



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Comparación cuantitativa de técnicas de aclarado para la reconstrucción 3D de tejido hepático con resolución celular.



Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Biólogo

Rodrigo Andrés Yañez Cordero

Concepción, Septiembre de 2021



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.



Prof. Guía

Dr. Fabián Segovia Miranda

Prof. Evaluadores

Dra. Teresa Caprile Elola-Olaso

Dr. Fernando Martínez Acuña



Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander

Concepción, Septiembre de 2021

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto FONDECYT REGULAR 2020 (PROYECTO N° 1200965).



INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS.....	6
INDICE DE TABLAS	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCION.....	12
La estructura y función de los distintos tejidos depende de la precisa organización y coordinación de las células que los conforman.....	12
La visualización 3D de los tejidos revela propiedades estructurales que no son observables por técnicas histológicas convencionales	13
El aclaramiento óptico de los tejidos es una técnica que permite observar de secciones gruesas de tejidos preservando complejas estructuras tisulares	16
Existen diversas técnicas de aclaramiento	19
El hígado es un notable modelo de tejido con una compleja estructura 3D	23
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
Objetivos específicos	26
METODOLOGÍA.....	27
Animal.....	27
Fijación	27
Seccionamiento de tejido	28
Preparación de soluciones aclarantes	28
Medición del aclarado de tejido.....	29
Medición de la alteración en el área lineal post aclarado de tejido	31
Tinción.....	31
Imagen de microscopio multifotónico en muestras aclaradas.....	32

Reconstrucción 3D del tejido hepático.....	32
RESULTADOS.....	33
Capacidad de aclaramiento macroscópico	33
Cuantificación de la deformación macroscópica	36
Compatibilidad de las técnicas de aclarado con diversas tinciones de fluorescencia	37
Desempeño de las técnicas de aclarado en rebanadas de tejido hepático usando microscopía multifotón.....	38
Cuantificación de la expansión tisular microscópica a partir de la reconstrucción 3D de tejidos	41
DISCUSION.....	43
CONCLUSIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. (A) Histología tradicional, cortes del tejido en secciones delgadas que se tiñen y se examinan al microscopio. Solo proporciona pequeña información sobre una pequeña parte del tejido disponible, no representando la complejidad y la heterogeneidad (B) Métodos de aclaramiento de tejidos, aclaramiento de tejido, combinado con inmunomarcaje. Las estructuras complejas se conservan y su organización intacta se puede reconstruir y analizar en tres dimensiones. Imagen extraída de (Garvalov & Ertürk, 2017).....13

Figura 2. (A) Representación de la adquisición de matrices de imágenes bidimensionales de tejido hepático a diferentes resoluciones. (B) Reconstrucción de la arquitectura tisular, a la izquierda reconstrucción de un lóbulo hepático. En medio, una reconstrucción a nivel celular del hígado. Y finalmente al lado derecho una reconstrucción de un solo hepatocito. Figura extraída de (Morales-Navarrete et al., 2015).....15

Figura 3. (A) Simulación del flujo de bilis en la geometría 3D del canalículo biliar reconstruido. (B) Mecanismo de entrada de agua en la red de canalículos biliares para el modelo de secreción de líquido osmótico. (C) Predicción de la velocidad de la bilis (negro, eje y izquierdo) y la densidad de afluencia de agua (azul, eje y derecho; unidad: volumen por tiempo y por longitud de canalículos biliares) en la red de canalículos biliares a lo largo del eje vena central y vena porta del modelo de secreción de líquido osmótico. Imagen extraída de (Meyer et al., 2017).....16

Figura 4. Refracción de la luz entre dos medios con diferentes índices de refracción. Este índice se define como el cociente de la velocidad de la luz cuando pasa a través de dos medios, generando una refracción de la onda, al atravesar de un medio 1 a un medio 2 con velocidad de propagación de la luz diferente.....18

Figura 5. Diagrama de un lobulillo hepático (Ross & Pawlina, 2007).....25

Figura 6. Metodología de la cuantificación de la transparencia en tejido hepático de ratón de un grosor de 200 μm . A) medición del valor gris fuera del tejido, teniendo en cuenta los valores I0 y I1. B) medición del valor gris al interior del tejido post aclaramiento teniendo en cuenta los valores I0 y I1.....30

Figura 7. (A) Delimitación del área lineal en muestra de tejido hepático pre aplicada la técnica de aclaramiento para posterior medición del área lineal. (B) Delimitación del área lineal en muestra de tejido hepático post aplicada la técnica de aclaramiento para posterior medición del área lineal.....31

Figura 8. Resumen temporal de las técnicas de aclarado FOCM, RTF, SeeDB2G, SeeDB y FRUIT.....34

Figura 9. Imagen comparativa de técnicas de aclarado pre y post aclarado, en tejido hepático de ratón con grosores de 200 µm, 400 µm y 1mm de grosor, visualizados en una grilla de 10 x 10 mm por recuadro.....34

Figura 10. Cuantificación de la transparencia de tejidos a través de la ecuación $\Delta (I_0 - I_1)T / \Delta (I_0 - I_1)E$ normalizada (AU) post aplicada las técnicas de aclaramiento en tejido hepático de 200 µm de grosor. Donde cada marca dentro del gráfico corresponde al de $\Delta (I_0 - I_1)T / \Delta (I_0 - I_1)E$ de tres intensidades de gris entre líneas y las barras corresponden al promedio de estos valores. En cuanto al eje Y el valor 0.0 representa el tejido hepático sin tratamiento de aclarado. Mientras aumenta el valor, mayor es la capacidad de transparencia de la técnica de aclarado. Valor de 1 en el eje Y corresponde a 100% de transparencia.....35

Figura 11. Comparación de la deformación del área lineal post aclaramiento. Donde las circunferencias representan los cortes de 200 µm- 400 µm- 1mm y las barras corresponden al promedio de la expansión lineal normalizada (AU) entre los cortes de tejido hepático de ratón. En cuanto a la expansión lineal normalizada (AU) (eje Y) el valor 1.0 equivale a que no hubo una deformación en el tejido, sobre este valor el tejido presenta una expansión y bajo 1.0 representa una contracción en el tejido.....36

Figura 12. Compatibilidad de tinciones (Faloidina, CD13, Flk-1 y DAPI) con técnicas de aclarado (FOCM, FRUIT, SeeDB, SeeDB2G y RTF) y control (PBS) en tejido de ratón con un grosor de 100 µm. Se representó la compatibilidad de las tinciones de mayor (++++) a menor (+) y nula (-).....38

Figura 13. Curva de calibración TDE. Representación de diversos índices de refracción dependiendo de la concentración de TDE.....39

Figura 14. Vista ortogonal (x-z) obtenida de cortes de hígado de ratón (100 µm de grosor). Se puede observar la profundidad de tinción con anticuerpo primario CD13 (canalículos biliares) en tejido post aplicada la técnica de aclarado en cortes de 100 µm. Para el caso del PBS, solo se logró tomar una imagen hasta los 30 µm debido a que al no aplicarse una técnica de aclarado no se lograba llegar más profundo en el tejido.....40

Figura 15. Diferencia del volumen del radio de los canalículos biliares para todas las condiciones. (A) PBS/FOCM. (B) PBS/FRUIT. (C)PBS/SeeDB. (D) PBS/RTF. (E) PBS/SeeDB2G. (F) grafico que representa el promedio \pm SEM del radio de los canalículos biliares, siendo 2.0 el tamaño original del radio obtenido por el PBS, sobre este valor se ve reflejado una expansión de la estructura y bajo este valor una contracción.....42



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Índices de refracción de los diversos componentes celulares (Costa et al., 2019).....	18
Tabla 2. Tabla resumen de diversidad de técnicas basados en solventes orgánicos. * Compatibilidad con Dil, grupo de colorantes que son compatibles con los lípidos presentes en los tejidos.....	20
Tabla 3. Tabla resumen de diversidad de técnicas a base acuosa. * Compatibilidad con Dil, grupo de colorantes que son compatibles con los lípidos presentes en los tejidos.....	22
Tabla 4. Resumen de diversidad de técnicas basados en inclusión de hidrogel...	23
Tabla 5. Concentraciones de TDE por técnica de aclaramiento.....	39
Tabla 6. Profundidad de tinción con anticuerpo primario CD13 (canalículos biliares) en tejido post aplicada las técnicas de aclarado, en cortes de 100 µm.....	41



RESUMEN

Los órganos son unidades funcionales compuestas por distintos tipos de tejidos, los cuales se forman a través de agrupaciones de células que de manera coordinada toman configuraciones naturalmente tridimensionales (3D). Para lograr comprender de mejor forma estas estructuras, se utiliza microscopía volumétrica, la cual a su vez depende del nivel de transparencia de los tejidos, lograda a través de técnicas de aclaramiento óptico. Existe una gran variedad de técnicas de aclaramiento, todas tienen como objetivo homogeneizar los índices de refracción en los diferentes compartimientos celulares, pero difieren en cuanto a los niveles de compatibilidad con tinciones fluorescentes y a la deformidad que producen en los tejidos. En este trabajo buscamos implementar y comparar distintas técnicas de aclaramiento (SeeDB-SeeDB2G-RTF-FOCM-FRUIT) utilizando tejido hepático de ratón como modelo. SeeDB y FOCM produjeron las menores alteraciones morfométricas tanto a nivel macro como micrométrico. Mientras todos los aclaramientos mostraron compatibilidad con tinciones mediadas por anticuerpos, solo algunos tuvieron buen desempeño con moléculas fluorescentes pequeñas como el DAPI. Solo SeeDB mostró compatibilidad con todos los colorantes estudiados. La elección de la correcta técnica de aclaramiento tiene un impacto directo en la adquisición de imágenes por microscopía volumétrica y la generación de reconstrucciones 3D, facilitando así el entendimiento de tejidos como el hígado, el cual presenta una organización 3D compleja.

Palabras claves: Biología Celular, Aclaramiento de Tejidos, Microscopia Multifotónica.

ABSTRACT

Organs are functional units composed of different types of tissues, which are formed through groupings of cells that in a coordinated manner take on naturally three-dimensional (3D) configurations. To better understand these structures, volumetric microscopy is used, which in turn depends on the level of transparency of the tissues, achieved through optical clearing techniques. There is a wide variety of clearance techniques, all of which aim to homogenize the refractive indices in the different cell compartments, but they differ in terms of the levels of compatibility with fluorescent stains and the deformity they produce in the tissues. In this work we seek to implement and compare different clearance techniques (SeeDB-SeeDB2G-RTF-FOCM-FRUIT) using mouse liver tissue as a model. SeeDB and FOCM produced the least morphometric alterations both at the macro and micrometric level. While all the clearances showed compatibility with antibody-mediated stains, only some performed well with small fluorescent molecules such as DAPI. Only SeeDB showed compatibility with all the dyes studied. The choice of the correct whitening technique has a direct impact on the acquisition of images by volumetric microscopy and the generation of 3D reconstructions, thus facilitating the understanding of tissues such as the liver, which presents a complex 3D organization.

Keywords: Cell Biology, Tissue Clearance, Multiphoton Microscopy.

INTRODUCCION

La estructura y función de los distintos tejidos depende de la precisa organización y coordinación de las células que los conforman

Los órganos son unidades funcionales compuestas por distintos tipos de tejidos, los cuales se forman a través de agrupaciones de células que están adheridas a la matriz extracelular producida por estas mismas (Bruel et al. 2015). Las células que conforman a los tejidos pueden ser identificadas tanto por sus funciones específicas como por sus características morfológicas. En este ámbito, la histología ha jugado un papel fundamental, al permitir observar las estructuras microscópicas de los tejidos y órganos del cuerpo, contribuyendo así a describir tanto la organización como la función celular (Ross & Pawlina 2007). Para lograr esto, la histología se basa en realizar cortes delgados del tejido biológico para lograr reducir la dispersión de la luz (fenómeno que genera que el tejido sea ópticamente opaco) y así facilitar la obtención de información respecto a la morfología tisular (Garvalov & Ertürk, 2017). Luego, con la ayuda de tinciones, se logra aumentar el contraste entre los elementos tisulares presentes, permitiendo la capacidad de diferenciar entre estos elementos (Salazar & Moreno, 2016). A pesar de la gran utilidad que tienen las técnicas histológicas tradicionales, también presentan algunas desventajas debido a su subjetividad (dependen de las habilidades del observador), a menudo son semicuantitativas y solo proporciona información bidimensional (2D). Esto último, puede presentar una problemática ya que algunas estructuras en los tejidos biológicos son naturalmente tridimensionales (3D) (Segovia-Miranda et al., 2019; Tian et al., 2020) ej. estructuras tubulares como vasos sanguíneos (Fig. 1). En la actualidad un número creciente de estudios han destacado la importancia de considerar la información 3D para el examen histopatológico de los tejidos, y así comprenderlos de mejor forma (Garvalov & Ertürk, 2017; Segovia-Miranda et al., 2019).

