

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA
CURSO 2020-21
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE



Autor: Ángel Eduardo Parra Sánchez

Tutores: Dr. Eduardo Fernández Jover y Dra. Gema Martínez Navarrete

D. EDUARDO FERNÁNDEZ JOVER, Catedrático de Universidad y Director del grupo de Neuroingeniería Biomédica y Neuroprótesis del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche y

D. GEMA MARTÍNEZ NAVARRETE, Doctora en Biología del grupo de Neuroingeniería Biomédica y Neuroprótesis del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado:

“MÉTODO DE ACLARAMIENTO ÓPTICO PARA VISUALIZACIÓN DE
FLUORESCENCIA DE TEJIDOS NEURONAL Y VASCULAR EN LSFM Y SU
COMPARACIÓN CON LSCM Y SIM”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

D. ÁNGEL EDUARDO PARRA SÁNCHEZ

ha sido realizado bajo nuestra supervisión en la Unidad de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual, del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández, estimando que se encuentra concluido y en condiciones de ser presentado y defendido públicamente.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 21 de junio de 2021.

Fdo. Prof. Dr. Eduardo Fernández Jover

Fdo. Dra. Gema Martínez Navarrete

AGRADECIMIENTOS

Con especial agradecimiento a Mi Familia, a la Fundación Carolina por brindarme esta maravillosa oportunidad, a la Universidad Miguel Hernández, mis Directores de Máster en Biotecnología y Bioingeniería Luis y Paloma, mis Tutores de TFM Eduardo y Gema, a todo el personal del Laboratorio de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual del Instituto de Bioingeniería, compañeros y amigos...

Gracias.

RESUMEN

Los tejidos nerviosos y vascular forman intrincados circuitos y redes cuya organización se hace difícil entender a partir de cortes en dos dimensiones. Extraer información detallada con una perspectiva global de una muestra u órgano intacto ha sido un desafío fundamental en biomedicina y biotecnología, ya que en su mayoría los tejidos biológicos son opacos, lo que dificulta la penetración de la luz, restringiendo el contraste y visualización de la estructura interna. La mayoría de las técnicas de corte histológico convencional proporcionan información bidimensional sobre las estructuras anatómicas y los componentes celulares dentro de las muestras de tejidos, sin embargo, estos son prácticamente tridimensionales, por lo que se hace necesario visualizar su forma tridimensional. Con el objetivo de optimizar un método de aclaramiento óptico para visualización de tejidos neuronal y vascular inmunomarcados en su forma tridimensional en *Light-Sheet Fluorescence Microscopy* (LSFM), se probaron varios protocolos de aclaramiento hidrofóbicos e hidrofílicos para obtener una transparencia de cerebros y ojos de ratones C57BL/6 y ratas Long-Evans (Métodos CLARITY, 3DISCO y Etanol-ECi), así como muestras enteras de retinas no aclaradas. Con modificaciones del método Etanol-ECi se logró obtener una alta eficacia de aclaramiento, a partir de la cual se pudieron adquirir imágenes en LSFM y contrastarlas con imágenes de muestras adquiridas con *Laser-Scanning Confocal Microscopy* (LCFM) y *Structured Illumination Microscopy* (SIM). Estas modificaciones suponen un avance en el campo de la microscopía, especialmente para el estudio de procesos relacionados con la neovascularización o la degeneración neuronal.

Palabras clave: Aclaramiento óptico, Etanol-ECi, tejidos neuronales y vasculares, LSFM.

ABSTRACT

The nervous and vascular tissues form intricate circuits and networks whose organization is difficult to understand from two-dimensional cuts. Extracting detailed information with a global perspective of an intact sample or organ has been a fundamental challenge in biomedicine and biotechnology, since most biological tissues are opaque, which makes it difficult for light to penetrate, restricting contrast and visualization of the internal structure. Most conventional histological cutting techniques provide two-dimensional information on the anatomical structures and cellular components within the tissue samples; however, these structures are practically three-dimensional. In order to optimize an optical clearance method for visualization of immunolabelled neuronal and vascular tissues in their three-dimensional form in Light-Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM), various hydrophobic and hydrophilic clearance protocols were tested to obtain transparency of brains and eyes of C57BL / 6 mice and Long-Evans rats (CLARITY, 3DISCO and Ethanol-ECi methods), as well as whole unclear retinal samples. With modifications of the Ethanol-ECi method, it was possible to obtain a high clearance efficiency, from which images were acquired in LSFM and compared with images of samples acquired with Laser-Scanning Confocal Microscopy (LCFM) and Structured Illumination Microscopy (SIM). These modifications represent an advancement in the field of microscopy, especially for the study of processes related to neovascularization or neuronal degeneration.

Keywords: Optical clearance, Ethanol-ECi, neuronal and vascular tissues, LSFM.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	9
Tejido Biológico	9
Tipos de Tejidos.....	9
Aclaramiento de tejidos.....	9
<i>Aclaramiento de tejido hidrofóbico</i>	10
<i>Aclaramiento de tejido hidrófilo</i>	10
<i>Aclaramiento de tejido a base de hidrogel</i>	10
Inmunomarcaje.....	11
Microscopía de Fluorescencia.....	12
Laser-Scanning Confocal Microscopy (LSCM).....	12
Structured Illumination Microscopy (SIM-ApoTome).....	13
Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM)	13
Aplicaciones en Neurociencia	15
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	18
1. Tipo de Investigación.....	18
2. Materiales y suministros	18
3. Animales y preparación de la muestra	19
4. Aclaramiento de tejidos a base de hidrogel (CLARITY)	19
5. Aclaramiento de tejidos a través de solventes orgánicos (3DISCO)	20
6. Aclaramiento de tejidos a través de solventes orgánicos (Etanol-ECi)	20
6.1. Blanqueamiento.....	20
6.2. Inmunomarcaje	20
6.3. Deshidratación y aclaramiento.....	21
6.4. Análisis de eficacia de aclaramiento del método Etanol-ECi.....	22
6.5. Adquisición de imágenes en 3D con Light-Sheet Fluorescence Microscopy Z.1 ..	22
6.6. Adquisición de imágenes LSCM y SIM.....	23
RESULTADOS	24
1. Aclaramiento de tejidos a base de hidrogel (CLARITY)	24
2. Aclaramiento de tejidos a base de solventes orgánicos (3DISCO).....	24
3. Aclaramiento de tejidos a través de solventes orgánicos. Método Etanol-ECi	25
3.1. Eficacia de aclaramiento	27

4. Imágenes 3D en LSFM y comparación con LSCM y SIM	28
DISCUSION	31
CONCLUSIONES	36
PERSPECTIVAS FUTURAS	37
BIBLIOGRAFÍA	38
APÉNDICE	41

ABREVIATURAS

RI, del inglés *Refractive Index*

GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*

CFP, del inglés *Cyan Fluorescent Protein*

YFP, del inglés *Yellow Fluorescent Protein*

RFP, del inglés *Red Fluorescent Protein*

iDISCO, del inglés *Immunolabelling Imaging of Solvent-Cleared Organs*

FDISCO, del inglés *Fluorescence Imaging of Solvent-Cleared Organs*

CD31, del inglés *Cluster of differentiation 31*

LSFM, del inglés *Light-Sheet Fluorescence Microscopy*

LSCM, del inglés *Láser-Scanning Confocal Microscopy*

SIM, del inglés *Structured Illumination Microscopy*

PBS, del inglés *Phosphate Buffer Saline*

PFA, Paraformaldehído

SDS, del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*

THF, Tetrahidrofurano

DCM, Diclorometano

ECi, Etil Cinamato

DMSO, DimetilSulfóxido

SD, del inglés *Standard deviation*

INTRODUCCIÓN

Tejido Biológico

El tejido es un nivel de organización celular entre las células y un órgano completo, es decir, un conjunto de células similares en la que la matriz extracelular es del mismo origen, y juntas cumplen una función específica. El estudio de tejidos humanos y animales se conoce como histología o, en relación con la enfermedad, como histopatología, técnica que ha tenido mucha importancia para las investigaciones y diagnóstico de enfermedades, pero limitada en cuanto a la observación tridimensional de los tejidos (Ross y Wojciech, 2016).

Tipos de Tejidos

Los tejidos animales se agrupan en cuatro tipos básicos: conectivo, muscular, nervioso y epitelial. Los tejidos epiteliales están formados por células que cubren las superficies de los órganos, como la superficie de la piel, las vías respiratorias, las superficies de los órganos blandos, el tracto reproductivo y el revestimiento interno del tracto digestivo. Los tejidos conectivos son tejidos fibrosos, formados por células separadas, que se denominan matriz extracelular, la cual puede ser líquida o sólida. Por otra parte, las células musculares forman el tejido contráctil activo del cuerpo conocido como tejido muscular y, por último, las células que comprenden el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico se clasifican como tejido nervioso (o neural). Dentro del sistema nervioso central, los tejidos neurales forman el cerebro y la médula espinal. En el sistema nervioso periférico, los tejidos neurales forman los nervios craneales y los nervios espinales, incluidas las neuronas motoras (Ross y Wojciech, 2016).

Aclaramiento de tejidos

El sistema nervioso es el más complejo ya que está formado por cientos de tipos celulares que forman intrincados circuitos y redes, cuya organización es extremadamente difícil de entender a partir de cortes en dos dimensiones (2D) (Ueda et al., 2020). La extracción detallada de información con una perspectiva global de una muestra biológica intacta ha sido un desafío fundamental en biomedicina, ya que los tejidos biológicos son en su mayoría opacos, lo que dificulta la penetración de la luz en el tejido profundo y restringe la profundidad y el contraste de la imagen (Zhu et al., 2013). La mayoría de las técnicas de corte histológico convencional proporcionan información bidimensional sobre las estructuras anatómicas y los componentes celulares dentro de las muestras de tejido (Seo et al., 2016), sin embargo, los

tejidos son prácticamente tridimensionales, por lo que es necesario visualizar de forma tridimensional (3D).

Hasta ahora, se manejan tres enfoques principales de aclaramiento de tejidos: métodos hidrófobos, hidrófilos y basados en hidrogel (Susaki et al., 2016; Tainaka et al., 2016). Estos métodos, en general, eliminan lípidos (deslipidación), pigmentos (decoloración), y fosfato de calcio (descalcificación), teniendo como objetivo igualar el índice de refracción (RI) de las muestras y los medios de imagen utilizados (Ueda et al., 2020).

Aclaramiento de tejido hidrofóbico

Los métodos de aclaramiento implican el uso de disolventes orgánicos y, a menudo, proporcionan una transparencia completa de una muestra intacta rápidamente (Vigouroux et al., 2017). Dado que en estos casos de hidrofobicidad el tiempo del procesamiento es muy corto y sencillo, las muestras sólo necesitan la incubación secuencial en diferentes soluciones deshidratantes para luego deslipidar y, por tanto, aclarar (Figura 1a) (Ueda et al., 2020). Una ventaja importante del aclarado a base de solventes orgánicos es la conservación permanente de las muestras, debido al endurecimiento de los tejidos aclarados, lo cual permite múltiples sesiones de imágenes y un nuevo análisis a largo plazo de las muestras, especialmente mediante métodos de inmunomarcaje, que pueden estabilizar permanentemente la señal fluorescente endógena (Cai et al., 2019).

