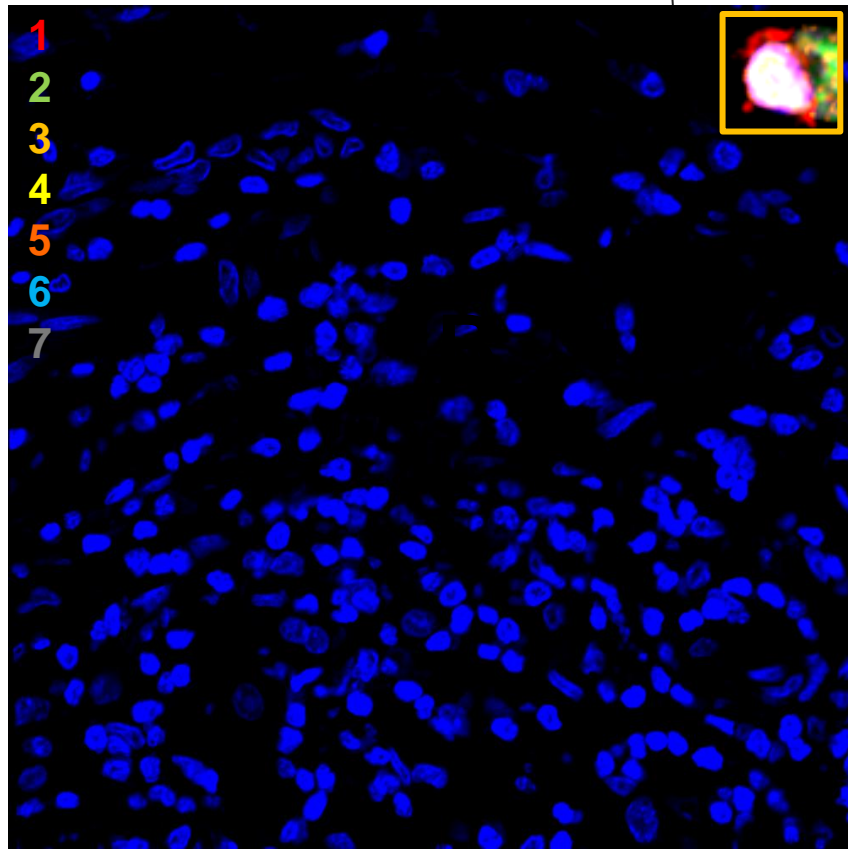


Resultados expresión de marcadores



Resultados evaluación funcional





¿ANÁLISIS?

Sesiones prácticas día 2 y 3



Gracias!

Contacto

sara.g.deleonr@gmail.com

5568745474