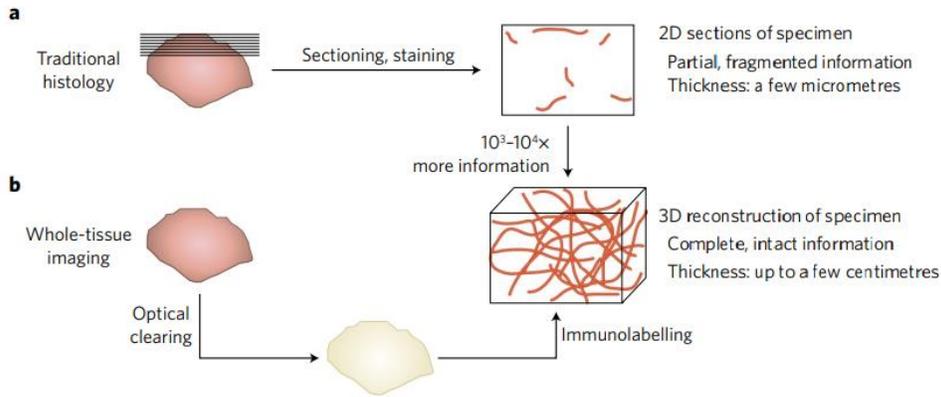


Figura 1. (A) Histología tradicional, cortes del tejido en secciones delgadas que se tiñen y se examinan al microscopio. Solo proporciona pequeña información sobre una pequeña parte del tejido disponible, no representando la complejidad y la heterogeneidad (B) Métodos de aclaramiento de tejidos, aclaramiento de tejido, combinado con inmunomarcado. Las estructuras complejas se conservan y su organización intacta se puede reconstruir y analizar en tres dimensiones. Imagen extraída de (Garvalov & Ertürk, 2017).

La visualización 3D de los tejidos revela propiedades estructurales que no son observables por técnicas histológicas convencionales

La extracción de información estructural y molecular detallada de los sistemas biológicos intactos ha sido durante mucho tiempo un desafío fundamental en todos los campos de investigación (Chung et al., 2013) y en los últimos años, técnicas como la de aclaramiento de tejidos, han permitido obtener imágenes volumétricas de alta resolución (Tian et al., 2020). Este tipo de técnicas son de ayuda en el desafío de la comprensión de las estructuras y funciones de los tejidos, obteniendo información 3D precisa y cuantitativa, que permite 1) la descripción morfológica de estructuras tisulares que solo pueden ser observadas en 3D (Fig. 1) y 2) la extracción de datos morfométricos que puedan ser utilizados para el desarrollo de modelos funcionales que describen el comportamiento de los sistemas biológicos (Morales-Navarrete et al., 2015).

1) Las técnicas histológicas convencionales, a pesar de su gran utilidad, solo pueden detectar fragmentos de las estructuras de los tejidos, perdiéndose así

mucha información morfológica y cuantitativa. Por esta razón existe una tendencia creciente a indagar acerca de las estructuras 3D, las que permiten visualizar los componentes completos de los tejidos (Fig. 1) (Garvalov & Ertürk, 2017; Richardson & Lichtman, 2015). La observación 3D de los tejidos permite estudiar con mayor precisión las diferentes propiedades de estos, permitiendo visualizar características morfológicas en grandes dimensiones, y a su vez, en gran detalle. Es posible describir la organización del micro-ambiente celular, interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Costa et al., 2019). Un ejemplo que se podría citar, es el estudio de los circuitos neuronales en el sistema nervioso, donde cientos de distintos tipos de células forman circuitos y redes neuronales, siendo la organización de estas extremadamente difícil de entender en 2D (Ueda et al., 2020). De igual manera, la información 3D tisular ha mostrado ser de gran ayuda en el área diagnóstica, donde se ha demostrado como mejora la precisión del análisis histopatológico en biopsias tumorales, al reducir los errores de diagnóstico provenientes de la variabilidad morfológica producida al trabajar con cortes delgados histológicos (Garvalov & Ertürk, 2017; Tanaka et al., 2017). Así mismo, Hägerling et al., 2017 reafirma la importancia de la información volumétrica para el caso de los vasos sanguíneos y linfáticos, ya que permite la extracción de parámetros en cuanto a la forma y a la conectividad de estos. Con la información 3D obtenida se pueden cuantificar características morfológicas como la distancia entre los puntos de ramificación de los vasos y el volumen o la longitud promedio de los segmentos de los vasos sanguíneos.

2) Para analizar y desarrollar modelos matemáticos funcionales que describen como un sistema biológico podría desempeñarse en base a la teoría, son necesarios una serie de pasos. Primero, se requiere de programas computacionales que combinan una serie de algoritmos para analizar imágenes y reconstruir las diferentes estructuras tisulares en 3D (Morales-Navarrete et al., 2015) (Fig. 2). A partir de una reconstrucción 3D, se pueden extraer datos morfométricos (ej. volumen, distancia, radio, etc) los cuales alimentan a los modelos computacionales predictivos donde se aplican los principios comunes de

la física, para lograr estimar parámetros fisiológicos que no pueden medirse directamente a nivel tisular. Un ejemplo es el modelo predictivo de la presión intracanalicular en el tejido hepático, donde no existe la tecnología para medir este parámetro directamente (Klingenberg et al., 2017). Meyer et al. (2017), desarrollaron un modelo predictivo, basado en información morfométrica extraída de reconstrucciones 3D del tejido, que simula propiedades dinámicas de fluidos con el fin de caracterizar enfermedades hepáticas y estimar cuantitativamente el transporte biliar en caso de lesión hepática inducida por fármacos (Fig. 3). Este modelo también ha sido base para dilucidar el flujo biliar a través de reconstrucciones de tejido humano en distintos estadios de la enfermedad de hígado graso (Segovia-Miranda et al., 2019)

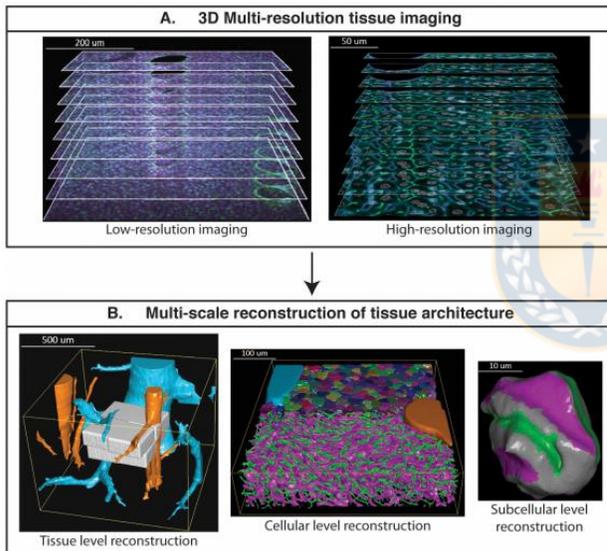


Figura 2. (A) Representación de la adquisición de matrices de imágenes bidimensionales de tejido hepático a diferentes resoluciones. (B) Reconstrucción de la arquitectura tisular, a la izquierda reconstrucción de un lóbulo hepático. En medio, una reconstrucción a nivel celular del hígado. Y finalmente al lado derecho una reconstrucción de un solo hepatocito. Figura extraída de (Morales-Navarrete et al., 2015)

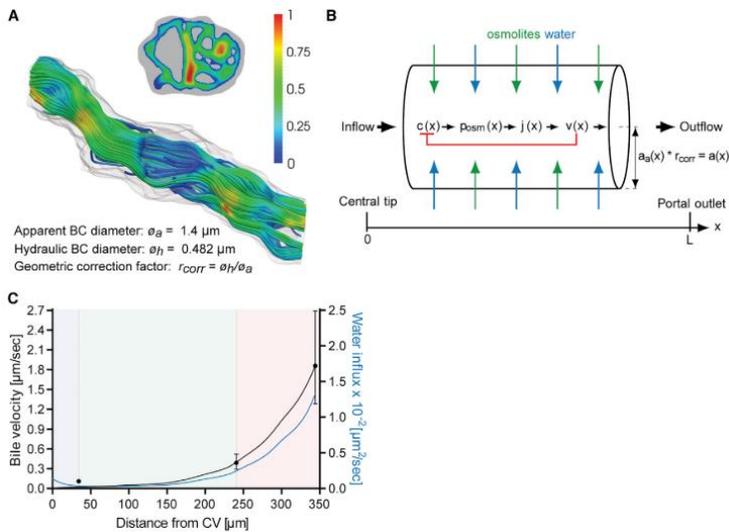


Figura 3. (A) Simulación del flujo de bilis en la geometría 3D del canalículo biliar reconstruido. (B) Mecanismo de entrada de agua en la red de canalículos biliares para el modelo de secreción de líquido osmótico. (C) Predicción de la velocidad de la bilis (negro, eje y izquierdo) y la densidad de afluencia de agua (azul, eje y derecho; unidad: volumen por tiempo y por longitud de canalículos biliares) en la red de canalículos biliares a lo largo del eje vena central y vena porta del modelo de secreción de líquido osmótico. Imagen extraída de (Meyer et al., 2017)

El aclaramiento óptico de los tejidos es una técnica que permite observar de secciones gruesas de tejidos preservando complejas estructuras tisulares

¿Cómo podemos obtener información volumétrica de los tejidos de manera que podamos reconstruirlos en 3D?. Diversas técnicas han sido utilizadas con el fin de obtener representaciones volumétricas de los tejidos. Por ejemplo, se pueden obtener secciones finas y seriadas, las cuales se tiñen y se toman imágenes para finalmente ser unidas con la ayuda de programas computacionales especializados (Oh et al., 2014; Yamaguchi et al., 2021). Sin embargo, esta técnica presenta varias dificultades ya que las secciones individuales de tejido pueden romperse, plegarse, comprimirse o estirarse debido a cortes imperfectos, causando que la reconstrucción volumétrica final sea insatisfactoria (Richardson & Lichtman, 2015). Otra opción para visualizar muestras de tejido en 3D, son técnicas de imágenes no invasivas, como la tomografía computarizada, la resonancia magnética y la

tomografía por emisión de positrones, que permiten la visualización 3D de estructuras anatómicas en organismos vivos, no obstante, estas técnicas tienen resoluciones limitadas que son insuficientes para extraer las propiedades de las células individuales (Ueda et al., 2020).

Una solución prometedora para estas limitaciones, son las técnicas de aclaramiento de tejidos, las cuales permiten el registro de secciones gruesas de tejido a través de microscopía de fluorescencia (Ej. microscopía confocal, 2-fotones y hoja de luz). El mayor obstáculo que estas técnicas buscan es superar la dispersión y absorción de luz que se da por lípidos, organelos y grandes grupos de proteínas en el tejido, lo cuales presentan una gran heterogeneidad en los índices de refracción (IR) (Fig. 4) (Tabla 1). La heterogeneidad de IR provoca dispersión de la luz dentro de los tejidos biológicos (J. Huang et al., 2019). Esta dispersión limita la penetración de la luz visible e infrarroja cercana, provocando que la imagen se vuelve borrosa y que tanto la resolución de la imagen como el contraste disminuyen a medida que la luz se propaga más profundamente en el tejido (Tian et al., 2020; Tuchin, 2005; D. Zhu et al., 2013). Por esto, los métodos de aclaramiento de tejidos tienen como objetivo homogeneizar los IR en diferentes compartimentos celulares, en respuesta a agentes químicos, remplazando, modificando y/o eliminando partes del conjunto celular, generando una reducción en la dispersión de la luz y el aumento de la claridad óptica (Garvalov & Ertürk, 2017; K. Huang, 2020; Rylander et al., 2006).

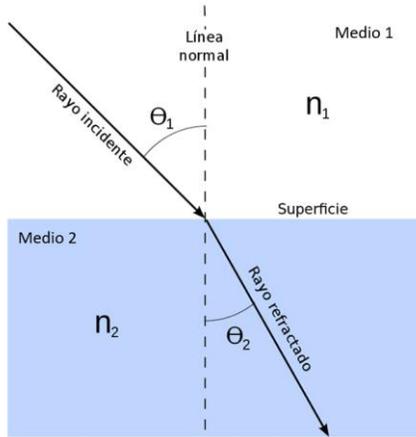


Figura 4. Refracción de la luz entre dos medios con diferentes índices de refracción. Este índice se define como el cociente de la velocidad de la luz cuando pasa a través de dos medios, generando una refracción de la onda, al atravesar de un medio 1 a un medio 2 con velocidad de propagación de la luz diferente.

Tabla 1. Índices de refracción de los diversos componentes celulares (Costa et al., 2019).

Componentes celulares	Índice de refracción
Membrana celular	1.46
Citoplasma	1.36 – 1.39
ADN	1.44
Lípidos	1.39 – 1.48
Lisosoma	1.6
Mitocondria	1.36 – 1.42
Núcleo	1.36 – 1.39
Proteínas	1.38 – 1.43
Agua	1.33
Organelos	1.33 – 1.35

Existen diversas técnicas de aclaramiento

El procedimiento de aclaramiento óptico fue estudiado por primera vez por W. Spalteholz en 1914, para utilizarlo en piel, con fines anatómicos. Posteriormente Tuchin estudió el aclaramiento óptico con la técnica de inmersión tisular en 1997 (Lai et al., 2021). A pesar de que las primeras técnicas fueron descritas hace varios años, este campo de investigación dejó de desarrollarse debido a que no existían microscopios con la tecnología requerida para obtener las imágenes ni el poder computacional para el análisis de las imágenes (Yamaguchi et al., 2021). Durante las últimas décadas, gracias a los avances tecnológicos en estas áreas, ha habido un resurgimiento de las técnicas de aclaramiento óptico, generándose un gran número de técnicas que han permitido estudiar una gran variedad de tejidos (Richardson & Lichtman, 2015).