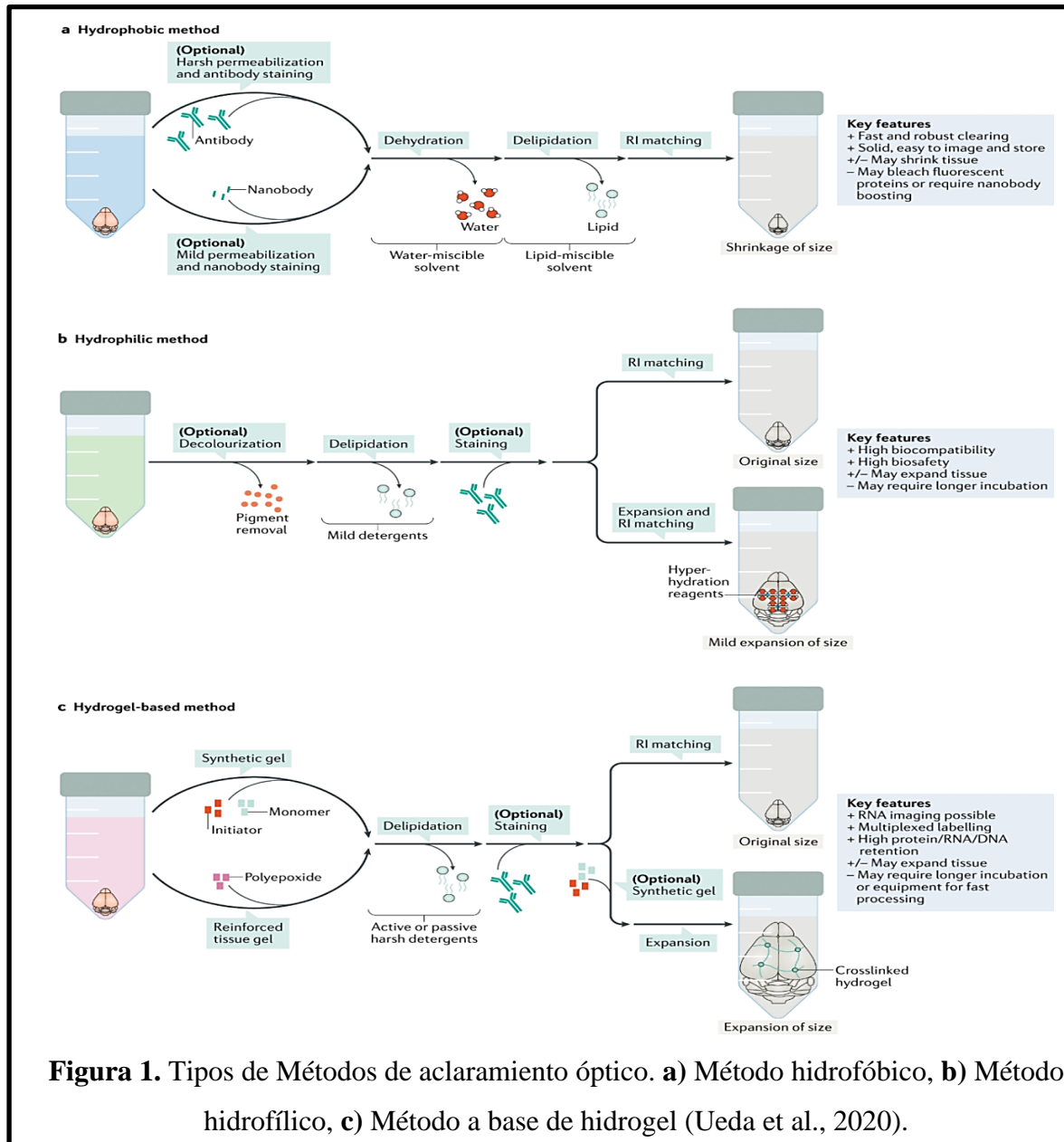
Aclaramiento de tejido hidrófilo

Las técnicas de aclaramiento utilizan reactivos solubles en agua para la limpieza de tejidos. Los reactivos hidrófilos suelen formar enlaces de hidrógeno con componentes de los tejidos, como las proteínas, así como con las moléculas de agua circundantes, lo que puede ayudar a preservar la estructura tridimensional de los componentes del tejido y, por tanto, la señal de las proteínas fluorescentes (Figura 1b). Incluso, al ser solubles en agua se pueden utilizar como un medio de adaptación del índice de refracción para que este sea más alto y poder igualar al RI del tejido. La deslipidación en algunos métodos de limpieza de tejidos hidrófilos crea espacio para que sustancias grandes, como los anticuerpos, penetren más rápida y profundamente en los tejidos, lo que permite la inmunohistoquímica 3D en muestras grandes (Ueda et al., 2020).

Aclaramiento de tejido a base de hidrogel

Este método permite la eliminación completa y uniforme de los lípidos del tejido, mientras minimiza el daño estructural y la pérdida de biomoléculas, dándose además una unión

covalente entre las moléculas del tejido con la base de hidrogel que es el acrílo (Figura 1c). Se basa principalmente en una limpieza pasiva con tiempos de duración muy largos y otra mediada por electroforesis para reducir estos tiempos. Cuanto más grande sea la muestra, mayor será el tiempo de aclarado, tal como ocurre en todos los métodos pasivos (Chung et al., 2013).



Inmunomarcaje

Tanto el aclarado de tejidos hidrofóbico, hidrofílico y basados en hidrogel son compatibles con el estudio de tejido mediante técnicas inmunohistoquímicas basadas en la unión de anticuerpos específicos a determinadas dianas de órganos intactos. Los métodos de

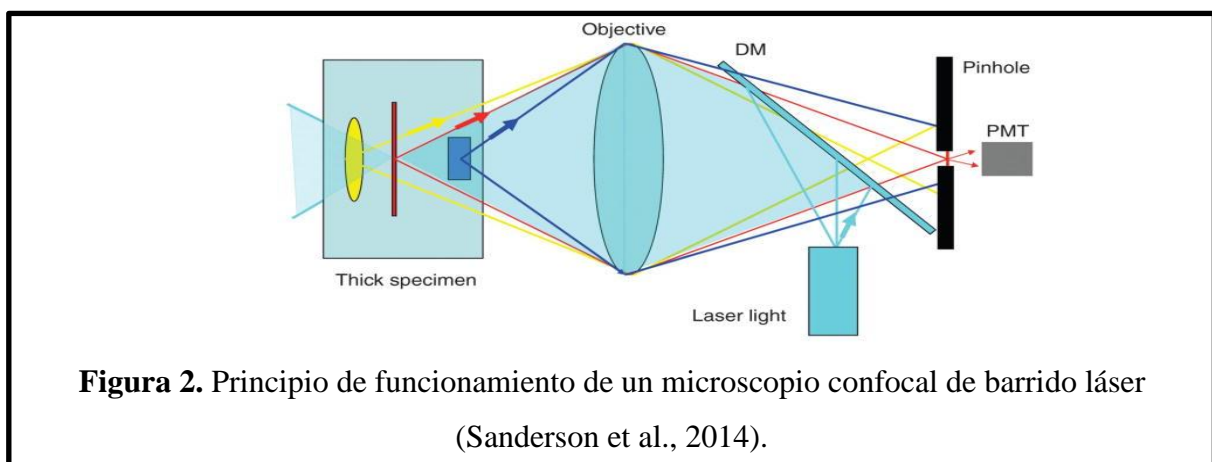
limpieza de tejidos han sido particularmente útiles para rastrear proyecciones de largo alcance en el SNC y el sistema nervioso periférico, maximizando su impacto, al complementarlo con métodos de inmunomarcaje para resaltar, por ejemplo, circuitos deseados o secciones específicas (Ueda et al., 2020). Debido a la variabilidad de protocolos y reactivos utilizados, las técnicas inmunohistoquímicas pueden realizarse preaclaramiento o postaclaramiento.

Microscopía de Fluorescencia

La microscopía de fluorescencia (MF) es una herramienta importante para monitorizar la fisiología celular y, aunque los conceptos de fluorescencia y su separación óptica mediante filtros siguen siendo similares, el diseño del microscopio varía con el objetivo de aumentar el contraste de la imagen y la resolución espacial, utilizando una variedad de indicadores fluorescentes. Sin embargo, está sujeta a limitaciones físicas prácticas, siendo la más importante la resolución. En consecuencia, la mayoría de los avances recientes con la MF han buscado mejorar la calidad de la imagen (abordando este problema) que está determinada por el contraste de la imagen y la difracción de la luz dentro de los sistemas ópticos (Sanderson et al., 2014).

Laser-Scanning Confocal Microscopy (LSCM)

Esta técnica permite obtener imágenes de alta resolución en tejidos gruesos. La microscopía confocal proporciona un medio para descartar la luz desenfocada del detector de manera que aumenta la nitidez de las imágenes que se recopilan. En un microscopio confocal, la óptica de iluminación y detección se enfoca en el mismo punto limitado por difracción en la muestra, que es el único punto reflejado por el detector durante una exploración confocal (Figura 2). Para generar una imagen completa, el punto debe moverse sobre la muestra y los datos recolectados punto por punto. Una ventaja significativa es la sección óptica proporcionada, que permite la reconstrucción en 3D de una muestra a partir de pilas de imágenes de alta resolución (Elliott, 2020).



Structured Illumination Microscopy (SIM-ApoTome)

Este microscopio es utilizado para aumentar la resolución axial de microscopía de fluorescencia de muestras gruesas mediante iluminación estructurada. El SIM-Apotome permite crear secciones ópticas de muestras fluorescentes, libres de luz difusa, en donde sólo el plano focal aparecerá en la imagen. El sistema calcula la sección óptica a partir de tres imágenes con diferentes posiciones de cuadrícula sin retardo (Figura 3), evitando la dispersión de la luz desenfocada, incluso en los especímenes más gruesos (Zeiss, 2021).

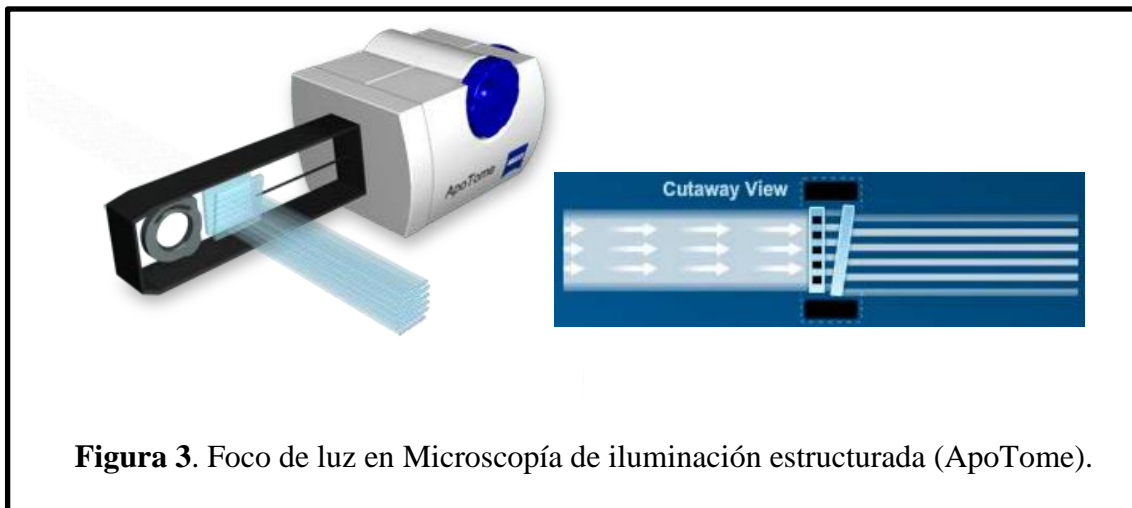


Figura 3. Foco de luz en Microscopía de iluminación estructurada (ApoTome).

Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM)

Todos los métodos de aclaramiento requieren microscopios capaces de obtener imágenes rápidas y de alta resolución de grandes volúmenes. La microscopía de lámina de luz, o también llamada Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM), es clave para este fin ya que se basa en iluminar la muestra con una delgada hoja de luz láser desde el lateral para adquirir una imagen de plano iluminado (Figura 4) (Ueda et al., 2020).

En comparación con la microscopía convencional, este enfoque ofrece dos ventajas principales: la velocidad de obtención de imágenes está limitada solo por la tasa de adquisición de la cámara y, por lo tanto, se pueden lograr velocidades de datos excepcionalmente altas; y los efectos de fotoblanqueo y fototóxicos se mantienen al mínimo, ya que solo el plano en el foco del sistema de detección se ilumina con luz láser (Tabla 1) (Ueda et al., 2020). Además, una gran ventaja es que permite analizar muestras enteras, trozos de tejido y órganos sin ser cortados, con el fin de poder analizar toda la estructura intacta de la muestra.

En 2007 se aplicó por primera vez este tipo de microscopía para obtener imágenes de tejido aclarado (Dodt et al., 2007), surgiendo luego productos comerciales como el Ultramicroscopio La Vision BioTec® o Light-Sheet Microscopy Zeiss 1® (Figura 2), haciéndose compatibles con muchos métodos de limpieza y aclaramiento de tejidos. Sin embargo, aun cuando las muestras aclaradas son excepcionalmente transparentes, la variabilidad espacial restante en el RI o los pequeños desajustes en los RI de la muestra y el medio de imagen pueden perturbar la trayectoria de la luz tanto en la iluminación de la hoja de luz como en la detección de fluorescencia.

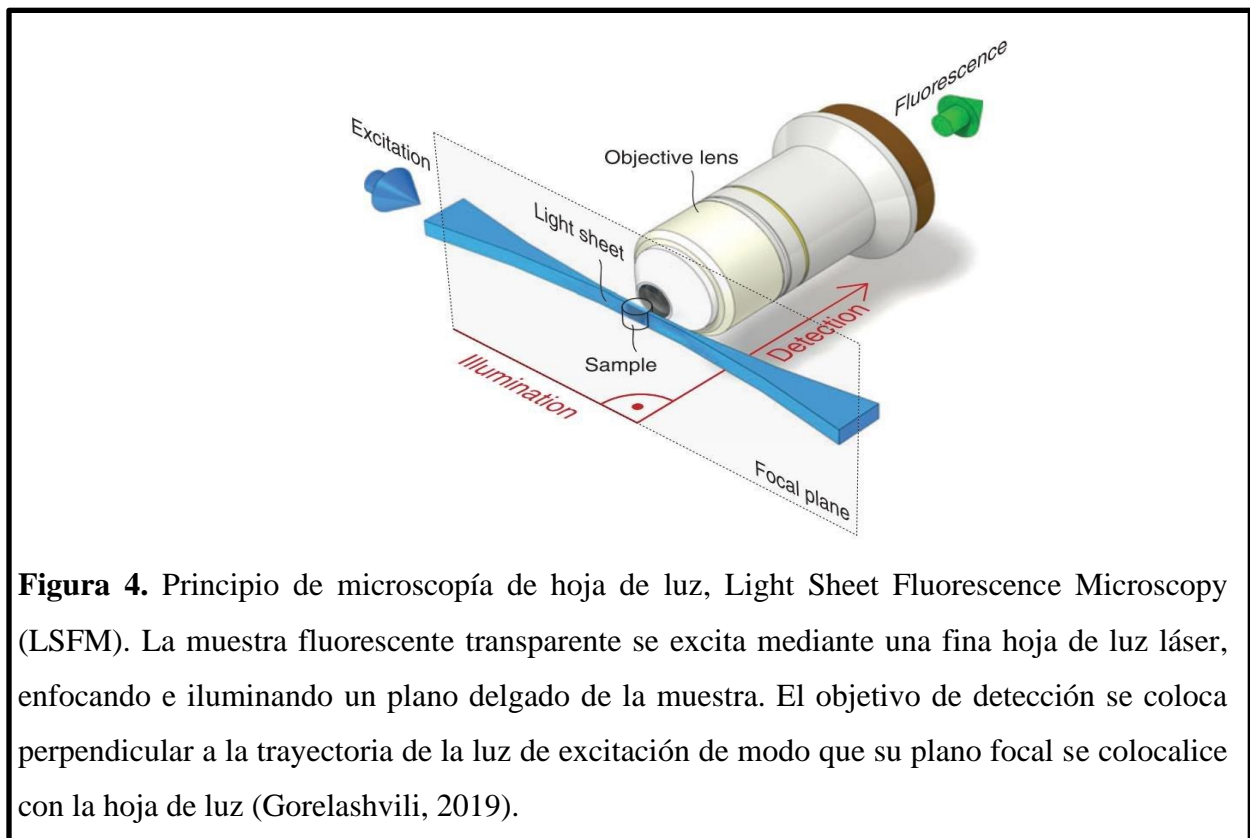


Figura 4. Principio de microscopía de hoja de luz, Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM). La muestra fluorescente transparente se excita mediante una fina hoja de luz láser, enfocando e iluminando un plano delgado de la muestra. El objetivo de detección se coloca perpendicular a la trayectoria de la luz de excitación de modo que su plano focal se colocalice con la hoja de luz (Gorelashvili, 2019).