De acuerdo a su principal modo de acción, las técnicas de aclaramiento se pueden clasificar en tres categorías: (1) a base de solventes orgánicos, (2) a base de agua y (3) con inclusión de hidrogel (Tian et al., 2020). En el caso de protocolos basados de solventes orgánicos, las muestras se deshidratan aumentando las concentraciones de un disolvente orgánico miscible en agua (ej. metanol, etanol) que elimina simultáneamente los lípidos, esto seguido por, el emparejamiento de IR y la deslipidación adicional se logra mediante un solvente orgánico no miscible en agua (Avilov, 2021). Estas técnicas funcionan en varios tipos de tejidos, logrando los más altos niveles de transparencia entre las 3 categorías de aclarado óptico. Sin embargo, la naturaleza tóxica de muchos disolventes, la capacidad de disolver los pegamentos utilizados en la construcción de lentes de objetivos, la contracción sustancial del tejido durante la deshidratación (hasta un 50%) y la extinción de las emisiones de las proteínas fluorescentes reducen su utilidad (Qi et al., 2019; Richardson & Lichtman, 2015) (Tabla 2).

Tabla 2. Tabla resumen de diversidad de técnicas basados en solventes orgánicos. * Compatibilidad con Dil, grupo de colorantes que son compatibles con los lípidos presentes en los tejidos.

Técnicas	Tiempo de aclarado	Compatibilidad con Dil *	Modificación de tejidos	Toxicidad	Referencias
BABB	10 días	No	contracción	Si	(Dodt et al., 2007)
3DISCO	3 días	No	contracción	Si	(Ertürk et al., 2012)
FDISCO	3-4 días	No	contracción	Si	(Qi et al., 2019)
sDISCO	4 días	No	contracción	Si	(Hahn et al., 2019)
uDISCO	3-4 días	No	contracción	Si	(Pan et al., 2016)
PEGASOS	2 semanas	No	contracción	Si	(Jing et al., 2018)
iDISCO	4 días	No	contracción	Si	(Renier et al., 2014)
vDISCO	4 días	No	contracción	Si	(Cai et al., 2019)

Las técnicas a base de agua son relativamente simples, seguras y amigables para las proteínas fluorescentes (Tian et al., 2020). Donde las muestras biológicas se aclaran gradualmente sumergiéndolas en soluciones acuosas que tienen un alto IR, debido a la presión osmótica que generan, el contenido de agua en la muestra (que tiene un IR bajo $\approx 1,33$) se reemplaza pasivamente por la solución de aclaramiento, generando que el IR promedio de la muestra se homogenice cercano a 1,4-1,5, coincidiendo con los IR que presentan las proteínas (RI $\approx 1,43$)

y los lípidos ($RI \approx 1,44$) (Costa et al., 2019). Aun cuando estas técnicas de aclarado no logran un aclaramiento tan bueno como lo son los solventes orgánicos, presentan características favorables, son fáciles de implementar, la modificación del tejido es baja (en su mayoría), y además conservan la compatibilidad con una amplia gama de tintes y proteínas fluorescentes (Richardson & Lichtman, 2015) (Tabla 3).

La inclusión por hidrogel es un método que compensa las problemáticas que presentan las soluciones orgánicas, como la extracción de lípidos, pérdida de biomoléculas nativas y daños en la arquitectura de los tejidos. Para evitar esto la inclusión por hidrogel acopla estas biomoléculas a híbridos de tejido-gel que pueden evitar estos riesgos (Tian et al., 2020). Para esto, primero se crea una malla de polímero 3D en el tejido; luego, las proteínas y los ácidos nucleicos de la muestra se unen covalentemente a esa malla; además, los lípidos se eliminan mediante un tratamiento con detergente iónico y finalmente, las muestras se impregnan con una solución de igualación del índice de refracción (Avilov, 2021). (Tabla 4). Se debe tener en consideración estos métodos son en general más complejos y requieren de equipamiento adicional en comparación a los a base de agua y a solventes orgánicos.

Cabe destacar que la mayor parte de los trabajos de aclaramiento de tejido han sido estandarizados para sistema nervioso, habiendo pocos datos sobre el protocolo a seguir para otros órganos (Xu et al., 2019).

Tabla 3. Tabla resumen de diversidad de técnicas a base acuosa. * Compatibilidad con Dil, grupo de colorantes que son compatibles con los lípidos presentes en los tejidos.

Técnicas	Índice de refracción	Tiempo de aclarado	Compatibilidad con Dil *	Modificación de tejidos	Referencias
SeeDB	1.49 (25 °C) 1.50 (37 °C)	Varios días	Si	Constante	(Ke et al., 2013)
FRUIT	~1.5	2-3 días	Si	Leve expansión	(Hou et al., 2015)
Clear T/T2	1.44	2-3 días	Si	Constante	(Kuwajima et al., 2013)
RTF	1.46	Horas a 1 día	Si	Constante	(Yu et al., 2018)
SeeDB2	1.46	Días	Si	Constante	(Ke et al., 2016)
FOCM	1.495	Minutos	Si	Constante	(X. Zhu et al., 2019)
Ce3D	~1.5	días	No probado	Pequeña contracción	(Li et al., 2017)
Sca/e	~1.3	días	No probado	Expansión	(Hama et al., 2011)
Sca/eS	1.44	Varios días	Si	Expansión temporal	(Hama et al., 2015)
CUBIC	1.45	1-2 semanas	No	Expansión	(Susaki et al., 2014)
UbasM	1.47–1.48	3-10 días dependiendo del tejido	Si	Expansión	(Chen et al., 2017)

Tabla 4. Resumen de diversidad de técnicas basados en inclusión de hidrogel.

Técnicas	impulsado por electroforesis	Inmunotinción	Referencias
CLARITY	SI	Si	(Chung et al., 2013)
ACT-PRESTO	SI	Si	(Lee et al., 2016)
PRESTO-CLARITY	SI	Si	(Du et al., 2019)
Stochastic electrotransport	SI	Si	(Kim et al., 2015)
Passive CLARITY	No	Si	(Tomer et al., 2014)
PACT-PARS	No	Si	(Yang et al., 2014)
Bone CLARITY	No	Si	(Greenbaum et al., 2017)
SWITCH	No	Si	(Murray et al., 2015)
SHIELD	No	Si	(Park et al., 2019)

El hígado es un notable modelo de tejido con una compleja estructura 3D

El hígado es el órgano metabólico más grande del cuerpo humano y es vital para la desintoxicación y el metabolismo de la sangre (Morales-Navarrete et al., 2019). Este órgano se encuentra compuesto por los lóbulillos hepáticos, unidades hexagonales, que a su vez se encuentran formados por los hepatocitos, las principales células epiteliales del hígado (Klingenberg et al., 2017; Wang & Boyer, 2004). Cada hepatocito a diferencia de otras células epiteliales tiene múltiples superficies basales que miran hacia el revestimiento endotelial (Treyer & Müsch, 2013). Los hepatocitos captan y metabolizan sustancias transportadas por la sangre, la cual fluye en contracorriente desde la vena porta hasta la vena central, secretando bilis a través de su superficie apical hacia la red de canálculos biliares, donde fluye hacia el conducto biliar cerca de la vena porta (Meyer et al., 2017;

Morales-Navarrete et al., 2019). Los canalículos biliares son estructuras subcelulares que están formados por las membranas apicales de los hepatocitos circundantes construyendo colectivamente una red tubular 3D altamente ramificada (Meyer et al., 2017). Los sinusoides hepáticos están en contacto estrecho con los hepatocitos, conformando el conducto vascular entre los cordones de hepatocitos, colaborando con el intercambio de sustancias entre la sangre y las células hepáticas (Ross & Pawlina, 2007) (Fig. 5)

Como se describió, el hígado presenta una organización compleja, debido a que los hepatocitos están intercalados entre las células endoteliales sinusoidales y comparten la superficie apical con múltiples hepatocitos vecinos. Esta arquitectura dificulta la comprensión de la organización 3D de sus células y de la estructura general del tejido a partir de secciones histológicas bidimensionales (Segovia-Miranda et al., 2019). Gracias al estudio 3D del tejido hepático se ha logrado realizar grandes avances en nuestro entendimiento de la organización celular y estructural de este tejido tales como: 1) los hepatocitos están dispuestos en zonas particulares dentro del tejido de acuerdo con su tamaño y contenido de ADN (Morales-Navarrete et al., 2015), 2) los canalículos biliares se encuentra desconectados en la enfermedad del hígado graso (Segovia-Miranda et al., 2019), 3) la creación de modelos predictivos, que ayudan en la caracterización funcional de enfermedades hepáticas y estimar cuantitativamente el transporte biliar tras la lesión hepática inducida por fármacos (Meyer et al., 2017).

Debido a la gran opacidad de este tejido, todos los análisis estructurales en 3D que se han realizado con técnicas aclarado de tejidos, han logrado tomar imágenes de hasta 100 μm de tejido (2-3 capas de células). Sin embargo, una serie de preguntas estructurales requieren de reconstrucciones que involucren secciones más gruesas del tejido. ¿Cómo es la morfología (tamaño, volumen, etc) de un lobulillo hepático y como cambia en homeostasis, regeneración y cáncer?, ¿cómo están organizadas las células al interior del lobulillo hepático? ¿Podemos reconstruir tumores hepáticos completos para estudiar la distribución espacial de

las células que los componen? ¿Podemos crear modelos matemáticos que expliquen la formación de tumores en el hígado?

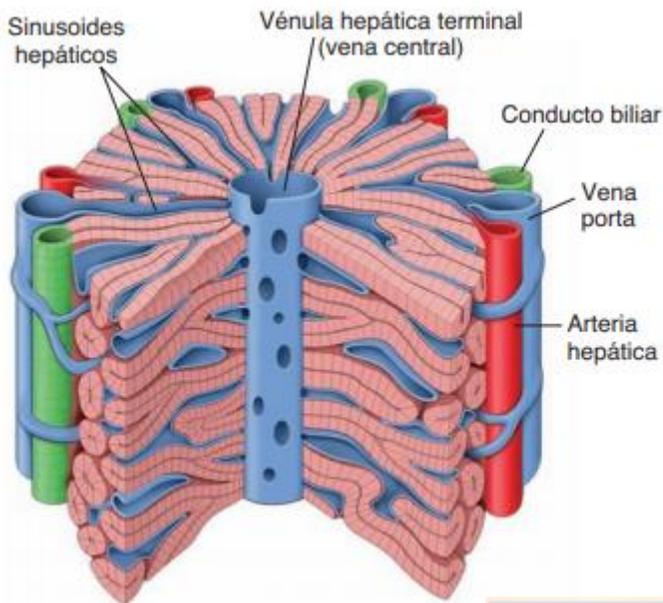


Figura 5. Diagrama de un lobulillo hepático (Ross & Pawlina, 2007).

Con este objetivo en mente, esta tesis busca implementar y comparar distintas técnicas de aclaramiento con especial interés en: 1) compatibilidad con colorantes utilizados en microscopía de fluorescencia, 2) preservación de la morfología tisular lo más cercano al tejido natural. Nos concentraremos en cinco técnicas de aclarado (SeeDB-SeeDB2G-RTF-FOCM-FRUIT), debido a que son aquellas que, de acuerdo con la literatura, presentan mayor compatibilidad con colorantes fluorescentes y la menor alteración de los tejidos.

HIPÓTESIS

La técnica de aclarado de tejidos FOCM sobresale al ser una técnica rápida y sencilla, que preserva la morfometría del tejido y compatibilidad con colorantes fluorescentes

OBJETIVO GENERAL

Comparar el grado de deformación tisular, la profundidad de aclarado y la compatibilidad de tinciones para análisis 3D que presentan diversas técnicas de aclarado, usando como modelo biológico el hígado de ratón.

Objetivos específicos

- Comparar cuantitativamente la capacidad de aclaramiento macroscópico de las 5 técnicas seleccionadas (SeeDB-SeeDB2G-RTF-FOCM-FRUIT) (no se aclara el criterio para elegir estas técnicas y no otras) en tejido hepático de ratón.
- Cuantificar los cambios tisulares macroscópicos en el tejido hepático tras la aplicación de las técnicas de aclarado de tejido.
- Analizar la compatibilidad de las técnicas de aclarado con diversas tinciones de fluorescencia utilizadas en reconstrucción en 3D de tejido hepático.
- Determinar la capacidad de aclaramiento y mantención de estructuras tisulares a nivel microscópico a través de microscopía multifotónica.

METODOLOGÍA

Animal

Este trabajo (Concurso FONDECYT, proyecto N° 120965) se encuentra bajo la autorización del Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción. Autorizando el estudio con ejemplares de ratones (*Mus musculus* Cepa C57/6J), cuyo origen es del Centro Regional de Estudios Avanzados para la Vida (CREAV) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Fijación

Para la recolección del tejido hepático este se fijó a través de perfusión transcárdial con paraformaldehído (PFA). Los ratones fueron anestesiados vía inyección de 1µl/gr de peso corporal de ketamina y 1µl/gr de peso corporal de Xilasina. Las cavidades abdominales y torácica se abrieron con tijeras quirúrgicas y se insertó una aguja de 20G en el extremo posterior del ventrículo izquierdo del corazón. Inmediatamente después de esto, se hizo una pequeña incisión en la aurícula derecha para abrir el sistema circulatorio y el animal fue perfundido a 4 ml/min durante 15 min con paraformaldehído al 4% PFA, 0.1% Tween20, 1x PBS vía una bomba peristáltica (45 rpm para 4 ml/min). Después de la fijación del hígado con PFA, los lóbulos del hígado se escindieron con tijeras quirúrgicas, se cortaron en tres trozos de igual tamaño y se transfirieron a tubos Falcon de 15 ml. Para análisis histoquímico por inmunofluorescencia, el tejido se fijó posteriormente en PFA al 4%, Tween20 al 0,1%, 1x PBS durante 24 horas en un rotador a 4°C y se almacenó en 1x PBS hasta su posterior procesamiento a 4°C.

Seccionamiento de tejido

Las muestras de tejido de hígado ya fijado se transfirieron a un molde con 4% agarosa en 1x PBS donde se introdujo trozos de hígado seco al fondo del molde, para luego transferir el molde a una cubeta con hielo. Posteriormente con un vibratomo (Speed:1-5 mm/sec – Ampl: 1mm) se realizaron cortes de 100 μm - 200 μm - 400 μm y 1mm de grosor.

Preparación de soluciones aclarantes

Los métodos seleccionados se eligieron a base de que presentaran una buena profundidad de aclarado, compatibilidad con marcadores fluorescentes y una mínima alteración en área lineal. Debido a esto no fueron considerados los métodos de aclarado basados en disolventes orgánicos y hidrogel, ya que alteran el área lineal de los tejidos aclarados y no presenta compatibilidad con algunos tipos de tinciones. Las soluciones seleccionadas se prepararon a base de los trabajos originales.

- Para aclaramiento con FOCM: Las muestras fueron incubadas durante 1-5 min (dependiendo del grosor de las rebanadas) con agitación suave a temperatura ambiente. Después del aclarado de FOCM, la muestra debe montarse inmediatamente. (X. Zhu et al., 2019).
- Para aclaramiento con FRUIT: Todos los pasos de incubación se realizaron a 37 ° C. Las muestras se sumergieron en distintas concentraciones de FRUIT, 35%, 40% y 60% cada uno durante 8 h, seguido de incubación en 80% y 100% durante 12 y 24 h. (Hou et al., 2015).
- Para aclaramiento con RTF: Las muestras se incubaron en RTF-R1, RTF-R2 y RTF-R3 secuencialmente. El tiempo de incubación en cada solución depende del tipo y grosor del tejido. Para embriones enteros o cabezas (E11-E15), requiere de 2 a 3 horas, 2 a 3 horas, 5 a 14 horas para RTF-R1, RTF R2, RTF-R3, respectivamente. Para cerebros intactos (E16-P12), el tiempo de incubación en la

solución final aumenta a una noche o más. Para secciones de cerebro de adultos con un grosor de 800 a 1500 μm , 30 a 50 min, 1 a 1,5 horas y 1 a 1,5 horas en RTF-R1, RTF-R2, RTF-R3 será suficiente para la eliminación (Yu et al., 2018). Para este caso como se está trabajando con tejido de hígado se siguió la metodología para un grosor de 800 a 1500 μm .

- Para aclaramiento con SeeDB2G: Primero, las muestras de tejido fijo se incubaron con saponina al 2% en PBS durante la noche. Transferir la muestra a un tubo nuevo lleno con la solución 1 y colóquelo en un rotador. Incubar 2-4 h para muestras de corte (200-500 μm). Transferir la muestra a un tubo nuevo lleno con la solución 2 y colóquelo en un rotador. Incubar durante 2-4 h para muestras de corte (200-500 μm). Por último, transferir la muestra a un tubo nuevo lleno de SeeDB2G con saponina y colocarlo en un rotador, Incubar durante 2-4 h para muestras de corte (200-500 μm). (Ke et al., 2016)

- Para aclaramiento con SeeDB: Las muestras fijadas se incubaron en serie de fructosa al 20%, 40% y 60% (p / vol), cada una durante 4-8 h con rotación (~ 4 rpm, para muestras de montaje completo) a 25 ° C. Luego, las muestras se incubaron en fructosa al 80% (p / vol) durante 12 h, fructosa al 100% (p / vol) durante 12 h y finalmente en SeeDB (fructosa al 80,2% p / p) durante 24 h con agitación suave o rotación a 25°C. ° C. (Ke et al., 2013)

Medición del aclarado de tejido

Para analizar el nivel de transparencia de los tejidos aclarados se procedió a tomar fotografía a través de una lupa, antes y después del aclarado. Se utilizaron cortes de 200 μm , 400 μm y 1 mm, que fueron dispuestos sobre una grilla cuadrículada (10 x 10 mm cada recuadro). Se cuantificó a través del software Fiji en donde se realizó la medición de la escala de gris en los tejidos con un grosor de 200 μm , pre y post aclarado. Se dibujó una línea dentro y fuera del tejido para ambos casos, y se midió la intensidad del color gris. (Fig. 6). La cuantificación de la transparencia de las técnicas de aclarado fue medida bajo la siguiente ecuación:

$$\Delta (I_0 - I_1)_T / \Delta (I_0 - I_1)_E$$

Donde:

I_0 = intensidad de gris entre líneas

I_1 = intensidad de gris en líneas

$\Delta (I_0 - I_1)_E$: Delta de intensidad de gris en el exterior del tejido

$\Delta (I_0 - I_1)_T$: Delta de intensidad de gris en el tejido.

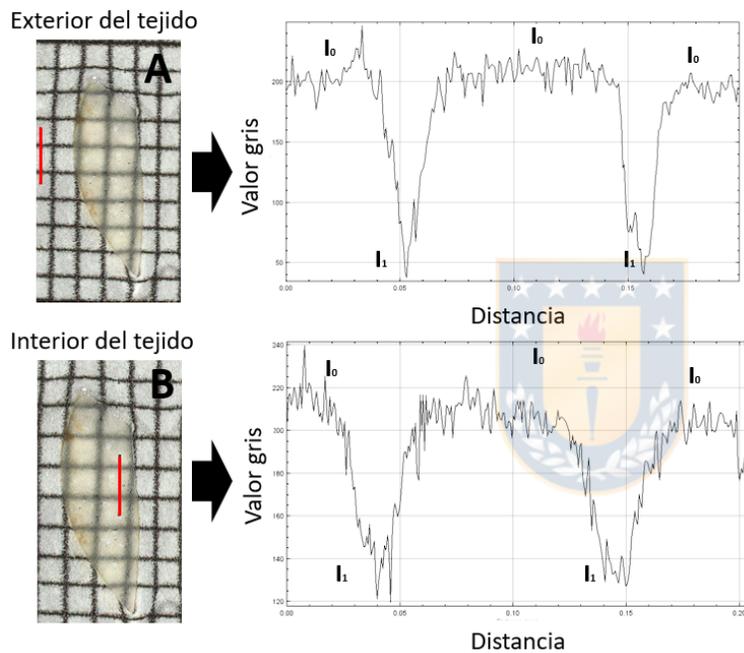


Figura 6. Metodología de la cuantificación de la transparencia en tejido hepático de ratón de un grosor de 200 μm . A) medición del valor gris fuera del tejido, teniendo en cuenta los valores I_0 y I_1 . B) medición del valor gris al interior del tejido post aclaramiento teniendo en cuenta los valores I_0 y I_1 .

Medición de la alteración en el área lineal post aclarado de tejido

La evaluación de la deformación del área del tejido se obtuvo a través de la toma fotográfica con una lupa, pre y post aplicada la técnica de aclarado. Se utilizaron cortes de 200 μm , 400 μm y 1 mm. Una vez obtenida la imagen se procedió a medir la deformación del área a través del software Fiji, donde se dibujó una línea sobre el margen de los tejidos pre y post aclaramiento, una vez cuantificada el área de ambos se realizó la comparación de ambos resultados (Fig. 7).

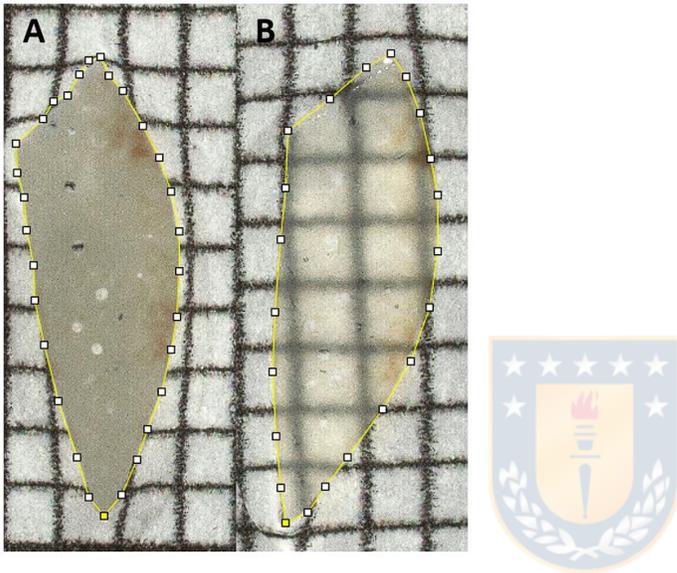


Figura 7. (A) Delimitación del área lineal en muestra de tejido hepático pre aplicada la técnica de aclaramiento para posterior medición del área lineal. (B) Delimitación del área lineal en muestra de tejido hepático post aplicada la técnica de aclaramiento para posterior medición del área lineal.

Tinción

Se procede a retirar la agarosa del tejido y se permeabiliza con una solución Triton X-100 al 0,5% en PBS (60 minutos) (300 μl / pocillo), luego se procedió a agregar las muestras en los anticuerpos primarios CD13(Novus cat. N° NB100-64843) y Flk-1(Proteintech cat. N° 16754-1-AP), en TxBuffer (0.2% gelatina, 300mM NaCl, 0.3% Triton X-100 en PBS) (2 noches a temperatura ambiente). Posteriormente se lava con 300 μl de Triton / PBS al 0,3% (5 veces durante 15 minutos). Para así

poder añadir los anticuerpos secundarios (Donkey Anti-Rat IgG (H+L) CF®568 (Biotium cat. N° 20092) y Donkey anti-Goat IgG (H+L) (Invitrogen cat. N° A-21447) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647) junto con DAPI (Invitrogen cat. N° D1306) y Faloidina (Invitrogen cat. N° A12379) en TxBuffer (2 noches a temperatura ambiente). Las muestras se mantuvieron protegidas de la luz envolviendo las placas con papel de aluminio. Nuevamente se procede a lavar con 300 µl de Triton / PBS al 0,3% (5 veces durante 15 minutos). Y finalmente se lava en PBS (3 veces 1 minuto).

Imagen de microscopio multifotónico en muestras aclaradas

Para todos los tejidos se utilizó la última solución de cada técnica de aclarado para el montaje de la muestra en el portaobjetos. Y se utilizó una preparación en diferentes concentraciones de TDE como líquido de inmersión, para igualar los índices de refracción de cada técnica utilizada (Staudt et al., 2007). Posterior a esto, se tomaron imágenes de los cortes de tejido hepático (tamaño vóxel de 0,3 µm) en un microscopio de barrido láser multifotón espectral (LSM780 Zeiss). Se excitaron los anticuerpos primarios CD13 y Flk-1 a 633 nm y 561 nm respectivamente usando un láser de 1 fotón confocal, mientras que DAPI y faloidina se excitaron a 780 nm usando un láser de 2 fotones.

Reconstrucción 3D del tejido hepático

Para poder cuantificar la deformación de estructuras micrométricas del tejido, se realizó una reconstrucción 3D de los canaliculos biliares bajo condiciones control (PBS) y los distintos aclaramientos (SeeDB-SeeDB2G-RTF-FOCM-FRUIT). Las reconstrucciones 3D se realizaron con el software MotionTracking basado en la descripción realizada en Morales-Navarrete (2015).