Tabla 1. Comparación de LSFM con otras técnicas de Microscopía de Fluorescencia.

	LSFM	LSCM	SIM-Apotome
Fotoblanqueo	Bajo	Alto	Medio
Tiempo de proceso	30-50 veces más rápido	Lento	Rápido
Rango dinámico	Alto	Bajo	Medio
Obtención de la imagen	Experimentos de mosaico posibles para obtener imágenes de un área de muestra grande	La obtención de imágenes en varios colores es fácil, pero puede disminuir la velocidad de adquisición.	Multicanal, Z Stack. Adquisición de grandes secciones.

Aplicaciones en Neurociencia

Las imágenes ópticas tienen ventajas importantes, como la posibilidad de visualizar el sistema nervioso en muchas escalas de longitud: desde la sinapsis única hasta el cerebro completo (Corsetti et al., 2019). La combinación de LSFM con herramientas computacionales avanzadas ha permitido el fenotipado celular, el mapeo de la dinámica de expresión génica para embriones completos y el estudio del desarrollo del SNC (Tomer et al., 2012). Se ha aplicado también para comprender mejor la dinámica de la interacción neurona-glia durante la regeneración neuronal como consecuencia de una lesión en el sistema nervioso (Xiao, et al., 2015).

Aunque actualmente las investigaciones en biología del desarrollo y morfogénesis axonal para comprender las interacciones neuronas-células gliales tanto en cerebros como retina ha aumentado con notabilidad desde 2019, las investigaciones con LSFM no son la corriente principal en este momento, por lo que se necesita ampliar las investigaciones en este campo y poder generar la mejor técnica para visualizar tejidos neuronales en 3D. Sin embargo, técnicas de Microscopía de Fluorescencia Confocal se usan en numerosas investigaciones de este tipo por la calidad de la imagen bidimensional que proporciona en muestras procesadas mediante técnicas de inmunohistoquímica convencional.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Las técnicas de MF han sido prometedoras y muy útiles desde los inicios en el campo de la investigación. Actualmente, los métodos de aclarado de tejidos permiten obtener imágenes en 3D de tejidos intactos, en donde la nitidez de la imagen dependerá del método usado.

Ertürk y colaboradores en 2012 desarrollaron un método de aclaramiento para varios órganos en el que incluían cerebros de ratón para visualizar neuronas en cerebro e hipocampo al que llamaron *3D imaging of solvent-cleared organs* o 3DISCO (por sus siglas en inglés), puesto que está basado en solventes orgánicos, permitiendo la reducción de tiempos de incubación, siendo compatibles con marcajes inmunológicos y fluoróforos, como *Cyan Fluorescent Protein* (CFP), *Green Fluorescent Protein* (GFP), *Yellow Fluorescent Protein* (YFP), *Red Fluorescent Protein* (RFP), entre otros (Ertürk et al., 2012). Más tarde, debido a que era necesaria la aclaración de tejidos más grandes, se optimizó un nuevo protocolo para obtener imágenes de cerebros de rata, llamado iDISCO (modificación de 3DISCO) en el cual incluyeron soluciones de lavado con detergentes y de blanqueamiento con peróxidos, con el fin de visualizar ambos hemisferios del cerebro (Branch et al., 2019). Sin embargo, debido a que este método puede reducir la fluorescencia al almacenar por tiempo, se modificó nuevamente el protocolo original y se desarrolló FDISCO, que puede preservar eficazmente la fluorescencia de varias sondas fluorescentes y puede lograr un tiempo de almacenamiento prolongado de meses, obteniendo un buen aclaramiento de cerebros (Qi et al., 2019).

Chung y Deisseroth en 2013, crearon un método con potencial relevancia para el trabajo de mapeo cerebral, construyendo estructuras a base de hidrogel en el tejido biológico para permitir la posterior eliminación de lípidos sin desmontaje mecánico del tejido. Este proceso crea un hidrogel tisular híbrido que es físicamente estable, que conserva su estructura, proteínas y ácidos nucleicos, y eso es permeable a los fotones del espectro visible y macromoléculas exógenas (Chung y Deisseroth, 2013). Posteriormente, otros investigadores hicieron algunas modificaciones simplificando el método (Poguzhelskaya et al., 2014), observando neuronas del hipocampo marcadas con GFP, y obteniendo a través de incubación pasiva de soluciones e incubación a través de cámara electroforética un aclaramiento de tejido cerebral intacto para la visualización de neuronas (Du et al., 2019).

En 2019, Henning y colaboradores, hicieron una importante publicación de un método para el aclaramiento de ojos de ratón (EyeCi o Etanol-ECi), puesto que de todos los órganos

que se habían podido aclarar en métodos anteriores, el ojo era obstáculo por la presencia del epitelio pigmentario, haciendo difícil su aclaramiento. Este protocolo incluye soluciones de blanqueamiento, deshidratación y aclaramiento que crean una transparencia eficaz (Henning et al., 2019).

En este trabajo se pretende llevar a cabo diferentes protocolos de blanqueamiento basados en solventes orgánicos y a base de hidrogel con el fin de crear un protocolo optimizado de aclaramiento a partir del desarrollado por Henning y colaboradores en 2019. Adicionalmente, se analizará mediante distintas técnicas de microscopía de fluorescencia, incluyendo el LSFM, la vasculatura y/o neovascularización en los tejidos clarificados y en retinas enteras. Por ello, el objetivo principal de este trabajo es optimizar un método de aclaramiento óptico para visualización de tejido neuronal y vascular inmunomarcados en LSFM y su comparación con otras técnicas de Microscopía de Fluorescencia.

Los objetivos específicos planteados son:

- Evaluar la transparencia de tejidos mediante la aplicación de protocolos de aclaramiento óptico a base de hidrogel y solventes orgánicos.
- Validar mediante espectrofotometría la eficacia del aclaramiento óptico de los diferentes tejidos.
- Determinar el momento óptimo para la realización de la técnica inmunohistoquímica en tejidos clarificados.
- Comparar la adquisición de imágenes de tejidos neuronal y vascular inmunomarcados entre LSFM y las técnicas de Microscopía de Fluorescencia Confocal e Iluminación estructurada (ApoTome).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Tipo de Investigación

Este trabajo está sujeto a una investigación del tipo *experimental prospectiva*, puesto que se han probado diferentes protocolos de aclaramiento para comparar su eficacia y obtener una nueva técnica optimizada (con base a un estudio reciente) que permita observar tejidos neuronales en LSM, datos que luego fueron analizados para cotejar con otras técnicas de Microscopía de Fluorescencia.

2. Materiales y suministros

Todos los compuestos químicos y reactivos usados en este estudio se listan en la Tabla 2. Las disoluciones esenciales empleadas en los distintos protocolos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 2. Químicos y reactivos usados durante el proceso de aclaramiento.

Reactivo/Material	Fuente	Referencia	Función	Protocolo
Parafolmadehído (PFA)	AlfaAesar	A11313	Fijación	Todos
PBS	Biowest	P0750	Lavado	Todos
Acrilamida 4K	PanReac-Applichem	A0951	Polimerización	CLARITY
VA-044	Sigma-Aldrich	440914	Polimerización	CLARITY
SDS	PanReac-Applichem	A2572	Lavado	CLARITY
Ácido Bórico	Sigma-Aldrich	B0394	Despigmentación	CLARITY
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich	H1009	Despigmentación	Etanol-ECi
Tritón X-100	EMS	22140	Lavado	Etanol-ECi
Etanol	PanReac-Applichem	141086	Deshidratación	Etanol-ECi
Ethil Cinnamate	Sigma-Aldrich	112372	Deslipidación – RI	Etanol-ECi
Tetrahidrofurano (THF)	Sigma-Aldrich	186562	Deshidratación	3DISCO
Trietilamina	Sigma-Aldrich	T0886	Ajustar pH	3DISCO
Diclorometano (DCM)	Sigma-Aldrich	D65100	Deslipidar/Deshidratar	3DISCO
Dibenzyl Ether	Sigma-Aldrich	33630	Deslipidación - RI	3DISCO

PBS (Phosphate Buffered Saline), VA-044 (2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] Dihydrochloride), SDS (Dodecilsulfato Sódico), EMS (Electron Microscopy Science), RI (Refractive index).

Tabla 3. Disoluciones usadas durante los distintos protocolos de aclaramiento.

Buffer/Solución	Componentes	Protocolo
Solución de hidrogel	Acrilamida 4K (4%) VA-044 (0,25%) PBS 1X	CLARITY
Solución de aclarado	SDS (4%) Ácido Bórico (0,2M) H ₂ O destilada	
Solución de Blanqueo	H ₂ O ₂ 10% PBS 1X	
Solución de Lavado PTx2	Tritón X-100 0,2% PBS 1X	Etanol-ECi
Solución de Permeabilización	PTx2 Glicina (3%) DMSO (25%)	

Para el método 3DISCO no se usaron Buffers.

3. Animales y preparación de la muestra

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva 2012/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, y el RD 53/2013 de regulación española sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos y aprobados por el Comité Ético de la Universidad Miguel Hernández para el uso de animales de laboratorio, bajo el código TFM.MBB.EFJ.ÁEPS.210524. Para el inmunomarcaje y aclaramiento de tejidos se utilizaron cerebros y ojos pigmentados de ratones adultos C57BL/6, y ratas adultas Long-Evans. Estos animales se perfundieron transcárdialmente con PBS y se fijaron por perfusión con PFA/PBS al 4%. Posteriormente, se extrajeron los ojos y cerebros, se postfijaron en PFA 4% y se guardaron en PBS a 4°C hasta su uso.

4. Aclaramiento de tejidos a base de hidrogel (CLARITY)

Las muestras fijadas que se usaron para llevar a cabo este protocolo de aclaramiento fueron 3, que contenían GFP como marcador fluorescente (un cerebro de ratón, un ojo de ratón y un ojo de rata). Las muestras fueron lavadas con PBS 1X durante 30 min en agitación leve a temperatura ambiente. Se transfirieron a la solución de hidrogel (Tabla 3, protocolo CLARITY), se desgasificaron con nitrógeno gaseoso y se incubaron a 4°C durante 24 horas para crear enlaces químicos entre los componentes del tejido y la acrilamida. Posteriormente,

se extrajeron y se quitó el excedente del polímero para transferir a solución de aclarado (Tabla 3, protocolo CLARITY) dentro de una cámara de electroforesis, la cual se colocó a 30V y 37°C para maximizar la deslipidación y despigmentación.

5. Aclaramiento de tejidos a través de solventes orgánicos (3DISCO)

Las muestras procesadas para llevar a cabo este protocolo (n = 4) fueron: un ojo de ratón, un ojo de rata, un cerebro de ratón marcado con GFP y un cerebro de ratón sin marcaje. Éstas fueron lavadas con PBS 1X durante 30 min en agitación leve a temperatura ambiente. A continuación, se transfirieron en soluciones de deshidratación a varias concentraciones con Tetrahidrofurano (THF) a pH9 ajustado con Trietilamina: THF 50% durante 12 horas para el cerebro sin marcaje y ojo de rata, 2 horas para el cerebro con GFP y 1 hora para el ojo de ratón. Estas variaciones de tiempo se deben al tamaño de los tejidos y a la pigmentación de los ojos. Seguidamente se transfirieron a THF 70%, THF 80%, THF 100% por 1 hora, se cambió el THF 100% para dejar overnight. Las muestras deshidratadas se incubaron con Diclorometano (DCM) por 30 min y se transfirieron a Dibenzyl Ether (DBE) hasta su aclaramiento. Posteriormente, se realizó la adquisición de imágenes de muestras enteras en Lupa *Leica MZ APO*, para visualizar la transparencia de los tejidos con la ayuda de un fondo de contraste.

6. Aclaramiento de tejidos a través de solventes orgánicos (Etanol-ECi)

6.1. Blanqueamiento

El blanqueamiento y aclaramiento se modificó ligeramente a partir del protocolo publicado por Henning y colaboradores (2019). Para el blanqueamiento, que consiste en hacer blanco el tejido, causado por la deslipidación, se utilizaron muestras completas de ojos y cerebros de rata y ratón (n = 4) fijadas en PFA 4% y lavadas con PBS 1X. Los ojos y cerebros se incubaron en solución de blanqueo (Tabla 3, protocolo Etanol-Ci) durante 3 horas a 55°C. Posteriormente, se lavaron con PTx2 (Tabla 3) durante 2 horas a temperatura ambiente. Esta última solución se llevó a la misma temperatura de la solución de blanqueo para evitar cambios bruscos de temperatura.