RESULTADOS

Capacidad de aclaramiento macroscópico

La primera diferencia que se observa en las técnicas de aclarado a base de agua es el tiempo que toma cada una de las técnicas, y la cantidad de soluciones por las que debe pasar el tejido antes de estar completamente aclarado. La técnica que tomó el menor tiempo de aclarado fue FOCM, el cual logra aclarar el tejido en un tiempo de 5 minutos en una sola solución. El siguiente fue la técnica RTF con un tiempo de aclarado de 4 horas y 30 minutos, este debió pasar por 3 soluciones RTF-R1 (50 min), RTF-R2 (1 hora y 50 min) y RTF-R3 (1 hora y 50 min). A continuación, se encuentra SeeDB2G con un total de 24 horas, pasando por 4 soluciones, Saponina 2%/Pbs (12 horas), solución 1 (4 horas), solución 2 (4 horas) y SeeDB2G (4 horas). Luego sigue SeeDB con 44 horas, pasando por 5 soluciones, SeeDB 25% (4 horas), SeeDB 50% (4 horas), SeeDB 75% (12 horas), SeeDB 100% (12 horas) y SeeDB (12 horas). Por último, siendo la técnica que tomó más tiempo se encuentra FRUIT con un total de 60 horas, en 5 soluciones, FRUIT 35 % (8 horas), FRUIT 40 % (8 horas), FRUIT 60 % (8 horas), FRUIT 80 % (12 horas), FRUIT 100 % (24 horas). (Fig. 8)

En cuanto a la capacidad de transparencia de forma cualitativa la técnica de aclarado FRUIT fue la que logró una mayor transparencia del tejido en los 3 tipos de cortes (200 μ m- 400 μ m- 1mm), siendo la única de las técnicas a comparar que logró transparentar el tejido de 1mm de grosor. El resto de las técnicas no logró una transparencia satisfactoria o visible en el tejido de 1mm de grosor. En cuanto al resto de las técnicas, FOCM, RTF y SeeDB2G lograron una buena transparencia en tejido de 200 μ m de grosor, mientras que SeeDB queda un poco atrás en cuanto a aclarado. Para el corte de 400 μ m de grosor, FOCM y RTF bajan su calidad de transparencia en el tejido, mientras que SeeDB2G muestra una mejor calidad en el corte de 400 μ m de grosor. (Fig. 9)

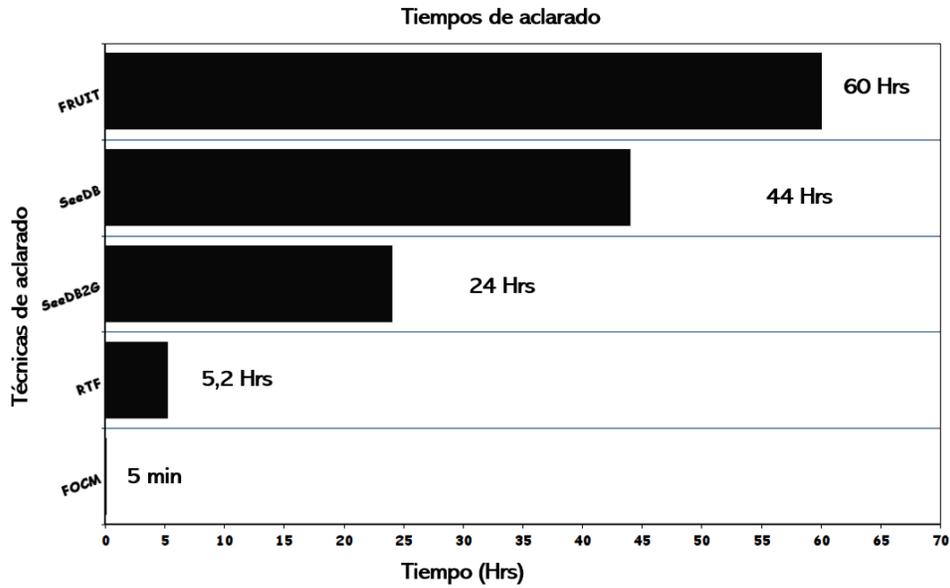


Figura 8. Resumen temporal de las técnicas de aclarado FOCM, RTF, SeeDB2G, SeeDB y FRUIT.

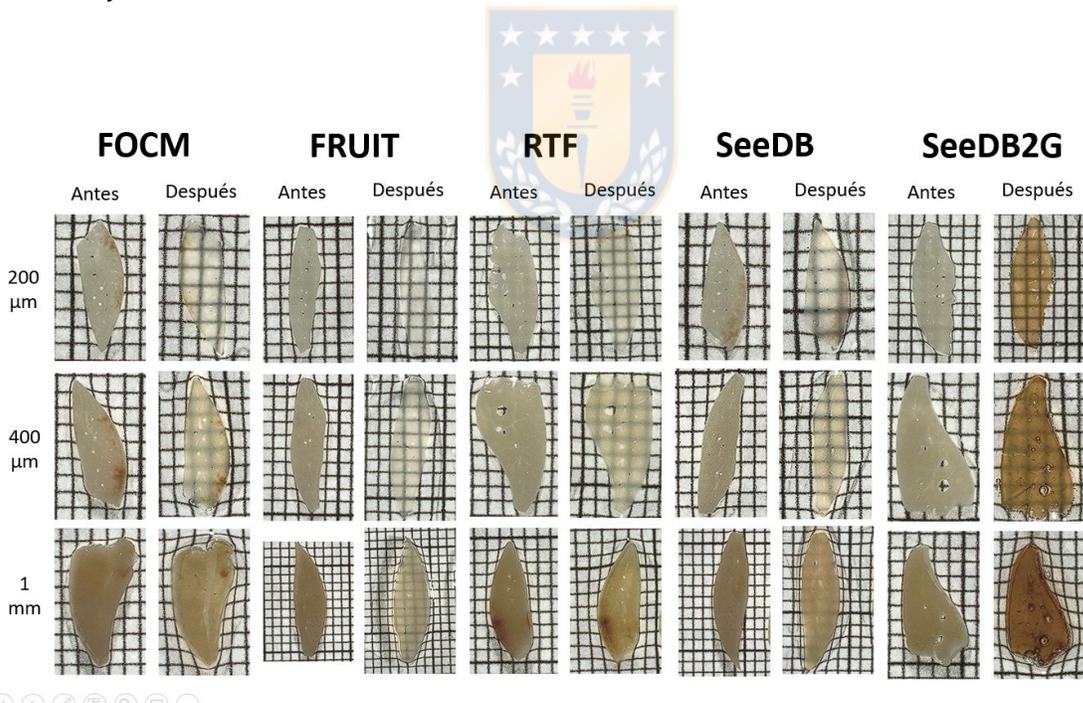


Figura 9. Imagen comparativa de técnicas de aclarado pre y post aclarado, en tejido hepático de ratón con grosores de 200 μ m, 400 μ m y 1mm de grosor, visualizados en una grilla de 10 x 10 mm por recuadro.

Al analizar la transparencia de manera cuantitativa en cortes de 200 μm , FRUIT fue la técnica que mostró el mayor desempeño (Fig. 10), en acuerdo con los resultados observados en la Fig. 9. FOCM es la segunda técnica que logra una mayor transparencia en el tejido aclarado, mientras que las técnicas RTF, SeeDB y SeeDB2G, mostraron un nivel de transparencia no muy lejanos entre sí. (Fig. 10).

Aun cuando la técnica FRUIT logra la mejor transparencia, es la única técnica donde se visualiza una aparente expansión en el tejido observable (Fig. 9).

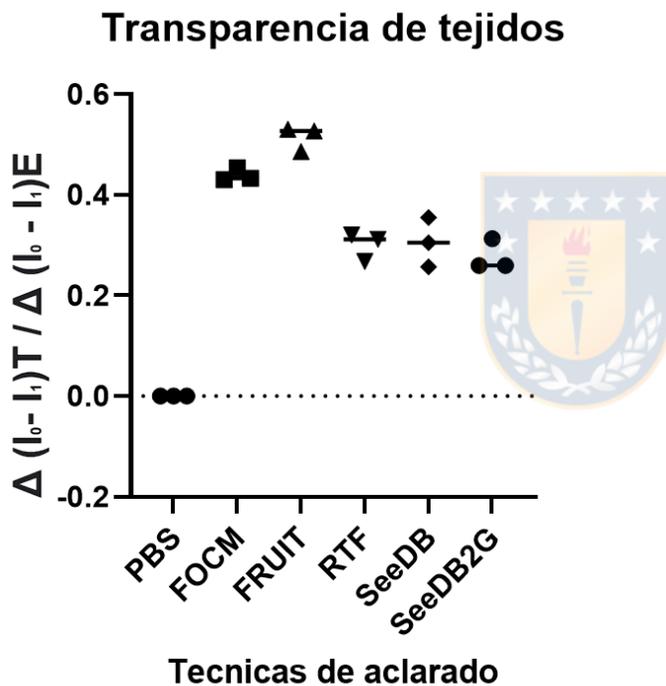


Figura 10. Cuantificación de la transparencia de tejidos a través de la ecuación $\Delta (I_0 - I_1)T / \Delta (I_0 - I_1)E$ normalizada (AU) post aplicada las técnicas de aclaramiento en tejido hepático de 200 μm de grosor. Donde cada marca dentro del gráfico corresponde al de $\Delta (I_0 - I_1)T / \Delta (I_0 - I_1)E$ de tres intensidades de gris entre líneas y las barras corresponden al promedio de estos valores. En cuanto al eje Y el valor 0.0 representa el tejido hepático sin tratamiento de aclarado. Mientras aumenta el valor, mayor es la capacidad de transparencia de la técnica de aclarado. Valor de 1 en el eje Y corresponde a 100% de transparencia.

Cuantificación de la deformación macroscópica

En cuanto a la modificación generada por las técnicas de aclarado, como se mencionó anteriormente la técnica FRUIT fue la única que de forma visual demostraba una expansión en el tejido. La cuantificación de la expansión lineal confirmó los resultados anteriormente observados. FRUIT generó un aumento de expansión lineal cercana al 20% ($1,2 \pm 0.03$). El resto de las técnicas de aclarado presentaron una deformación del área lineal mínima o casi nula (Fig. 11). SeeDB2G (0.99 ± 0.05), RTF (0.95 ± 0.05), FOCM (1.03 ± 0.05) y SeeDB (0.99 ± 0.04).

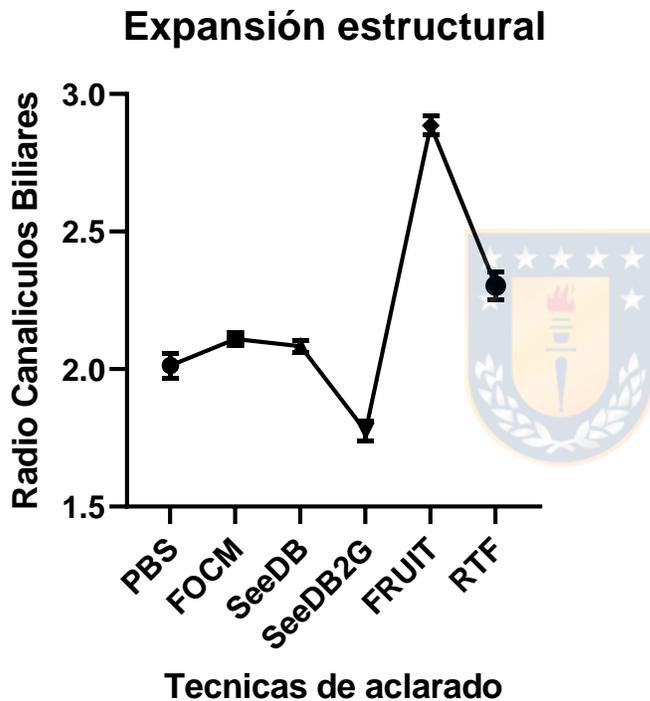


Figura 11. Comparación de la deformación del área lineal post aclaramiento. Donde las circunferencias representan los cortes de $200 \mu\text{m}$ - $400 \mu\text{m}$ - 1mm y las barras corresponden al promedio de la expansión lineal normalizada (AU) entre los cortes de tejido hepático de ratón. En cuanto a la expansión lineal normalizada (AU) (eje Y) el valor 1.0 equivale a que no hubo una deformación en el tejido, sobre este valor el tejido presenta una expansión y bajo 1.0 representa una contracción en el tejido.

Compatibilidad de las técnicas de aclarado con diversas tinciones de fluorescencia

Luego se estudió la compatibilidad de las técnicas de aclarados con distintos tintes fluorescentes. Se seleccionaron los tintes más utilizados para reconstrucciones 3D de tejido hepático basado en microscopía de fluorescencia. DAPI es una pequeña molécula sintética fluorescente que tiene gran afinidad por el ADN de doble hebra y permite visualizar los núcleos. Faloidina es un heptapéptido bicíclico tóxico pequeño, presente en diferentes setas pertenecientes a la familia Amanitaceae. Faloidina tiene una gran afinidad por los filamentos de actina, por lo que fusionada a un colorante fluorescente (Alexa 488) permite visualizar el borde de la célula. Finalmente, se utilizaron anticuerpos primarios para la visualización de dos estructuras importantes del tejido hepático, CD13 para los canalículos biliares y Flk-1 para los sinusoides. Ambos anticuerpos fueron observados gracias a la adición de anticuerpos secundarios marcados con Alexa 568 y 647 respectivamente.

En la muestra control (PBS), las 4 tinciones aplicadas fueron visualizadas, lo que confirma que las tinciones fueron aplicadas correctamente y que la falta de presencia de alguna tinción en los tejidos post aplicada la técnica de aclarado se debe a una falta de compatibilidad. Ambos anticuerpos (CD13 y Flk-1) fueron compatibles con las 5 técnicas de aclarado, siendo CD13 el que presentó una mayor intensidad de fluorescencia, mientras que la intensidad de Flk-1 fue variando entre las técnicas. Debido a que los anticuerpos primarios fueron revelados con anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos Alexa, los resultados indican no solo que las tinciones con anticuerpos son compatibles con el aclaramiento, sino que también los colorantes Alexa se mantienen fluorescentes. Las tinciones DAPI y Faloidina no fueron compatibles con todas las técnicas. FOCM, RTF y FRUIT, no presentaron compatibilidad con Faloidina. De igual forma RTF y SeeDB2G no fueron compatibles con DAPI (Fig. 12). SeeDB fue la única técnica de aclaramiento óptico que mostró compatibilidad con todos los colorantes analizados.

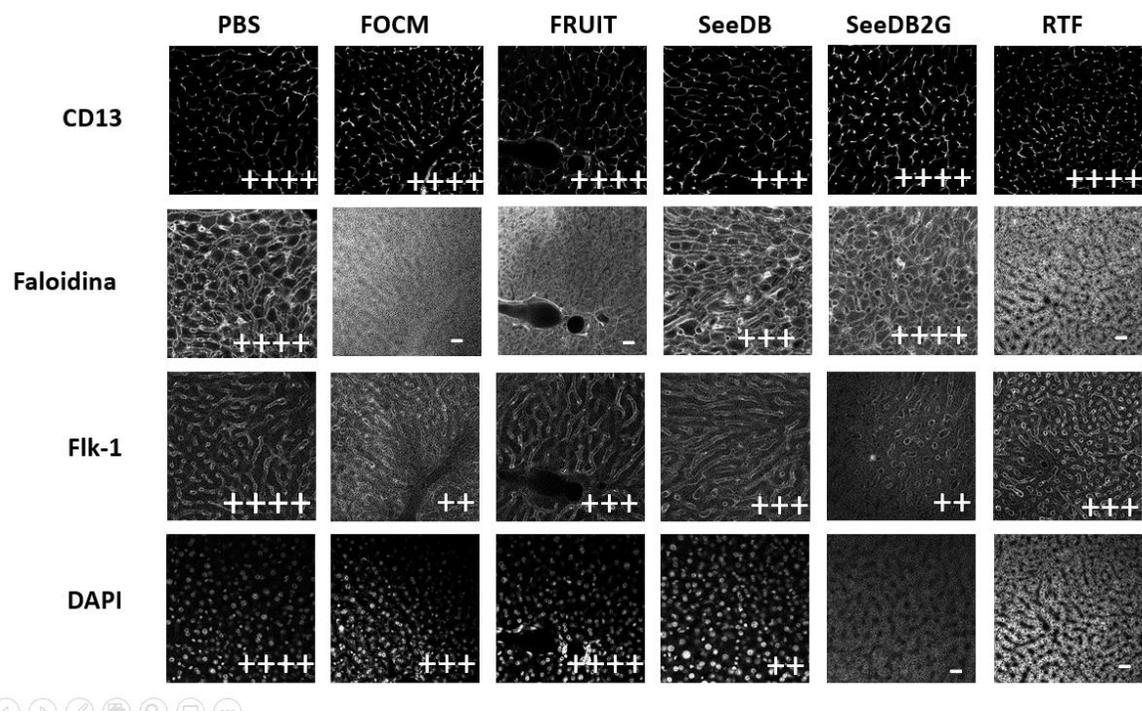


Figura 12. Compatibilidad de tinciones (Faloidina, CD13, Flk-1 y DAPI) con técnicas de aclarado (FOCM, FRUIT, SeeDB, SeeDB2G y RTF) y control (PBS) en tejido de ratón con un grosor de 100 μm . Se representó la compatibilidad de las tinciones de mayor (++++) a menor (+) y nula (-).

Desempeño de las técnicas de aclarado en rebanadas de tejido hepático usando microscopía multifotón

Antes de analizar a que profundidad se puede llegar con láser confocal y 2-fotones luego de los distintos aclaramientos, es crucial descartar cualquier problema de dispersión de la luz debido a diferencias en los índices de refracción. Como se expuso anteriormente, esta representa el mayor reto para tomar imágenes de secciones gruesas de tejido. En condiciones ideales, la muestra, el medio de montaje y el líquido de inmersión deben tener el mismo índice de refracción. Tanto la muestra como el líquido de montaje tienen el mismo índice de refracción en nuestras técnicas de aclarado. Sin embargo, los líquidos de inmersión comerciales para los objetivos de los microscopios traen un índice de refracción definido, el cual rara vez coincide con los índices de refracción de las técnicas de aclarado.

Para resolver este problema, utilizamos tiodietanol (TDE), un compuesto orgánico que ha mostrado ser muy útil como medio de inmersión en microscopía de super-resolución (Staudt et al., 2007). Se realizó una curva de calibración utilizando distintas concentraciones de TDE y el índice de refracción se midió con un refractómetro. La fórmula obtenida de la ecuación de la recta nos permitió calcular la concentración de TDE que debíamos usar para cada técnica de aclaramiento (Fig. 13). TDE debe ser utilizado al 83% para SeeDB, 88% para FRUIT, 67% para RTF, 86% para FOCM y 67% para SeeDB2G. (Tabla 5).

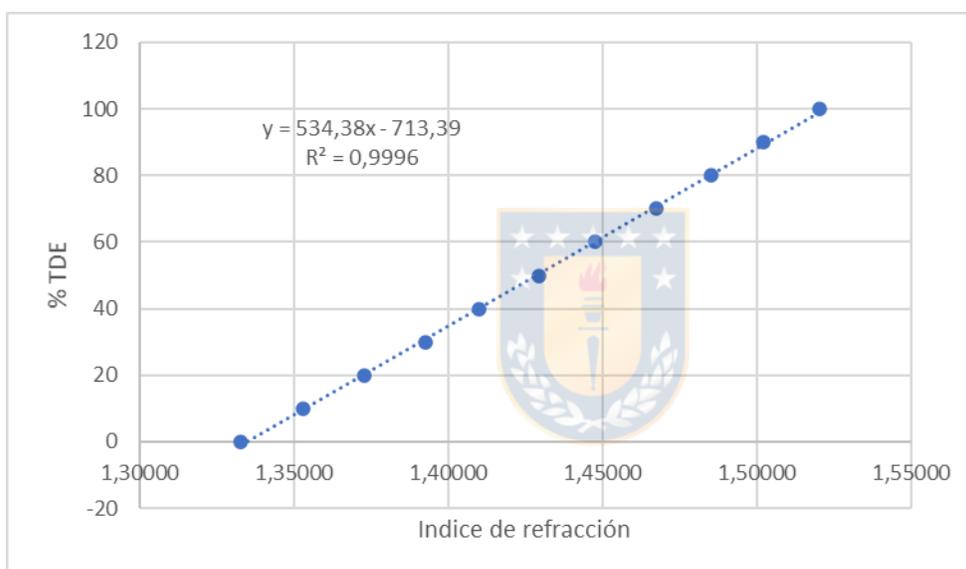


Figura 13. Curva de calibración TDE. Representación de diversos índices de refracción dependiendo de la concentración de TDE.

Tabla 5. Concentraciones de TDE por técnica de aclaramiento.

Técnicas de aclarado	IR	%TDE?
SeeDB	1,49	83
FRUIT	1,5	88
RTF	1,46	67
FOCM	1,495	86
SeeDB2G	1,46	67

En cuanto a la comparación en la profundidad de las tinciones con respecto a las técnicas de aclarado, esta se realizó en rebanadas de y solo utilizando el anticuerpo primario CD13, debido a que fue la única tinción con compatibilidad y una buena calidad de intensidad para todas las técnicas de aclarado (Fig. 12). En el tejido control (PBS), debido a no encontrarse bajo un proceso de aclarado solo se logró penetrar hasta 30 μm . RTF solo logró llegar hasta 70 μm de profundidad con las tinciones, mientras que las técnicas, FOCM, SeeDB, SeeDB2G y FRUIT lograron penetrar hasta las 100 μm (Fig. 14) (Tabla 6).

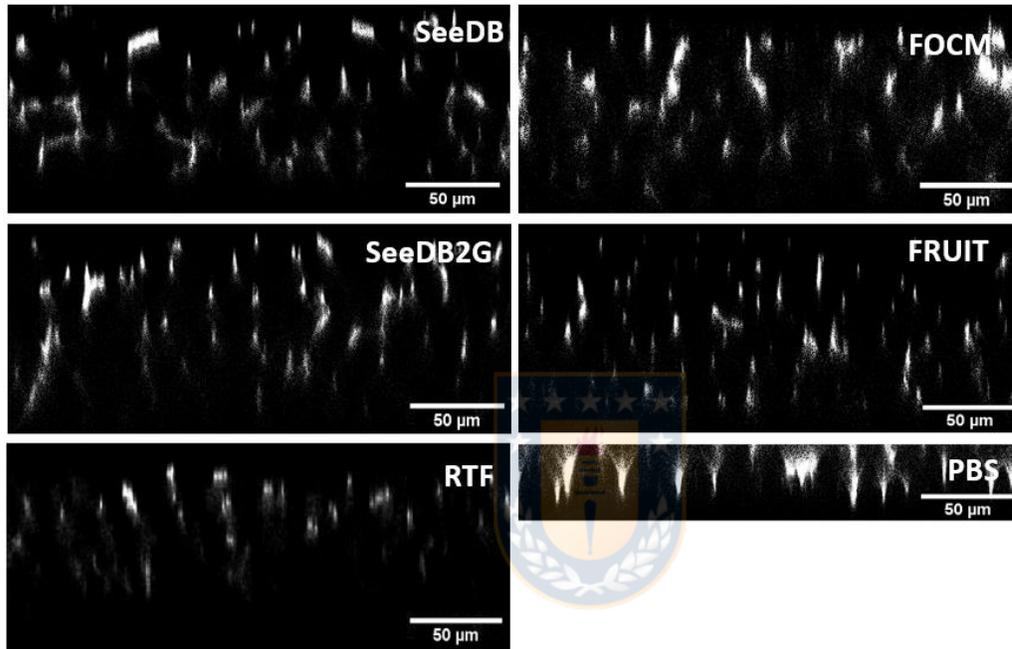


Figura 14. Vista ortogonal (x-z) obtenida de cortes de hígado de ratón (100 μm de grosor). Se puede observar la profundidad de tinción con anticuerpo primario CD13 (canalículos biliares) en tejido post aplicada la técnica de aclarado en cortes de 100 μm . Para el caso del PBS, solo se logró tomar una imagen hasta los 30 μm debido a que al no aplicarse una técnica de aclarado no se lograba llegar más profundo en el tejido.

Tabla 6. Profundidad de tinción con anticuerpo primario CD13 (canalículos biliares) en tejido post aplicada las técnicas de aclarado, en cortes de 100 μm .

Técnica	PBS	FOCM	SeeDB	SeeDB2G	FRUIT	RTF
Profundidad de tinción (CD13)	30 μm	100 μm	100 μm	100 μm	100 μm	70 μm

Cuantificación de la expansión tisular microscópica a partir de la reconstrucción 3D de tejidos

La comparación de la expansión estructural del tejido a nivel microscópico se analizó luego de reconstruir en 3D los canalículos biliares mediante la tinción con CD13, ya que, fue la única tinción que tuvo un excelente resultado para las 5 técnicas de aclaramiento aplicadas. Una vez generadas las reconstrucciones, medimos el radio a lo largo de esta estructura con el software MotionTracking. El radio de los canalículos biliares fue de $2 \mu\text{m} \pm 0.04$ en la situación control (PBS). FOCM ($2.1 \mu\text{m} \pm 0.02$) y SeeDB ($2.08 \mu\text{m} \pm 0.02$) son las técnicas de aclarado que se mantienen lo más cercano al radio control de los canalículos biliares. Mientras que FRUIT (2.88 ± 0.03) fue la técnica que mostró la mayor expansión de los canalículos biliares. RTF (2.3 ± 0.05) mostró una ligera expansión. Por el contrario, SeeDB2G (1.77 ± 0.03) fue la única que presentó una leve contracción en el radio de los canalículos biliares (Fig. 15).