6.2. Inmunomarcaje

Para el inmunomarcaje, las muestras se dividieron en dos grupos: el primero se inmunomarcó antes de incubar en solución de blanqueo (preblanqueamiento), y el segundo grupo se inmunomarcó tras el blanqueamiento (posblanqueamiento), donde las muestras fueron transferidas a solución de permeabilización (Tabla 3, protocolo Etanol-ECi) durante 5 horas a 37°C antes de ser incubadas con los respectivos anticuerpos, para facilitar la penetración. En

ambos grupos, los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-GFP (1:500) y anti-NeuN (1:500) tanto para ojos como para cerebros. Las muestras fueron bloqueadas con suero de burro al 10% y los anticuerpos diluidos en PB/Tritón 0,5%. Los anticuerpos secundarios usados fueron Alexa Flúor 488 (1:100), Alexa Flúor 555 (1:100) y Hoechst (1:300). Las muestras del primer y segundo grupo fueron incubadas con el anticuerpo primario durante 3 días en agitación leve a 4°C, lavadas con PBS 1X y posteriormente incubadas en el anticuerpo secundario durante 1 día en PB/Tritón 0,5% y lavadas finalmente con PBS.

6.3. Deshidratación y aclaramiento

Posteriormente al lavado con PTx2 para las muestras del primer grupo (preblanqueamiento), y del lavado con PBS para las muestras del segundo grupo (inmunomarcadas posblanqueamiento), se deshidrataron con Etanol/H₂O a varias concentraciones: etanol 25% (2,5 horas), etanol 50% (2,5 horas), etanol 70% (2,5 horas), etanol 100% (1 hora), etanol 100% (overnight) a 4°C. Las muestras deshidratadas se llevaron a temperatura ambiente durante 1 hora y posteriormente se transfirieron a Ethil Cinnamate (ECi). Éstas se incubaron hasta que se volvieron transparentes (aproximadamente 3-6 horas, dependiendo del tamaño de la muestra) tal y como se muestra en la batería de tubos de izquierda a derecha para un ojo (Figura 5A) y un cerebro en la Figura 5B.

Posteriormente, se realizó la adquisición de imágenes de muestras enteras en Lupa *Leica MZ APO*, para visualizar la transparencia de los tejidos con la ayuda de un fondo de contraste de color negro.

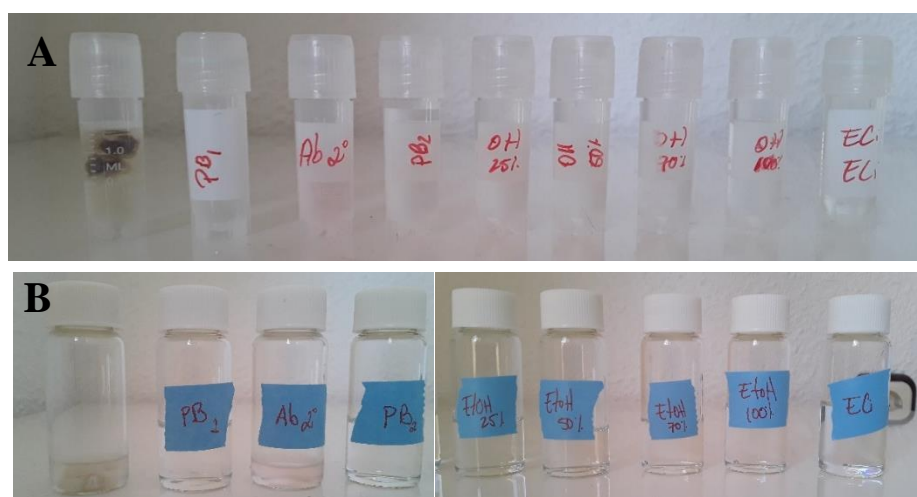


Figura 5. Batería de soluciones para inmunotinción, deshidratación y aclaramiento.

A) Ojo de rata. **B)** Cerebro de rata.

6.4. Análisis de eficacia de aclaramiento del método Etanol-ECi

La eficacia del aclarado del protocolo se determinó espectrofotométricamente. Cuatro ojos y cuatro cerebros de ratón sin aclarar se colocaron por separado en cubetas de poliacrilonitrilo para luz ultravioleta (PNA-UV) y se llenaron con agua destilada homogeneizando para medir la absorbancia en el espectrofotómetro *GENESYS 10uV* (ThermoFisher). Después del aclaramiento de las muestras, se midió nuevamente la absorbancia utilizando la solución de ECi. La absorbancia en cada cubeta se midió a 405, 488, 561 y 638 nm ya que son las de las longitudes de ondas más utilizadas en el inmunomarcaje y son los filtros/láser de excitación que contiene el Light-Sheet Fluorescence Microscopy Z.1. Las absorbancias de cada grupo se analizaron estadísticamente con la prueba T-Student ($p < 0.05$) en GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

6.5. Adquisición de imágenes en 3D con Light-Sheet Fluorescence Microscopy Z.1

La obtención de imagen de fluorescencia de ojos y cerebros completos se realizó utilizando el microscopio Light-Sheet Fluorescence Microscopy Z.1 (ZEISS) sin módulo de clarificación, donde las muestras se colocaron en un soporte específico (Figura 6B, 6C) para ser sumergidas en solución de aclarado. Este soporte cuenta con un sistema de dos objetivos de iluminación y utiliza un escaneo de pivote ultrarrápido para reducir los artefactos de sombras, e incluye además una cámara de muestras que regula la temperatura y el CO₂. Para la visualización de células neuronales y la vasculatura, tanto de cerebros como de ojos, se usaron las líneas láser de excitación a 405, 488, 561 y 638 nm, con detección simultánea de dos canales utilizando cámaras PCO.edge sCMOS de 16 bits. Los objetivos de imagen incluyen lentes de inmersión en la solución utilizada para el aclaramiento (solvente orgánico) con un módulo específico para muestras aclaradas. La obtención de la imagen está diseñada para un índice de refracción de 1.5 que coincide con el RI del ECi y, además, posee lentes de inmersión en agua 5x, 20x y 40x, con un sistema de zoom óptico de 2.5x, que produce aumentos efectivos de 2x-100x. Las muestras que no se clarificaron fueron incluidas en gel de agarosa al 1% dentro de un soporte de jeringa de 1mL (Figura 6A) y sumergidas en la cámara de muestras del microscopio.

La adquisición de imágenes y la manipulación básica se realizó con el software Zen, que también se integra con Arivis Vision 4D para renderizado y análisis.



Figura 6. Soportes utilizados para la adquisición de imágenes en LSM. **A)** Jeringa de 1ml rellena con agarosa al 1% para soporte de muestra. **B)** Soporte para jeringa. **C)** Soportes utilizados para muestras aclaradas.

6.6. Adquisición de imágenes LSM y SIM.

Se utilizaron muestras de retinas enteras fijadas e inmunomarcadas con GFP y anti-NeuN para la observación de la vasculatura y células neuronales, respectivamente. Para realizar la reconstrucción tridimensional se tomaron varias imágenes de diferentes planos en la misma zona (Z-Stack) dependiendo del grosor de la retina. En SIM, se utilizó el Microscopio *Zeiss AxioObserver* equipado con el módulo *Apotome 2* para una mejor calidad de la imagen. Para LSM se utilizó el Microscopio Confocal *Leica TCS SP Z1*.

RESULTADOS

1. Aclaramiento de tejidos a base de hidrogel (CLARITY)

Se llevó a cabo el protocolo modificado de CLARITY (Du et al., 2019), en el cual se eliminó el reactivo α -tioglicerol y además, se realizó una aclaración activa en una cámara de electroforesis común a 30V, a diferencia del protocolo original en el que se llevaba a cabo a 25V. Sabiendo que podrían generarse subproductos y adherirse a los electrodos, se previno colocando en ellos papel de filtro, sin embargo, no se notó cambio de coloración en la solución ni en el papel generado por la formación de moléculas cargadas como subproductos. Los tejidos procesados (ojos y cerebro) no fueron aclarados con este protocolo empleado tras 5 días, por lo que se detuvo el proceso (Figura 7). Dado que no se aclararon los tejidos, no se pudieron obtener imágenes en LSM. Además, dado que este método está basado en solución acuosa y con la prolongación del tiempo empleada, se observó un agrandamiento del cerebro por la excesiva hidratación (Figura 7B).

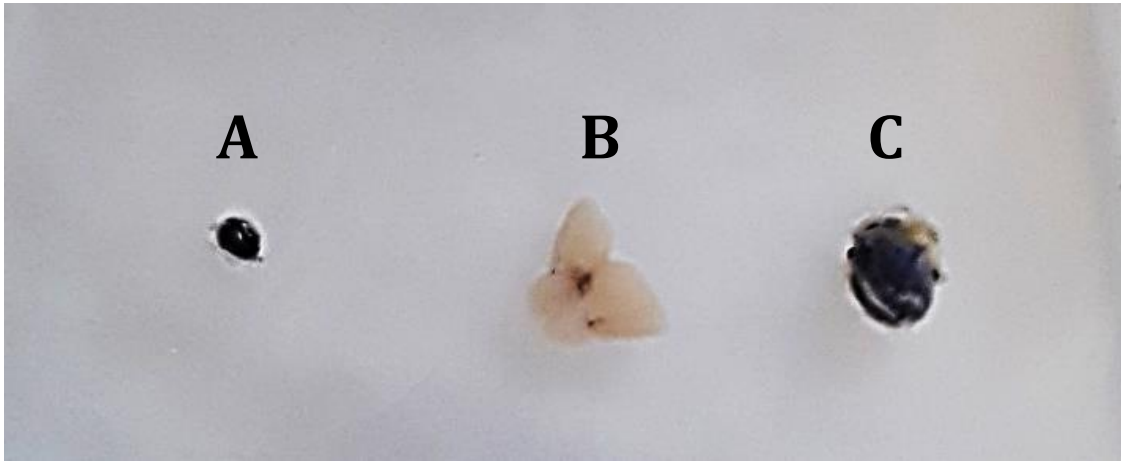
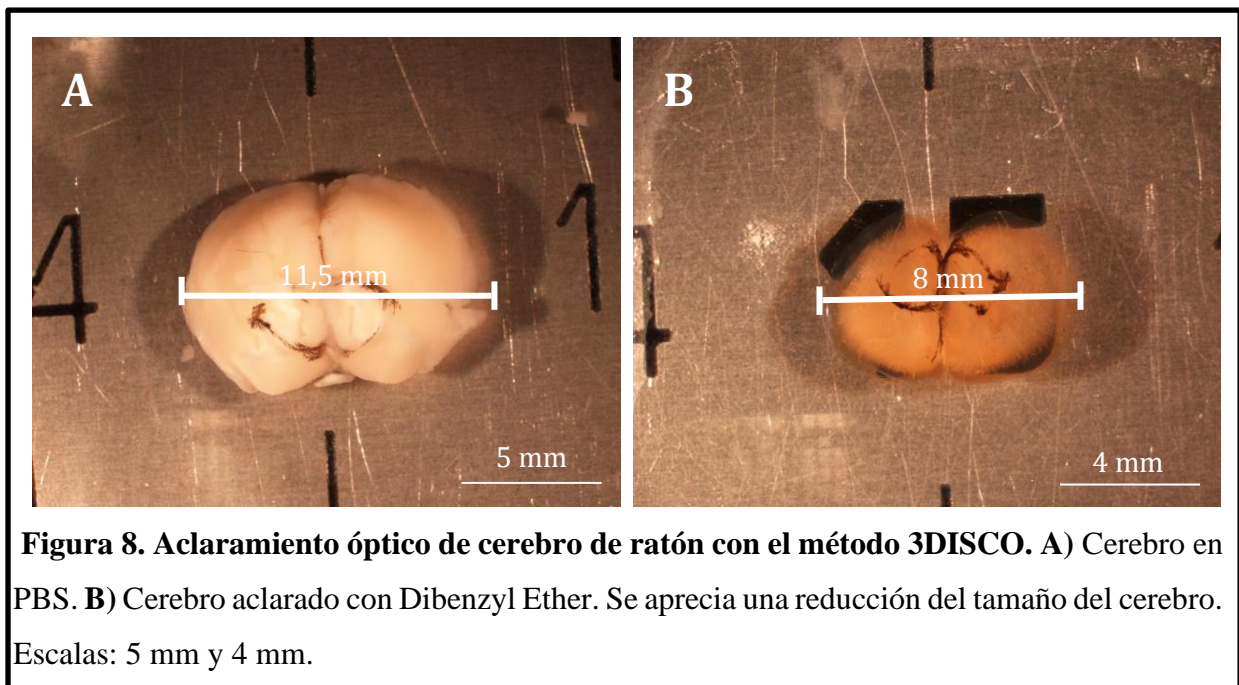


Figura 7. Tejidos de ratón y rata tras ser procesados 5 días mediante el método de aclaramiento a base de hidrogel. A) Ojo de ratón pigmentado, B) Cerebro de ratón, C) Ojo de rata.