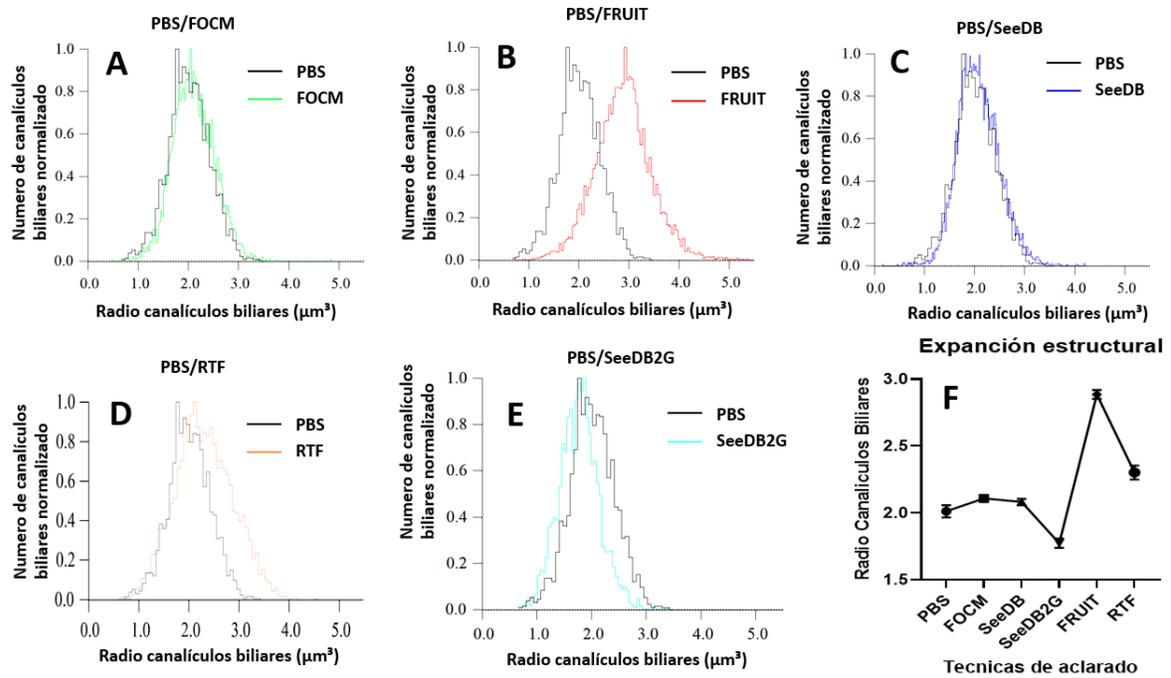


Figura 15. Diferencia del volumen del radio de los canaliculos biliares para todas las condiciones. (A) PBS/FOCM. (B) PBS/FRUIT. (C) PBS/SeeDB. (D) PBS/RTF. (E) PBS/SeeDB2G. (F) grafico que representa el promedio \pm SEM del radio de los canaliculos biliares, siendo 2.0 el tamaño original del radio obtenido por el PBS, sobre este valor se ve reflejado una expansión de la estructura y bajo este valor una contracción.

DISCUSION

Muchas de las técnicas de aclarado de tejidos son estudiadas en un reducido número de órganos, donde se ha hecho un gran énfasis en el estudio de tejido nervioso. Esto ha dificultado poder seleccionar un método de aclarado adecuado para el resto de tejidos (Xu et al., 2019). Las 5 técnicas que comparamos, en sus trabajos originales son testeadas en tejido cerebral (Hou et al., 2015; Ke et al., 2013, 2016; Yu et al., 2018; X. Zhu et al., 2019), lo que produce que al momento de ser testeados en otros tipos de órganos, como el hígado, haga falta información para su adecuado tratamiento. Habría que poner esto también en el planteamiento del problema, ya que es la base para realizar este trabajo. Esto se ve evidenciado en el trabajo de Xu et al. (2019) donde testean distintas técnicas de aclaramiento de tejidos (3DISCO, uDISCO, SeeDB, FRUIT, Sca/eS, CUBIC y PACT) en diferentes órganos (cerebro, corazón, hígado, pulmón, riñón, bazo, musculo, estomago, intestino y piel), obteniendo variados resultados dependiendo del órgano. Esta tesis busca comparar distintos métodos de aclaramiento de manera de encontrar el o los método(s) que permitan teñir el tejido hepático con múltiples colorantes fluorescentes mientras se mantiene la arquitectura tanto a nivel macro como micro tisular.

Para la capacidad de aclaramiento entre técnicas, utilizamos cortes de tejido hepático de tres grosores 200 μm , 400 μm y 1mm. Entre las 5 técnicas de aclarado de tejidos a base de agua, FOCM destaca en ser una técnica de aclarado extremadamente rápida, con un protocolo simple y manteniendo el tejido sin ninguna alteración. Se ha reportado que esta técnica presenta una capacidad de aclarado eficiente en cortes de hasta 300 μm (X. Zhu et al., 2019), por lo que es factible que permita tomar imágenes de un grosor mayor a 100 μm de tejido hepático.

FRUIT es la técnica cuyo proceso toma el mayor tiempo de aclarado, logrando hacer transparentes macroscópicamente, los tres grosores de tejido estudiados. De hecho, es la única de las técnicas que logra una transparencia notable en el

grosor de 1 mm. Una de sus desventajas es que presenta una expansión del área lineal del tejido y en los canalículos biliares. Esta expansión producida por FRUIT se ha descrito que puede darse por varios factores tales como la edad del animal, el volumen del tejido, el tiempo de fijación, la temperatura de la solución, entre otros (Hou et al., 2015). FRUIT es una técnica prometedora en casos en que se requiera aclarar secciones muy gruesas de tejido y que no se necesite obtener cuantificaciones precisas.

SeeDB2G es una técnica que sale como una mejora en el poder de aclaramiento de SeeDB (Ke et al., 2016). Dado nuestros resultados, no se observa que presente mejores cualidades en comparación a SeeDB en rebanadas de 100µm. Además, SeeDB muestra mejor compatibilidad con los colorantes analizados. SeeDB2G provoca una leve contracción del tejido hepático y sus estructuras internas, contrario a los resultados obtenidos por Ke et al. (2016), quienes obtienen un tamaño final de las muestras similar a la muestra original. Es posible que la deformidad de los tejidos dependa del tipo de tejido estudiado.

En cuanto a RTF, presenta resultados similares a los descritos en el trabajo original, donde su capacidad de aclaramiento es similar a la de SeeDB, pero menor a la de FRUIT macroscópicamente (Yu et al., 2018). Sin embargo, no mostró un buen desempeño al microscopio multifotón, donde no fue posible tomar imágenes del grosor completo del tejido. Por último, SeeDB se destaca sobre el resto de las técnicas por su total compatibilidad con todas las tinciones analizadas, siendo además la que mejor conserva el tejido hepático tanto en el área lineal como en las estructuras internas. Siendo un aspecto importante a la hora de elegir una técnica de aclarado, ya que, para obtener datos cuantitativos precisos de la morfología tisular, es crucial mantener las estructuras celulares de las muestras durante el proceso de aclarado (Ke et al., 2016).

Se ha reportado que algunas soluciones y tratamientos utilizados en los métodos de aclaramiento de tejidos destruyen los fluoróforos y/o sus dianas de unión en los tejidos y, por lo tanto, son incompatibles con las estrategias de marcado

respectivas (Avilov, 2021). Esto explicaría porque en algunas de las técnicas utilizadas en este trabajo no se logró visualizar las tinciones. En cuanto a las tinciones con anticuerpos, estas funcionan con la mayoría de los métodos de aclaramiento de tejidos publicados; sin embargo, siempre se debe comprobar la compatibilidad de cada anticuerpo con el protocolo de aclarado seleccionado (Avilov, 2021). En acuerdo con la literatura, este trabajo observó una gran compatibilidad del inmunomarcaje con las técnicas de aclarados estudiadas. Es importante destacar que además de pequeñas moléculas fluorescentes y la utilización de anticuerpos, existen otras estrategias para marcaje fluorescente. En esta tesis no se evaluó el comportamiento de proteínas fluorescentes, el cual es un marcaje genético que se incorpora utilizando enfoques transgénicos. Como estos marcadores se crean dentro de la célula, no hay necesidad de marcar con agentes exógenos, algo ideal para la obtención de imágenes volumétricas (Kremers et al., 2011).

Otro aspecto que hace falta comprobar es a que profundidad se puede llegar con los láseres del microscopio, ya que solo probamos un grosor definido (100 μ m). En nuestro diseño experimental, fue posible tomar imágenes del total del grosor evaluado en 4 de las 5 técnicas (SeeDB, SeeDB2G, FOCM y FRUIT). Para obtener un resultado más preciso de las capacidades de las técnicas en cuanto a la profundidad que podrían llegar los láseres en tejido hepático, es importante considerar en futuros trabajos el probar con secciones de tejido sobre los 100 μ m. Referente a esto, también se debe considerar que la penetración que se logra con anticuerpos, ya que esta se puede ver obstruida debido a que son moléculas grandes, lo que disminuiría la eficiencia de la tinción al aumentar la distancia desde la superficie de la muestra (Avilov, 2021). Anteriormente se ha comprobado que FOCM logra llegar a una profundidad de 200 μ m con DAPI (X. Zhu et al., 2019), que a diferencia de los anticuerpos como CD13 es una molécula pequeña, lo que le permite lograr mayor penetración que los anticuerpos. Por esto en trabajos futuros se debe aumentar tanto la revisión de la profundidad de penetración en cortes de mayor volumen, así como también que tanto los

anticuerpos como los colorantes Alexa lleguen a gran profundidad para lograr reconstruir una mayor porción del tejido hepático a estudiar. Otra alternativa, es la utilización de ratones transgénicos que presentan componentes celulares fluorescentes, ej. el núcleo o la membrana plasmática.

Otro aspecto a mejorar es la utilización de marcajes alternativos en los casos de incompatibilidad. Por ejemplo, FOVM y SeeDB2G mostraron en general un buen desempeño, pero presentaron incompatibilidad con faloidina y DAPI respectivamente. En estos casos, se pueden utilizar otras tinciones que tiñan las mismas estructuras. Mientras que para los núcleos se pueden colorantes como Hoechst, yoduro de propidio, TOPRO-3 y Acridine Orange, para el borde celular se pueden utilizar anticuerpos contra proteínas de membrana plasmática o ratones transgénicos fluorescentes (Muzumdar et al. 2007).



CONCLUSIONES

Aun con el creciente desarrollo de diversas técnicas de aclaramiento de tejidos, hace falta investigación en órganos que no sean los comúnmente utilizados. En este trabajo se destacan dos técnicas para trabajar en tejido hepático. Por un lado, SeeDB que mantiene la estructura tisular similar al pre aclarado, y es compatible con las cuatro tinciones aplicadas, y FOCM la cual es una técnica muy simple y rápida que muestra un gran poder de aclaramiento mientras conserva el tejido similar al natural. Las técnicas de aclaramiento óptico junto a las técnicas de reconstrucción 3D de imágenes conforman una poderosa herramienta para obtener información clara y precisa de la estructura de tejido hepático. Esta información sirve como la base para alimentar modelos matemáticos funcionales que describan el comportamiento de los sistemas biológicos.



BIBLIOGRAFÍA

- Avilov, S. V. (2021). Navigating across multi-dimensional space of tissue clearing parameters. *Methods and Applications in Fluorescence*, 9(2).
<https://doi.org/10.1088/2050-6120/abe6fb>
- Cai, R., Pan, C., Ghasemigharagoz, A., Todorov, M. I., Förstera, B., Zhao, S., Bhatia, H. S., Parra-Damas, A., Mrowka, L., Theodorou, D., Rempfler, M., Xavier, A. L. R., Kress, B. T., Benakis, C., Steinke, H., Liebscher, S., Bechmann, I., Liesz, A., Menze, B., ... Ertürk, A. (2019). Panoptic imaging of transparent mice reveals whole-body neuronal projections and skull–meninges connections. *Nature Neuroscience*, 22(2), 317–327.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0301-3>
- Chen, L., Li, G., Li, Y., Li, Y., Zhu, H., Tang, L., & French, P. (2017). UbasM : An effective balanced optical clearing method for intact biomedical imaging. *Scientific Reports*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12484-3>
- Chung, K., Wallace, J., Kim, S. Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A. S., Davidson, T. J., Mirzabekov, J. J., Zalocusky, K. A., Mattis, J., Denisin, A. K., Pak, S., Bernstein, H., Ramakrishnan, C., Grosenick, L., Gradinaru, V., & Deisseroth, K. (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, 497(7449), 332–337.
<https://doi.org/10.1038/nature12107>
- Costa, E. C., Silva, D. N., Moreira, A. F., & Correia, I. J. (2019). Optical clearing methods: An overview of the techniques used for the imaging of 3D spheroids. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(10), 2742–2763.
<https://doi.org/10.1002/bit.27105>
- Dodt, H. U., Leischner, U., Schierloh, A., Jährling, N., Mauch, C. P., Deininger, K., Deussing, J. M., Eder, M., Zieglgänsberger, W., & Becker, K. (2007). Ultramicroscopy: Three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nature Methods*, 4(4), 331–336.
<https://doi.org/10.1038/nmeth1036>
- Du, H., Hou, P., Wang, L., Wang, Z., & Li, Q. (2019). Modified CLARITY Achieving Faster and Better Intact Mouse Brain Clearing and Immunostaining. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46814-4>
- Ertürk, A., Becker, K., Jährling, N., Mauch, C. P., Hojer, C. D., Egen, J. G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., & Dodt, H. U. (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nature Protocols*, 7(11), 1983–1995.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2012.119>

Garvalov, B. K., & Ertürk, A. (2017). Seeing whole-tumour heterogeneity. *Nature Biomedical Engineering*, 1(10), 773–774. <https://doi.org/10.1038/s41551-017-0150-5>

Greenbaum, A., Chan, K. Y., Dobрева, T., Brown, D., Balani, D. H., Boyce, R., Kronenberg, H. M., McBride, H. J., & Gradinaru, V. (2017). Bone CLARITY: Clearing, imaging, and computational analysis of osteoprogenitors within intact bone marrow. *Science Translational Medicine*, 9(387). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah6518>

Hägerling, R., Drees, D., Scherzinger, A., Dierkes, C., Martin-Almedina, S., Butz, S., Gordon, K., Schäfers, M., Hinrichs, K., Ostergaard, P., Vestweber, D., Goerge, T., Mansour, S., Jiang, X., Mortimer, P. S., & Kiefer, F. (2017). VIPAR, a quantitative approach to 3D histopathology applied to lymphatic malformations. *JCI Insight*, 2(16), 1–14. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93424>