2. Aclaramiento de tejidos a base de solventes orgánicos (3DISCO)

Basándose en los protocolos propuestos por Ertürk et al., 2012 y Qi et al., 2019, se procesaron los tejidos de rata y ratón. Con el fin de evaluar el tiempo óptimo de deshidratación y aclaramiento se utilizó tejido no inmunomarcado, ya que la fluorescencia podría verse disminuida con el uso prolongado de solventes orgánicos. Se observó que en cerebros con más

de 12 horas en solución de deshidratación (THF) se producía una contracción de 3,5 mm de longitud (Figura 8B; 8 mm) respecto el cerebro mantenido en PBS (Figura 8A; 11,5 mm). Por este motivo, en posteriores experimentos se sustituyó la deshidratación de 12 horas por un menor tiempo. A pesar de esta reducción de tiempo, tras ser transferidos a Dibenzyl Ether, la transparencia de los tejidos no mejoró. Los ojos conservaron su pigmentación, y en los cerebros apenas se notó una ligera transparencia en los bordes. Dada la alta opacidad de todos los tejidos no se pudieron obtener imágenes del tejido interno marcado con GFP en LSM.



3. Aclaramiento de tejidos a través de solventes orgánicos. Método Etanol-ECi

Con este protocolo, tanto para los ojos como cerebros completos aclarados, el tiempo de duración fue de 6-8 días. El primer paso esencial para un buen aclaramiento en tejido ocular es eliminar la melanina sin dañar las estructuras. Los ojos y cerebros blanqueados con éxito mediante este protocolo dieron como resultado muestras transparentes cuando se colocaron en la solución de aclaramiento, el ECi. Para ambos grupos procesados (pre- y posaclaramiento) no se observaron diferencias ópticas de aclaramiento. Tal y como se muestra en las Figuras 9 y 10, a menor tamaño del tejido, mayor fue el aclaramiento por la penetración del solvente orgánico. Es decir, el cerebro y el ojo de ratón de la Figura 10 presentaron un aclaramiento más notable en comparación con los tejidos de la Figura 9. A diferencia del método 3DISCO (Figura 8), con este método de Etanol-ECi, la forma y textura de los tejidos se conservó intacta (Figuras 9 y 10).

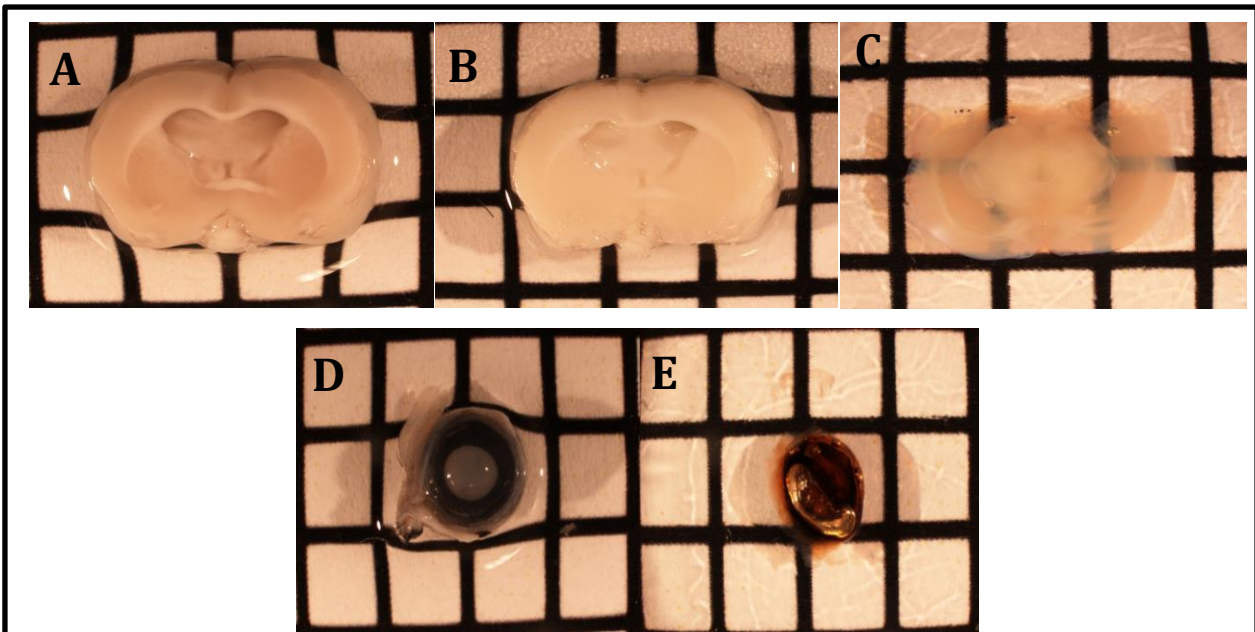


Figura 9. Aclaramiento óptico de tejidos de rata con ECI. A) Cerebro de rata antes de aclaramiento en PBS, B) Posblanqueamiento con solución de H₂O₂ 10%/PBS, y C) Posaclaramiento con ECI. D) Ojo de rata antes del aclaramiento en PBS y E) Posaclaramiento con ECI.

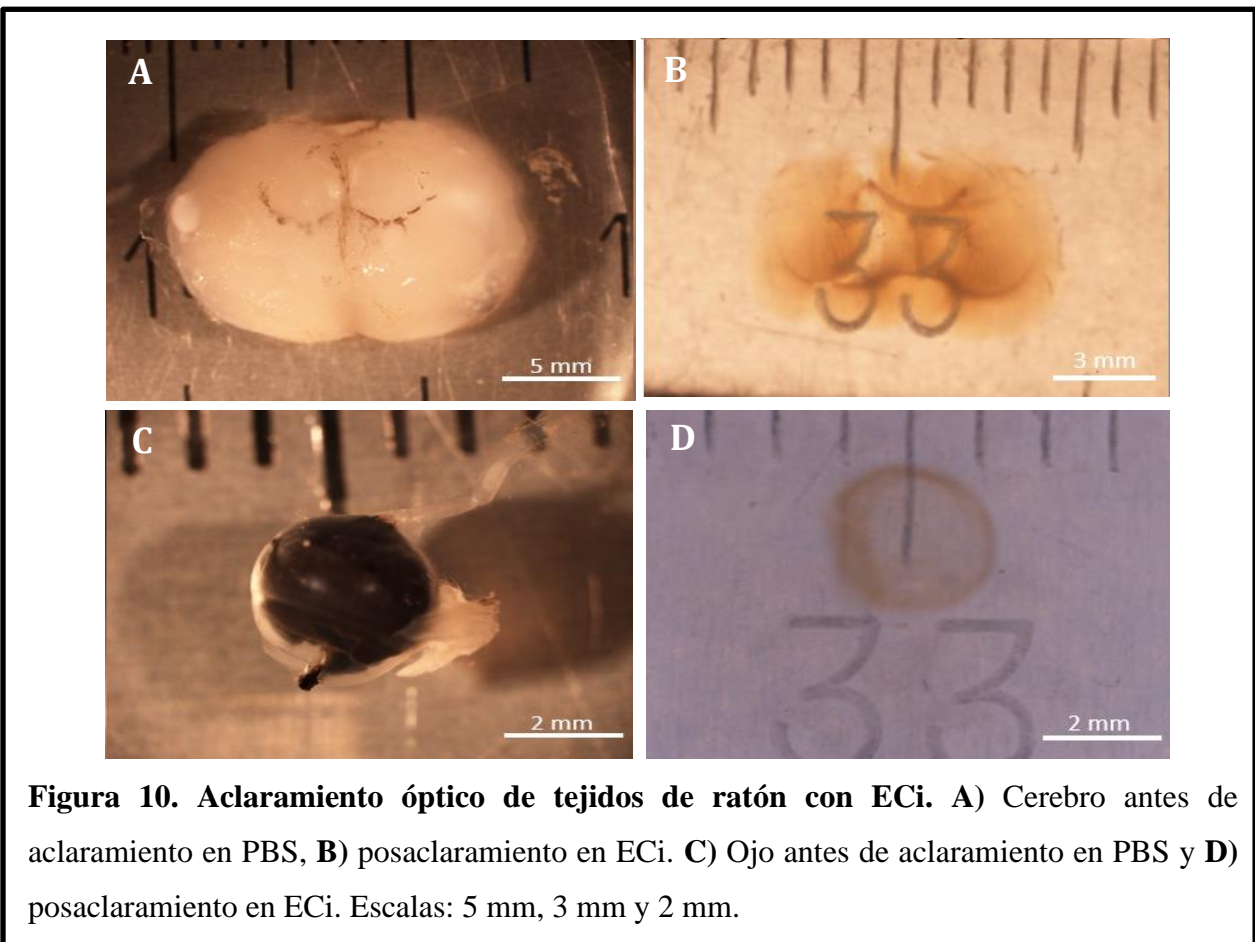
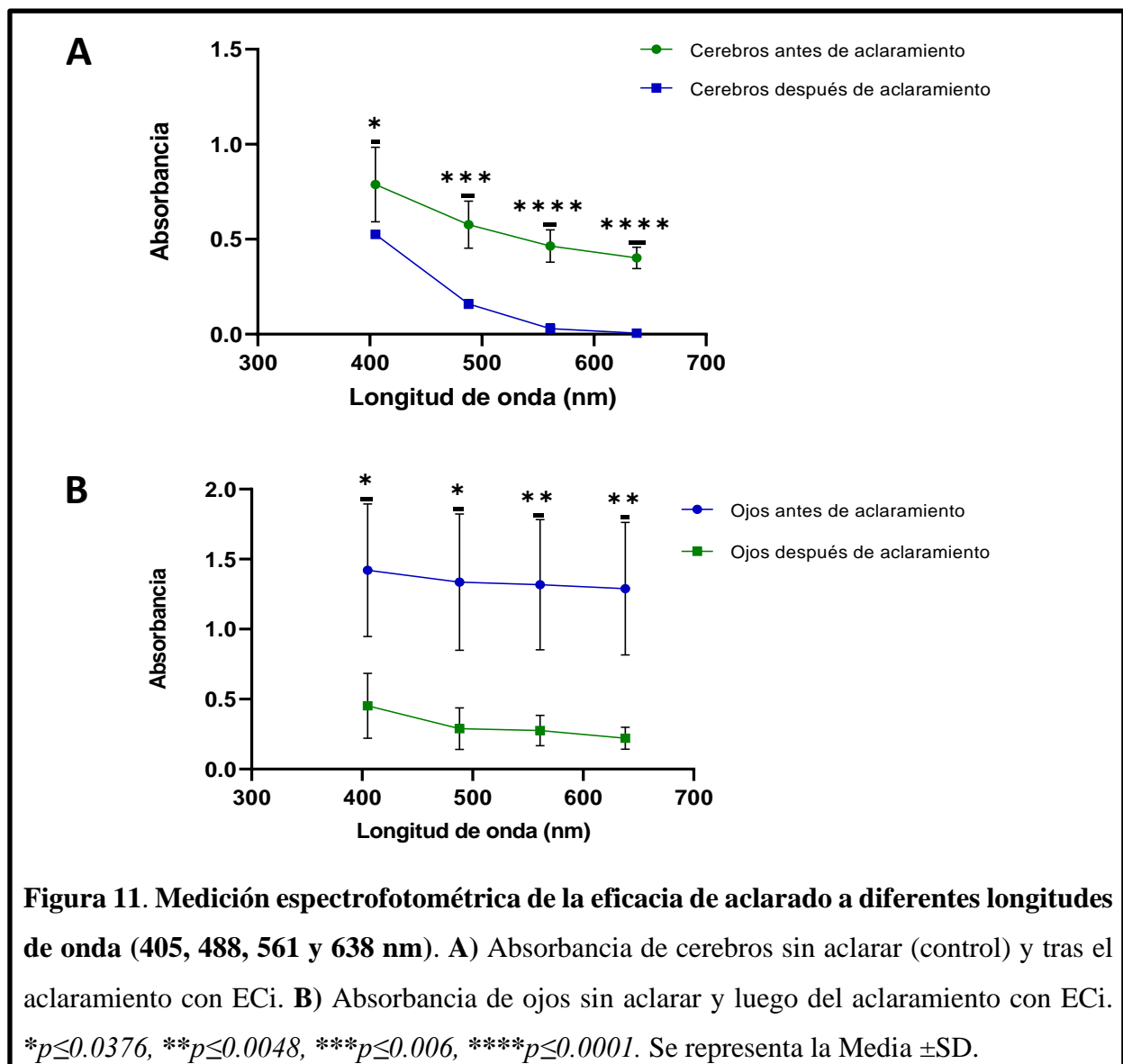


Figura 10. Aclaramiento óptico de tejidos de ratón con ECI. A) Cerebro antes de aclaramiento en PBS, B) posaclaramiento en ECI. C) Ojo antes de aclaramiento en PBS y D) posaclaramiento en ECI. Escalas: 5 mm, 3 mm y 2 mm.

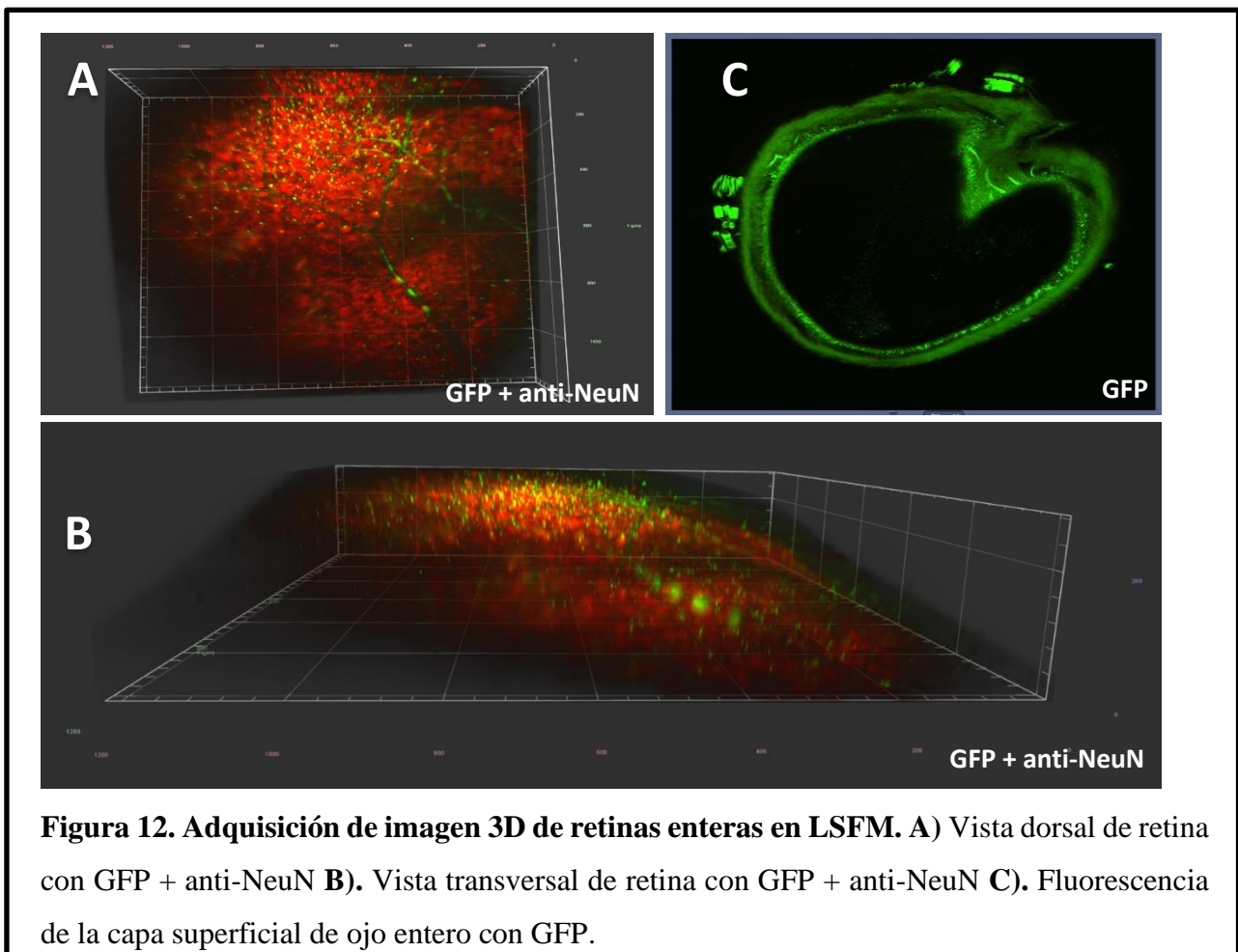
3.1.Eficacia de aclaramiento

Se midieron espectrofotométricamente las muestras aclaradas en ECI y sin aclarar (control) a 405, 488, 561 y 638 nm, realizando una media de cada grupo para cada longitud de onda. En el caso de los cerebros clarificados (n=4), a las cuatro longitudes de ondas medidas se observó una absorbancia significativamente menor en tejido aclarado que en las muestras controles ($p < 0,05$). Con longitudes de onda de 561 y 638 nm la diferencia significativa se hizo mayor con $p < 0,0001$ (Figura 11A). En los ojos analizados (n=4) también se mostró una diferencia estadísticamente significativa entre ojos aclarados y controles ($p < 0,05$), con una mayor significancia entre las longitudes de onda de 561 y 638 nm ($p < 0,0048$) (Figura 11B). En ambos casos, los valores de desviación estándar pertenecientes a cerebros y ojos aclarados son mínimos, especialmente en los cerebros aclarados (Figura 11A y 11B).

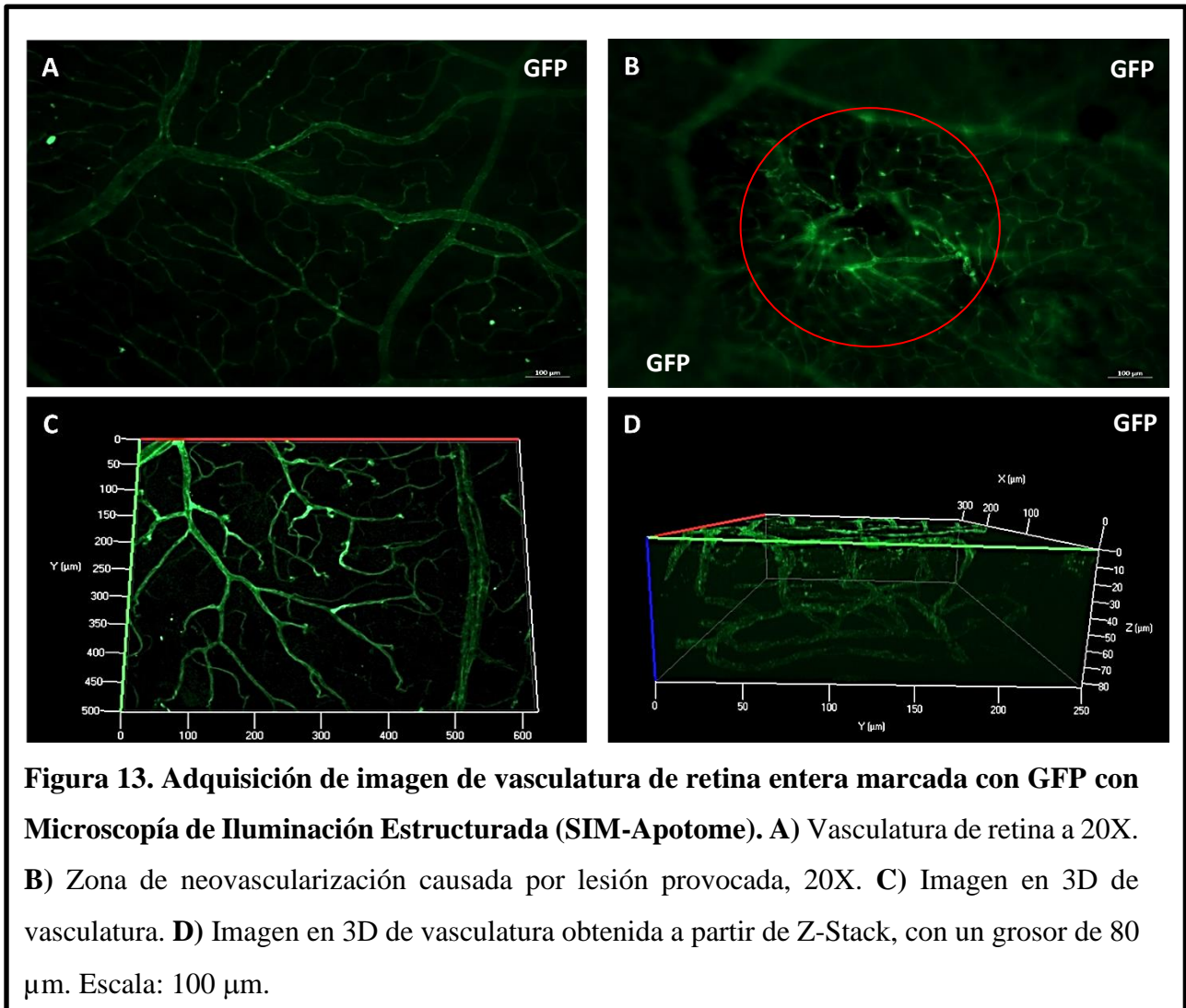


4. Imágenes 3D en LSFM y comparación con LSCM y SIM

La adquisición de imágenes en 3D se realizó únicamente con muestras clarificadas a partir del método ECI, puesto que con los métodos CLARITY y 3DISCO no fue posible al no observarse transparencia en los tejidos. Con el LSFM sin módulo de clarificación se pudieron obtener imágenes de retinas enteras inmunomarcadas, para la observación de vasculatura y células neuronales. En el grupo de tejidos en los cuales se realizó el inmunomarcaje antes del blanqueamiento, no se observó fluorescencia; mientras que en aquellos tejidos inmunomarcados posblanqueamiento si se observó marcaje de vasos y células neuronales en ojos, y *background* en el caso de cerebros (datos no mostrados). Las figuras 12A y 12B muestran un fragmento de retina de ratón en 3D inmunomarcada con GFP en la vasculatura y anti-NeuN en células retinianas. En ambos casos, se observan con poca nitidez tanto los vasos como las neuronas, especialmente en la Figura 12B donde no se pueden distinguir las diferentes capas de la retina en la reconstrucción 3D. Por otro lado, en la Figura 12C se observó únicamente fluorescencia en la parte más externa de un ojo entero clarificado de ratón, sin poder llegar a visualizar las estructuras internas como la retina.

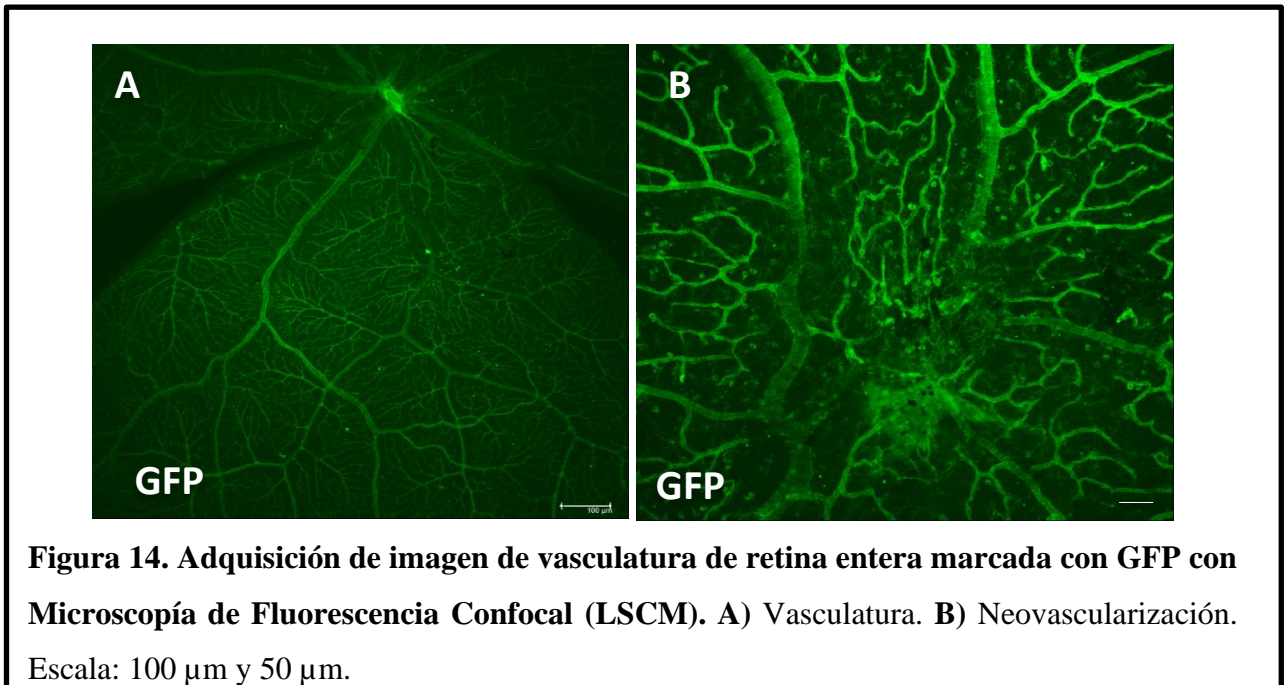


La Figura 13A muestra un plano de retina entera inmunomarcada con GFP en la que puede verse toda la vasculatura con SIM-ApoTome. Con este sistema, al calcular la sección óptica a partir de tres imágenes con diferentes posiciones de cuadrícula sin retardo, se ha podido crear una imagen en 3D de 80 μm de espesor en la que, a diferencia de la adquisición con LSFM, pueden verse los vasos internos con más detalle (Figura 13C y 13D). Además, se muestran zonas de neovascularización (Figura 13B) en un plano 2D.



Contrastando la adquisición de imágenes entre ambos sistemas, las capturas de ojos y retinas con LSFM se obtuvieron con mayor velocidad, siendo esta una de las ventajas del sistema, mientras que con SIM-ApoTome se deben hacer capturas por separado de cada una de las zonas de interés para luego hacer una reconstrucción en 3D, lo cual incluye *Titles* (reconstrucción a partir de varias cuadrículas en el eje X) y *Z-Stack* (captura de varias capas en el eje Y) que se procesaron con el programa *Zen*.

Por otra parte, la óptica de iluminación y detección de enfoque en el mismo punto limitado por difracción en la muestra de LSCM permitió obtener imágenes con buena calidad de la vasculatura de retinas inmunomarcadas con GFP (Figura 14). El sistema, por lo general tiene un tiempo de proceso largo, en comparación con el LSFM.



DISCUSION

La obtención de imágenes de alta resolución de un sistema complejo como el neurológico o menos complejo como el vascular, manteniendo la perspectiva global intacta para comprender su funcionamiento es un desafío en la biotecnología. Las primeras técnicas de aclaramiento de tejidos enteros desarrolladas hasta la actualidad para visualizar las estructuras internas de los mismos han tenido numerosos inconvenientes, relacionados con los reactivos utilizados, la técnica y tiempos empleados y los equipos de microscopía de fluorescencia utilizados. En nuestro estudio hemos obtenido tejidos clarificados con una transparencia óptima, realizando mejoras en el procesamiento de las muestras; hemos optimizado el momento óptimo para las técnicas inmunohistoquímicas durante el procesamiento de tejidos, así como la adquisición de imágenes 3D de retinas enteras en LSM.