Hahn, C., Becker, K., Saghafi, S., Pende, M., Avdibašić, A., Foroughipour, M., Heinz, D. E., Wotjak, C. T., & Dodt, H. U. (2019). High-resolution imaging of fluorescent whole mouse brains using stabilised organic media (sDISCO). *Journal of Biophotonics*, March, 1–10. <https://doi.org/10.1002/jbio.201800368>

Hama, H., Hioki, H., Namiki, K., Hoshida, T., Kurokawa, H., Ishidate, F., Kaneko, T., Akagi, T., Saito, T., Saido, T., & Miyawaki, A. (2015). ScaleS: An optical clearing palette for biological imaging. *Nature Neuroscience*, 18(10), 1518–1529. <https://doi.org/10.1038/nn.4107>

Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., & Miyawaki, A. (2011). Scale: A chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nature Neuroscience*, 14(11), 1481–1488. <https://doi.org/10.1038/nn.2928>

Hou, B., Zhang, D., Zhao, S., Wei, M., Yang, Z., Wang, S., Wang, J., Zhang, X., Liu, B., Fan, L., Li, Y., Qiu, Z., Zhang, C., & Jiang, T. (2015). Scalable and Dil-compatible optical clearance of the mammalian brain. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00019>

Huang, J., Brenna, C., Khan, A. ul M., Daniele, C., Rudolf, R., Heuveline, V., & Gretz, N. (2019). A cationic near infrared fluorescent agent and ethyl-cinnamate tissue clearing protocol for vascular staining and imaging. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36741-1>

- Huang, K. (2020). *Comparing the capacity of the CUBIC and 3DISCO clearing methods for studying whole-brain vasculature* Kemo Huang. April, 55.
- Jing, D., Zhang, S., Luo, W., Gao, X., Men, Y., Ma, C., Liu, X., Yi, Y., Bugde, A., Zhou, B. O., Zhao, Z., Yuan, Q., Feng, J. Q., Gao, L., Ge, W. P., & Zhao, H. (2018). Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the pegasos method. *Cell Research*, 28(8), 803–818. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0049-z>
- Ke, M. T., Fujimoto, S., & Imai, T. (2013). SeeDB: A simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nature Neuroscience*, 16(8), 1154–1161. <https://doi.org/10.1038/nn.3447>
- Ke, M. T., Nakai, Y., Fujimoto, S., Takayama, R., Yoshida, S., Kitajima, T. S., Sato, M., & Imai, T. (2016). Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing Agent. *Cell Reports*, 14(11), 2718–2732. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.057>
- Kim, S. Y., Cho, J. H., Murray, E., Bakh, N., Choi, H., Ohn, K., Ruelas, L., Hubbert, A., McCue, M., Vassallo, S. L., Keller, P. J., & Chung, K. (2015). Stochastic electrotransport selectively enhances the transport of highly electromobile molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(46), E6274–E6283. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510133112>
- Klingenberg, M., Groß, M., Goyal, A., Polycarpou-Schwarz, M., Miersch, T., & Ernst, A.-S. and etal. (2017). The lncRNA CASC9 and RNA binding protein HNRNPL form a complex and co-regulate genes linked to AKT signaling. *Hepatology*, 77(5), 1–36. <https://doi.org/10.1002/hep>
- Kremers, G. J., Gilbert, S. G., Cranfill, P. J., Davidson, M. W., & Piston, D. W. (2011). Fluorescent proteins at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(15), 2676. <https://doi.org/10.1242/jcs.095059>
- Kuwajima, T., Sitko, A. A., Bhansali, P., Jurgens, C., Guido, W., & Mason, C. (2013). ClearT: A detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Development (Cambridge)*, 140(6), 1364–1368. <https://doi.org/10.1242/dev.091844>
- Lai, J. H., Liao, E. Y., Liao, Y. H., & Sun, C. K. (2021). Investigating the optical clearing effects of 50% glycerol in ex vivo human skin by harmonic generation microscopy. *Scientific Reports*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77889-z>

- Lee, E., Choi, J., Jo, Y., Kim, J. Y., Jang, Y. J., Lee, H. M., Kim, S. Y., Lee, H., Cho, K., Jung, N., Hur, E. M., & Jeong, S. J. (2016). Erratum: ACT-PRESTO: Rapid and consistent tissue clearing and labeling method for 3-dimensional (3D) imaging (*Scientific Reports* (2016) 6 (18631) DOI: 10.1038/srep18631). *Scientific Reports*, 6, 3–4. <https://doi.org/10.1038/srep31940>
- Li, W., Germain, R. N., & Gerner, M. Y. (2017). Multiplex, quantitative cellular analysis in large tissue volumes with clearing-enhanced 3D microscopy (Ce3D). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(35), E7321–E7330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708981114>
- Meyer, K., Ostrenko, O., Bourantas, G., Morales-Navarrete, H., Porat-Shliom, N., Segovia-Miranda, F., Nonaka, H., Ghaemi, A., Verbavatz, J. M., Bruschi, L., Sbalzarini, I., Kalaidzidis, Y., Weigert, R., & Zerial, M. (2017). A Predictive 3D Multi-Scale Model of Biliary Fluid Dynamics in the Liver Lobule. *Cell Systems*, 4(3), 277-290.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.02.008>
- Morales-Navarrete, H., Nonaka, H., Scholich, A., Segovia-Miranda, F., de Back, W., Meyer, K., Bogorad, R. L., Koteliansky, V., Bruschi, L., Kalaidzidis, Y., Jülicher, F., Friedrich, B. M., & Zerial, M. (2019). Liquid-crystal organization of liver tissue. *ELife*, 8, 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.44860>
- Morales-Navarrete, H., Segovia-Miranda, F., Klukowski, P., Meyer, K., Nonaka, H., Marsico, G., Chernykh, M., Kalaidzidis, A., Zerial, M., & Kalaidzidis, Y. (2015). A versatile pipeline for the multi-scale digital reconstruction and quantitative analysis of 3D tissue architecture. *ELife*, 4(DECEMBER2015), 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.11214>
- Murray, E., Cho, J. H., Goodwin, D., Ku, T., Swaney, J., Kim, S. Y., Choi, H., Park, Y. G., Park, J. Y., Hubbert, A., McCue, M., Vassallo, S., Bakh, N., Frosch, M. P., Wedeen, V. J., Seung, H. S., & Chung, K. (2015). Simple, Scalable Proteomic Imaging for High-Dimensional Profiling of Intact Systems. *Cell*, 163(6), 1500–1514. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.025>
- Oh, S. W., Harris, J. A., Ng, L., Winslow, B., Cain, N., Mihalas, S., Wang, Q., Lau, C., Kuan, L., Henry, A. M., Mortrud, M. T., Ouellette, B., Nguyen, T. N., Sorensen, S. A., Slaughterbeck, C. R., Wakeman, W., Li, Y., Feng, D., Ho, A., ... Zeng, H. (2014). A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, 508(7495), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature13186>
- Pan, C., Cai, R., Quacquarelli, F. P., Ghasemigharagoz, A., Lourdopoulos, A.,

- Matryba, P., Plesnila, N., Dichgans, M., Hellal, F., & Ertürk, A. (2016). Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nature Methods*, 13(10), 859–867. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3964>
- Park, Y. G., Sohn, C. H., Chen, R., McCue, M., Yun, D. H., Drummond, G. T., Ku, T., Evans, N. B., Oak, H. C., Trieu, W., Choi, H., Jin, X., Lilascharoen, V., Wang, J., Truttmann, M. C., Qi, H. W., Ploegh, H. L., Golub, T. R., Chen, S. C., ... Chung, K. (2019). Protection of tissue physicochemical properties using polyfunctional crosslinkers. *Nature Biotechnology*, 37(1), 73. <https://doi.org/10.1038/nbt.4281>
- Qi, Y., Yu, T., Xu, J., Wan, P., Ma, Y., Zhu, J., Li, Y., Gong, H., Luo, Q., & Zhu, D. (2019). FDISCO: Advanced solvent-based clearing method for imaging whole organs. *Archivio Di Studi Urbani e Regionali*, 48(122), 1–14. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau8355>
- Renier, N., Wu, Z., Simon, D. J., Yang, J., Ariel, P., & Tessier-Lavigne, M. (2014). IDISCO: A simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*, 159(4), 896–910. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.010>
- Richardson, D. S., & Lichtman, J. W. (2015). Clarifying Tissue Clearing. *Cell*, 162(2), 246–257. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.067>
- Rylander, C. G., Stumpp, O. F., Milner, T. E., Kemp, N. J., Mendenhall, J. M., Diller, K. R., & Welch, A. J. (2006). Dehydration mechanism of optical clearing in tissue. *Journal of Biomedical Optics*, 11(4), 041117. <https://doi.org/10.1117/1.2343208>
- Salazar, L., & Moreno, F. (2016). Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar. *Salutem Scientia Spiritus*, 2(2), 12–23.
- Segovia-Miranda, F., Morales-Navarrete, H., Kücken, M., Moser, V., Seifert, S., Repnik, U., Rost, F., Brosch, M., Hendricks, A., Hinz, S., Röcken, C., Lütjohann, D., Kalaidzidis, Y., Schafmayer, C., Bruschi, L., Hampe, J., & Zerial, M. (2019). Three-dimensional spatially resolved geometrical and functional models of human liver tissue reveal new aspects of NAFLD progression. *Nature Medicine*, 25(12), 1885–1893. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0660-7>
- Staudt, T., Lang, M. C., Medda, R., Engelhardt, J., & Hell, S. W. (2007). 2,2'-Thiodiethanol: A new water soluble mounting medium for high resolution

- optical microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 70(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1002/jemt.20396>
- Susaki, E. A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., & Tawara, T. (2014). Resource Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis. *CELL*, 157(3), 726–739.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.042>
- Tanaka, N., Kanatani, S., Tomer, R., Sahlgren, C., Kronqvist, P., Kaczynska, D., Louhivuori, L., Kis, L., Lindh, C., Mitura, P., Stepulak, A., Corvigno, S., Hartman, J., Micke, P., Mezheyeuski, A., Strell, C., Carlson, J. W., Fernández Moro, C., Dahlstrand, H., ... Uhlén, P. (2017). Whole-tissue biopsy phenotyping of three-dimensional tumours reveals patterns of cancer heterogeneity. *Nature Biomedical Engineering*, 1(10), 796–806.
<https://doi.org/10.1038/s41551-017-0139-0>
- Tian, T., Yang, Z., & Li, X. (2020). Tissue clearing technique: Recent progress and biomedical applications. *Journal of Anatomy*, August, 1–19.
<https://doi.org/10.1111/joa.13309>
- Tomer, R., Ye, L., Hsueh, B., & Deisseroth, K. (2014). Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nature Protocols*, 9(7), 1682–1697. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.123>
- Treyer, A., & MÜsch, A. (2013). Hepatocyte Polarity Aleksandr. *Compr Physiol.*, 3(1), 243–287. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120009.Hepatocyte>
- Tuchin, V. V. (2005). Optical clearing of tissues and blood using the immersion method. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 38(15), 2497–2518.
<https://doi.org/10.1088/0022-3727/38/15/001>
- Ueda, H. R., Ertürk, A., Chung, K., Gradinaru, V., Chédotal, A., Tomancak, P., & Keller, P. J. (2020). Tissue clearing and its applications in neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(2), 61–79. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0250-1>
- Wang, L., & Boyer, J. L. (2004). The Maintenance and Generation of Membrane Polarity in Hepatocytes. *Hepatology*, 39(4), 892–899.
<https://doi.org/10.1002/hep.20039>
- Xu, J., Ma, Y., Yu, T., & Zhu, D. (2019). Quantitative assessment of optical clearing methods in various intact mouse organs. *Journal of Biophotonics*, 12(2).
<https://doi.org/10.1002/jbio.201800134>

- Yamaguchi, M., Yoshihara, K., Yachida, N., Suda, K., Tamura, R., Ishiguro, T., & Enomoto, T. (2021). The New Era of Three-Dimensional Histoarchitecture of the Human Endometrium. *Journal of Personalized Medicine*, 11(8), 713. <https://doi.org/10.3390/jpm11080713>
- Yang, B., Treweek, J. B., Kulkarni, R. P., Deverman, B. E., Chen, C. K., Lubeck, E., Shah, S., Cai, L., & Gradinaru, V. (2014). Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell*, 158(4), 945–958. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.017>
- Yu, T., Zhu, J., Li, Y., Ma, Y., Wang, J., Cheng, X., Jin, S., Sun, Q., Li, X., Gong, H., Luo, Q., Xu, F., Zhao, S., & Zhu, D. (2018). RTF: A rapid and versatile tissue optical clearing method. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20306-3>
- Zhu, D., Larin, K. V., Luo, Q., & Tuchin, V. V. (2013). Recent progress in tissue optical clearing. *Laser and Photonics Reviews*, 7(5), 732–757. <https://doi.org/10.1002/lpor.201200056>
- Zhu, X., Huang, L., Zheng, Y., Song, Y., Xu, Q., Wang, J., Si, K., Duan, S., & Gong, W. (2019). Ultrafast optical clearing method for three-dimensional imaging with cellular resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 166(23), 11480–11489. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819583116>