El método de aclaramiento CLARITY, desarrollado por primera vez en 2013 por Chung y colaboradores, y luego modificado por Du et al., 2019, muestra una transparencia óptima de tejido cerebral entre las 3 y 4 semanas, usando un aclaramiento activo en cámara electroforética para ayudar al desprendimiento de los lípidos. En nuestro estudio se ha llevado a cabo sobre muestras de cerebros y de ojos pigmentados en cámara electroforética común. Sin embargo, nuestros resultados difieren a los obtenidos por Chung et al. 2013 y Du et al., 2019 ya que no se clarificaron ninguno de los dos tejidos. Los reactivos empleados no tienen la capacidad de despigmentar la capa del epitelio pigmentario de la retina del ojo. Reactivos como el SDS y el ácido bórico cumplen la función de deslipidar pasivamente, resultado que no se vio aun cuando se modificó el voltaje en la cámara de electroforesis a 5V más por encima del protocolo original. Se evitó aumentar más el voltaje ya que esto podría influir negativamente en la estructura del tejido. De igual forma, en el presente trabajo, el cerebro de ratón no fue aclarado mediante este protocolo CLARITY. En nuestro estudio, hemos eliminado uno de los reactivos utilizados por Du et al., 2019, el α -thioglycerol, el cual tampoco fue usado en el trabajo desarrollado por Chung et al., 2013 y que no fue necesario para obtener un aclaramiento de sus muestras. La razón de eliminar dicho reactivo se debió al abaratamiento de costes y por ser un reactivo con una toxicidad aguda, por lo que se buscaba minimizar el daño que los reactivos pudieran causar a los tejidos y en la salud humana. Por su parte, Du et al., 2019 al usar el α -thioglycerol consiguieron reducir tiempos de procesado, pero aun así estos sobrepasaban las 2 semanas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo con el método 3DISCO (Ertürk et al., 2012) mejoraron en cuanto a transparencia de tejidos. Sin embargo, a la hora de visualizarlo

mediante microscopía, no se pudo observar de manera nítida tejido neuronal debido a la baja penetración de la luz, obteniéndose sólo un *background* de fluorescencia (datos no mostrados) (McCance, 2019).

Debido a que el aclarado altera la composición química de los tejidos, solo se pueden utilizar tejidos fijados. Durante el desarrollo de los protocolos de aclaramiento, se han usado reactivos muy tóxicos y altamente corrosivos para los tejidos, de hecho, la solución final de Dibenzyl Ether en el método 3DISCO degrada la señal fluorescente con el tiempo, según investigaciones anteriores (Ertürk et al., 2012). Se estima que la vida media de la señal de GFP de tejido aclarado en solventes orgánicos es de 1-2 días aproximadamente (Ertürk et al., 2012), tiempo que fue superado en nuestras incubaciones al no tener un aclaramiento total del tejido. Otros autores, han utilizado por su parte, ajustes de pH y temperatura para disminuir la pérdida de fluorescencia (Qi et al., 2019). Entre las limitaciones del protocolo 3DISCO se encuentran la toxicidad y la contracción notable de los tejidos debido al uso de reactivos como el THF y el DCM para la deshidratación y deslipidación. Aun reduciendo el tiempo de incubación en DCM a 30 min respecto al protocolo original no se obtuvo ninguna mejora en la clarificación. Al igual que el método CLARITY, 3DISCO no posee un reactivo capaz de despigmentar en su totalidad ojos enteros. De la misma manera y como la mayoría de protocolos de aclaramiento, cuanto más pequeña sea la muestra mayor es la probabilidad de tener un mejor aclaramiento, debido a que los reactivos penetran con más facilidad, aunque también dependerá del tipo de tejido (Ertürk et al., 2012).

Por otra parte, el aclaramiento obtenido con las modificaciones realizadas a partir de la técnica de Etanol-ECi fue óptimo y viable para visualizar estructuras internas de los tejidos (Figura 12). Estas modificaciones incluyeron: la reducción de tiempos aplicados en las incubaciones con etanol a 2,5 horas y no 3 horas como el protocolo original; la inclusión no sólo de ojos, sino de cerebros de ratones y ratas adultos; la eliminación de reactivos de lavados con detergentes, como el Tween 20; y una inmunotinción adaptada a los protocolos de nuestro laboratorio. Con estos cambios, nuestros resultados mostraron un aclaramiento y transparencia de ojos de ratón incluso mayor que en los trabajos realizados por Henning et al., 2019, aún con la disminución de los tiempos de incubación de las soluciones de deshidratación y aclaramiento, y, además, sin la aplicación previa en matrices de hidrogel para facilitar la manipulación, lo que podría haber mejorado el aclaramiento. La transparencia de cerebros de rata y ratón con este protocolo (Figura 9, 10) fue similar a la obtenida en muestras de riñón por Klingberg et al., 2017, siendo este último un trabajo que ha servido de base para otros protocolos posteriores de

aclareamiento de tejidos con menor toxicidad debido a la eliminación de solventes orgánicos tóxicos. En su trabajo, Henning et al., 2019 determinaron que la fluorescencia es sensible a pH, siendo un valor medio óptimo pH 9, por lo que en el presente estudio se utilizaron series de etanol ajustado a pH 9 para la deshidratación y también ECi, un compuesto no tóxico capaz de extrapolar su índice de refracción de 1,56 al del tejido una vez aclarado. De hecho, este reactivo es un saborizante y aditivo alimentario para productos cosméticos aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos desde 2007 (Klingberg et al., 2017), por lo que su procesamiento es más sencillo en comparación con los reactivos utilizados en el protocolo 3DISCO por la alta toxicidad de estos últimos.

Uno de los problemas añadidos es el procesamiento de muestras oculares, ya que poseen una elevada cantidad de melanina. Para su eliminación, se debe realizar un paso previo de blanqueamiento con solución de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, en nuestro estudio determinamos que el inmunomarcaje previo al blanqueamiento no resiste las condiciones de esta solución, por lo que es recomendable hacer el inmunomarcaje posblanqueamiento, tal y como lo hicieron Henning et al., 2019. Dado que el aclareamiento supone la incubación de la muestra en compuestos hidrofóbicos es fundamental realizar la inmunotinción previo al aclareamiento.

Un paso importante en los protocolos de blanqueamiento es la deshidratación, la cual debe ser completa para tener óptimos resultados, pues es esencial eliminar todas las moléculas de agua presentes en el tejido (Richardson y Lichtman, 2015). De hecho, los tejidos clarificados se vuelven opacos o no se clarifican por completo si existe presencia de agua o la deshidratación no fue suficiente.

La eficacia en la aclaración de los tejidos obtenida en este trabajo fue similar a la de Henning et al., 2019, hecha únicamente en ojos de ratones, y que en el presente estudio se ha ampliado a tejidos cerebrales. En cuanto a las medidas de absorbancia de ojos antes del aclareamiento, a diferencia de los resultados obtenidos por Henning, se ha obtenido una mayor desviación estándar en los resultados. Esto, podría deberse a que se usaron cubetas PNA-UV donde se introdujeron los ojos enteros, y aunque se utilizó un mismo punto de ubicación dentro de las cubetas, la ubicación no sería exactamente igual en las cuatro muestras, ya que tienden a moverse por la presencia de agua utilizada como blanco. Sin embargo, esta desviación se redujo significativamente tras el aclareamiento en todos los casos (Figura 11), demostrando la alta transparencia provocada por el ECi y su efectividad al igualar el RI del tejido.

Las imágenes de retinas enteras obtenidas en LSFM con el módulo de agua exhiben la fluorescencia en vasculatura y células neuronales (Figura 12). Sin embargo, no se obtienen imágenes nítidas de la estructura celular (Figura 12) a diferencia de las obtenidas a través de microscopía confocal (Figura 14). Prahst et al., 2020 mostraron que la microscopía confocal tiene una resolución espacial fundamentalmente más alta con menos dispersión de luz que LSFM, por lo que se pueden obtener imágenes más claras y precisas de estructuras más pequeñas, siempre que la muestra de tejido sea susceptible de montaje plano sin distorsión, es decir, que sea naturalmente delgada en sección transversal. Por lo tanto, las imágenes estáticas confocales de los vasos en una sola capa de la retina son de mejor resolución que LSFM y son muy confiables para cuantificaciones basadas en técnicas esterológicas. Con LSCM se puede obtener una imagen 3D, pero se tiene que hacer una reconstrucción de numerosos planos en el eje Z para tener una buena definición de imagen, en el caso de querer estudiar la morfología del tejido. La combinación de ambas técnicas (LSFM y LSCM) puede brindar interesantes resultados en los estudios relacionados con la angiogénesis en el desarrollo (Prahst et al., 2020). Por otra parte, con la adquisición de imágenes en SIM, se pudo realizar una reconstrucción 3D de un fragmento de retina inmunomarcada con GFP para visualización de vasculatura (Figura 13). Sin embargo, tiene la desventaja (sobre LSFM) de una lenta velocidad de adquisición y en algunos casos pérdida de enfoque por el grosor de la muestra y cantidad de capturas realizadas por cuadrícula para obtener la imagen final.

Al realizar los montajes de cerebros en LSFM, no se pudieron obtener imágenes de tejido neuronal ni vascular, pudiéndose observar únicamente *background* superficial (datos no mostrados). Esto se debe a que el LSFM Z.1 donde fueron procesadas las muestras no cuenta con el módulo para muestras clarificadas, haciendo que la luz se dispersara y por ende la imagen se distorsionara. Sin embargo, otros autores han podido diferenciar tejido vascular/neuronal en secciones de cerebros clarificados usando este módulo específico (Branch et al., 2019; Du et al., 2019). La versatilidad que brinda la técnica del LSFM hace necesaria la optimización continua de procesos, con el fin de poder estudiar tanto muestras clarificadas como no clarificadas, debido a que una de las grandes ventajas de este equipo sobre otras técnicas de MF es el procesamiento de muestras grandes, para visualizar estructuras externas e internas. El LSFM, ha permitido realizar estudios de morfogénesis y biología del desarrollo, especialmente en especies como *D. melanogaster* (Memeo et al., 2021) y *D. rerio* (Pez cebra) (Icha et al., 2016); dinámica celular en embriones y pequeños organismos; mediciones fisiológicas y procesos de desarrollo en plantas, en especial de *A. thaliana* (Candéo et al., 2017); entre otros.

Estos datos demuestran la adaptabilidad del equipo usando los módulos específicos para cada tipo de muestra.

CONCLUSIONES

1. Partiendo de los métodos de aclaramiento utilizados, se ha logrado una transparencia total de los tejidos con el método Etanol-ECi, incluso mayor que el protocolo original con las modificaciones llevadas a cabo.
2. No se logró una transparencia óptima de ningún tejido con los métodos CLARITY y 3DISCO, a pesar de las modificaciones empleadas para su mejoramiento.
3. Se ha logrado una eficacia óptima de aclaramiento tanto en ojos como cerebros, con base a los datos espectrofotométricos obtenidos. Esto convierte al ECi en un reactivo capaz de hacer que el RI del tejido sea igual o similar al de él, permitiendo que la luz pueda pasar a través de los tejidos disminuyendo su dispersión óptica.
4. Se logró determinar que el momento óptimo para la aplicación de la inmunohistoquímica durante el procesado de los tejidos en el método Etanol-ECi fue posterior al blanqueamiento con peróxido de hidrógeno.
5. La realización de reconstrucciones 3D por LSFM de muestras clarificadas sin módulo de clarificación da como resultado imágenes distorsionadas. Por el contrario, con técnicas como LCFM y SIM-ApoTome la nitidez se ve aumentada, pero la velocidad de adquisición de estas en comparación con la de LSFM es mucho menor.
6. Es de importancia el uso del módulo específico para muestras clarificadas en LSFM, el cual permite la obtención de imágenes más nítidas y visualización de estructuras internas específicas, para llevar a cabo estudios de angiogénesis/degeneración, obteniendo resultados prometedores.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabajo brinda la oportunidad de seguir con futuros estudios, por lo que se debe considerar el establecimiento de un procedimiento de dosificación específico para una variedad de tejidos y órganos que se aclaran con diferentes reactivos y tiempos. Además, se recomienda evaluar la eficacia del inmunomarcaje a tiempos diferentes de incubación en solventes orgánicos para los métodos hidrofóbicos, evaluando así la concentración mínima requerida de marcadores utilizados para tener una óptima fluorescencia, sabiendo que durante el proceso se puede perder por la degradación causada por los reactivos.

Debido a la rápida adquisición de imágenes y la posible reconstrucción 3D de los tejidos enteros en LSFM, este método sigue siendo muy prometedor para el futuro. Sin embargo, es necesario adaptarlo mejor a muestras clarificadas, que permitan tener una adquisición nítida de las estructuras internas a detalle, ya que, por el contrario, con métodos convencionales de microscopía de fluorescencia pueden verse secciones más claras en 3D, pero debido a sus limitaciones no podrían ser muestras enteras intactas.

Con base a lo anterior, lo esperado con la técnica de LSFM es poder adaptarlo para la adquisición de imágenes *in vivo* de órganos internos o tejidos gruesos, permitiendo un análisis histológico no invasivo. Se espera poder ver a tiempo real los procesos de neovascularización/degeneración inducida ante tratamientos específicos para corregir enfermedades neurodegenerativas, especialmente de la retina.

BIBLIOGRAFÍA

Branch, A.; Tward, D.; Vogelstein, J.; Wu, Z.; Gallagher, M. 2019. An optimized protocol for iDISCO+ rat brain clearing, imaging, and analysis. BioRxiv, <https://doi.org/10.1101/639674>.

Cai, R. et al. (2019). Panoptic imaging of transparent mice reveals whole-body neuronal projections and skull–meninges connections. *Nat. Neurosci.* 22, 317–327.

Candéo, A.; Doccula, F.; Valentini, G.; Bassi, A.; Costa, A. 2017. Light Sheet Fluorescence Microscopy Quantifies Calcium Oscillations in Root Hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 58(7): 1161–1172.

Chung, K. et al. 2013. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497, 332–337.

Chung, K. y Deisseroth, K. 2013. CLARITY for mapping the nervous system. *Nature Methods*, 10(6): 508-513.

Corsetti, S.; Gunn-Moore, F.; Dholakia, K. 2019. Light sheet fluorescence microscopy for neuroscience. *Journal of Neuroscience Methods*, 319: 16-27.

Dotd, H. U. et al. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat. Methods* 4, 331–336 (2007).

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*, 9:10571.

Elliott, A. 2020. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom*, 92(1): e68.

Ertürk, A.; Becker, K.; Jährling, N.; Mauch, C.; Hojer, C.; Egen, J.; Hellal, F.; Bradke, F.; Sheng, M.; Dotd, H. 2012. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nature Protocol*, 7(11): 1983-1995.

Gorelashvili, M. 2019. Investigation of megakaryopoiesis and the acute phase of ischemic stroke by advanced fluorescence microscopy. Doctoral Thesis. School of Life Sciences, Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Kutaisi, Georgia.

Henning, Y.; Osadnik, C.; Pascal, E. 2019. EyeCi: Optical clearing and imaging of immunolabeled mouse eyes using light-sheet fluorescence microscopy. *Experimental Eye Research*, 180: 137–145.

Hiroki R. Ueda, Ali Ertürk, Kwanghun Chung, Viviana Gradinaru, Alain Chédotal, Pavel Tomancak & Philipp J. Keller (2020). Tissue clearing and its applications in neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 21: 61–79.

Icha, J.; Schmied, C.; Sidhaye, J.; Tomancak, P.; Preibisch, S.; Norden, C. 2016. Using Light Sheet Fluorescence Microscopy to Image Zebrafish Eye Development. *Journal of Visualized Experiments*, (110): 53966.

Klingberg, A.; Hasenberg, A.; Ludwig, I.; Medyukhina, A.; Männ, L.; Brenzel, A.; Engel, D.; Thilo, M.; Kurts, C.; Gunzer, M. 2017. Fully Automated Evaluation of Total Glomerular Number and Capillary Tuft Size in Nephritic Kidneys Using Lightsheet Microscopy. *J Am Soc Nephrol*, 28: 452–459.

McCance, B.; Hemmings, G.; Mappa, G.; & Slaney, H. 2019. The role of Light-Sheet microscopy in understanding early (pT1/2) colorectal cancer development.

Memeo, R.; Paiè, P.; Sala, F.; Castriotta, M.; Guercio, C.; Vaccari, T.; Osellame, R.; Bassi, A.; Bragheri, F. 2021. Automatic imaging of *Drosophila* embryos with light sheet fluorescence microscopy on chip. *Journal of Biophotonics*, 14(3): e202000396.

Poguzhelskaya, E.; Artamonov, D.; Bolshakova, A.; Vlasova, O.; Bezprozvanny, I. 2014. Simplified method to perform CLARITY imaging. *Molecular Neurodegeneration*, 9(19).

Prahst, C.; Ashrafzadeh, P.; Mead, T.; Figueiredo, A.; Chang, K.; Richardson, D.; Venkaraman, L.; Richards, M.; Martins, A.; Harrington, K., Ouarné, M.; Peña, A.; Feng, D.; Claesson, L.; Cho, K.; Franco, C.; Bentley, K. 2020. Mouse retinal cell behaviour in space and time using light sheet fluorescence microscopy. *eLife*, 9:e49779.

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. *Science Advances*, 5: eaau8355.

R. Tomer, K. Khairy, F. Amat, P.J. Keller. 2012. Quantitative high-speed imaging of entire developing embryos with simultaneous multiview light-sheet microscopy. *Nat. Methods*, 9: 755.

Richardson, D.; Lichtman J. 2015. Clarifying tissue clearing. *Cell*, 162: 246-257. Ross, M. y Wojciech, P. 2016. *Histología: un texto y un atlas: con biología celular y molecular correlacionada (7ª ed.)*. Wolters Kluwer. 984 pág. ISBN 978-1451187427.

Sanderson, M.; Smith, I.; Parker, I.; Bootman, M. 2014. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*, 10: pdb.top071795.

Seo, J., Choe, M. & Kim, S.Y. (2016) Clearing and labeling techniques for large-scale biological tissues. *Molecules and Cells*, 39, 439–446.

Susaki, E. A. & Ueda, H. R. (2016). Whole-body and whole-organ clearing and imaging techniques with single-cell resolution: toward organism-level systems biology in mammals. *Cell Chem. Biol.* 23, 137–157.

Tainaka, K., Kuno, A., Kubota, S. I., Murakami, T. & Ueda, H. R. (2016). Chemical principles in tissue clearing and staining protocols for whole-body cell profiling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32, 713–741.

Vigouroux, R. J., Belle, M. & Chédotal, A. (2017). Neuroscience in the third dimension: shedding new light on the brain with tissue clearing. *Mol. Brain* 10, 33.

Y. Xiao, A. Faucherre, L. Pola-Morell, J.M. Heddlestone, T.-L. Liu, T.-L. Chew, F. Sato, A. Sehara-Fujisawa, K. Kawakami, H. López-Schier. 2015. High-resolution live imaging reveals axon-glia interactions during peripheral nerve injury and repair in zebrafish. *Dis. Models Mech.*, 8 (2015), pp. 553-564.

Zeiss. 2021. ZEISS Apotome 3: Optical sectioning in fluorescence imaging for your widefield microscope. En: ZEISS. Recuperado: abril de 2021. Disponible en: <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/imaging-systems/apotome-for-biology.html>.

Zhu, D., Larin, K.V., Luo, Q. & Tuchin, V.V. (2013) Recent progress in tissue optical clearing. *Laser & Photonics Reviews*, 7(5), 732–757.

APÉNDICE

Tabla 1. Medidas de Absorbancia obtenidas en cerebros antes y después del aclaramiento a diferentes longitudes de onda.

	Muestra/Cerebros	405nm	488nm	561nm	638nm
Antes de aclaramiento	1	0,617	0,542	0,446	0,393
	2	0,836	0,65	0,435	0,377
	3	0,653	0,419	0,388	0,354
	4	1,045	0,696	0,587	0,484
	Media	0,78775	0,57675	0,464	0,402
	SD	0,19648473	0,12339469	0,08577101	0,05696198
Después de aclaramiento	1	0,514	0,154	0,062	0,01
	2	0,525	0,155	0,036	0,008
	3	0,515	0,19	0,01	0,001
	4	0,549	0,137	0,009	0,001
	Media	0,52575	0,159	0,02925	0,005
	SD	0,01627626	0,02225609	0,02515784	0,00469042

Tabla 2. Medidas de Absorbancia obtenidas en ojos antes y después del aclaramiento a diferentes longitudes de onda.

	Muestra/Ojos	405	488	561	638
Antes de aclaramiento	1	2,103	2,033	1,983	1,968
	2	1,381	1,313	1,293	1,257
	3	1,078	0,985	0,983	0,955
	4	1,121	1,015	1,01	0,975
	Media	1,42075	1,3365	1,31725	1,28875
	SD	0,474121205	0,48736673	0,46545202	0,4733627
Después de aclaramiento	1	0,77	0,512	0,378	0,256
	2	0,43	0,231	0,331	0,292
	3	0,396	0,219	0,266	0,225
	4	0,212	0,196	0,126	0,11
	Media	0,452	0,2895	0,27525	0,22075
	SD	0,232625593	0,1490425	0,1095852	0,0787459

Tabla 3. Test de normalidad de las mediciones de Absorbancias de las muestras de cerebro para análisis de eficacia de aclaramiento.

Test for normal distribution	Antes de aclaramiento				Después de aclaramiento			
	405	488	561	638	405_2	488_2	561_2	638_2
Shapiro-Wilk test								
W	0,9097	0,9502	0,8704	0,8696	0,8322	0,901	0,8745	0,8185
P value	0,4807	0,7174	0,2991	0,2963	0,1736	0,4362	0,3159	0,1397
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	4	4	4	4	4	4	4	4

Tabla 4. Test de normalidad de las mediciones de Absorbancias de las muestras de ojo para análisis de eficacia de aclaramiento.

Test for normal distribution	Antes de aclaramiento				Después de aclaramiento			
	405	488	561	638	405_2	488_2	561_2	638_2
Shapiro-Wilk test								
W	0,829	0,8317	0,8297	0,8215	0,9328	0,7208	0,9398	0,9118
P value	0,1652	0,1722	0,167	0,1466	0,611	0,0198	0,6529	0,492
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
Number of values	4	4	4	4	4	4	4	4

Resultados de las pruebas T-Student para las Absorbancias obtenidas a diferentes longitudes de onda en tejidos antes y después de aclaramiento.

Table Analyzed	Data Cerebros
Column F vs. Column A	405_2 vs. 405
Unpaired t test	
P value	0,0376
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2,658, df=6
How big is the difference?	
Mean of column A	0,7878
Mean of column F	0,5258
Difference between means (F - A) ± SEM	-0,2620 ± 0,09858
95% confidence interval	-0,5032 to -0,02079
R squared (eta squared)	0,5407
F test to compare variances	
F, DF _n , D _{fd}	145,7, 3, 3
P value	0,0019
P value summary	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Sample size, column A	4
Sample size, column F	4
Table Analyzed	Data Cerebros
Column G vs. Column B	488_2 vs. 488
Unpaired t test	
P value	0,0006
P value summary	***
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=6,663, df=6
How big is the difference?	
Mean of column B	0,5768
Mean of column G	0,1590
Difference between means (G - B) ± SEM	-0,4178 ± 0,06269
95% confidence interval	-0,5712 to -0,2643
R squared (eta squared)	0,8810
F test to compare variances	
F, DF _n , D _{fd}	30,74, 3, 3
P value	0,0188
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Sample size, column B	4
Sample size, column G	4
Table Analyzed	Data Cerebros
Column H vs. Column C	561_2 vs. 561
Unpaired t test	
P value	<0,0001
P value summary	****

Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=9,728, df=6
How big is the difference?	
Mean of column C	0,4640
Mean of column H	0,02925
Difference between means (H - C) ± SEM	-0,4348 ± 0,04469
95% confidence interval	-0,5441 to -0,3254
R squared (eta squared)	0,9404
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	11,62, 3, 3
P value	0,0739
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column C	4
Sample size, column H	4

Table Analyzed	Data Cerebros
Column I vs. Column D	638_2 vs, 638
Unpaired t test	
P value	<0,0001
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=13,89, df=6
How big is the difference?	
Mean of column D	0,4020
Mean of column I	0,005000
Difference between means (I - D) ± SEM	-0,3970 ± 0,02858
95% confidence interval	-0,4669 to -0,3271
R squared (eta squared)	0,9698
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	147,5, 3, 3
P value	0,0019
P value summary	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Sample size, column D	4
Sample size, column I	4

Table Analyzed	Data Ojos
Column F vs. Column A	405_2 vs, 405
Unpaired t test	
P value	0,0105
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3,669, df=6
How big is the difference?	
Mean of column A	1,421
Mean of column F	0,4520
Difference between means (F - A) ± SEM	-0,9688 ± 0,2641
95% confidence interval	-1,615 to -0,3226
R squared (eta squared)	0,6917

F test to compare variances	
F, DF _n , D _{fd}	4,154, 3, 3
P value	0,2727
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	4
Sample size, column F	4

Table Analyzed	Data Ojos
Column G vs. Column B	488_2 vs, 488

Mann Whitney test	
P value	0,0286
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,G	26 , 10
Mann-Whitney U	0

Difference between medians	
Median of column B	1,164, n=4
Median of column G	0,2250, n=4
Difference: Actual	-0,9390
Difference: Hodges-Lehmann	-0,8100

Table Analyzed	Data Ojos
Column H vs. Column C	561_2 vs, 561

Unpaired t test	
P value	0,0048
P value summary	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=4,358, df=6

How big is the difference?	
Mean of column C	1,317
Mean of column H	0,2753
Difference between means (H - C) ± SEM	-1,042 ± 0,2391
95% confidence interval	-1,627 to -0,4570
R squared (eta squared)	0,7599

F test to compare variances	
F, DF _n , D _{fd}	18,04, 3, 3
P value	0,0402
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes

Data analyzed	
Sample size, column C	4

Sample size, column H

4

Table Analyzed Column I vs. Column D	Data Ojos 638_2 vs, 638
Unpaired t test	
P value	0,0043
P value summary	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=4,451, df=6
How big is the difference?	
Mean of column D	1,289
Mean of column I	0,2208
Difference between means (I - D) ± SEM	-1,068 ± 0,2399
95% confidence interval	-1,655 to -0,4809
R squared (eta squared)	0,7676
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	36,14, 3, 3
P value	0,0149
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Sample size, column D	4
Sample size, column I	4