

Artículo de revisión

Principios y aplicaciones de la microscopia láser confocal en la investigación biomédica

Principles and applications of laser confocal microscopy in biomedical research

Ambar López-Macay,* Javier Fernández-Torres,† Angélica Zepeda‡

* Investigador, Instituto Nacional de Rehabilitación. Lab. de Genética y Genómica.

† Investigador, Instituto Nacional de Rehabilitación. Lab. de Líquido Sinovial.

‡ Investigador Titular, Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Dirección para correspondencia:
Angélica Zepeda
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental.
Sede del 3° Circuito Exterior, edificio «C»,
2° piso, Lab. C-213, Ofic. C-211.
Universidad Nacional Autónoma de México.
Circuito Mario de la Cueva s/n,
Coyoacán, Ciudad Universitaria,
04510, Ciudad de México
Tel: 5622-9215
E-mail: azepeda@biomedicas.unam.mx

Recibido: 03 de septiembre de 2015.
Aceptado: 24 de abril de 2016.

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:
<http://www.medigraphic.com/rid>

Palabras clave:

Microscopia láser confocal, fluorescencia, confocalidad, Z-stack, imagen 3D.

Key words:

Confocal laser scanning microscopy, fluorescence, confocality, Z-Stack, 3D imaging.

Resumen

La microscopia confocal es una herramienta ampliamente utilizada y de apoyo en el área biomédica que ofrece la posibilidad de obtener imágenes con una alta resolución espacial. Lo anterior se debe al principio de confocalidad que permite dirigir el haz de luz láser que ilumina la muestra a un plano focal limitado por el usuario, lo que evita que la adquisición de información quede fuera de foco, lo que mejora significativamente la resolución espacial en particular en el plano «z» (plano de profundidad) de una imagen, generando información más precisa que la que genera un sistema de fluorescencia convencional. Con la microscopia confocal es posible obtener y analizar imágenes tanto de cultivos celulares, como de especímenes con un grosor en el rango de los cientos de micras tales como secciones de tejido que contengan células y moléculas autofluorescentes o marcadas con fluoróforos. Su principal ventaja radica en la obtención de imágenes nítidas de planos correspondientes a 0.5 μm de grosor y que en conjunto con programas de imágenes de libre acceso, pueden realizarse reconstrucciones y análisis en tres dimensiones de las imágenes adquiridas. El constante desarrollo tecnológico ha facilitado el uso de la técnica y el desarrollo de nuevas aplicaciones en áreas de la biomedicina, la biología y la biotecnología. El propósito de esta revisión es dar a conocer las aplicaciones de la microscopia confocal en el campo de la biomedicina, exponiendo las ventajas que presenta con respecto a la microscopia de fluorescencia convencional y mostrar que constituye una técnica de gran alcance en la investigación biomédica que se encuentra disponible en diversas instituciones educativas y de investigación nacional, incluyendo el Instituto Nacional de Rehabilitación.

Abstract

Confocal microscopy is a widely used technique with a broad range of applications in biomedicine. It provides the possibility to acquire images from fixed tissue as well as from living cells with a high-space resolution. This relies on the basic principle of confocality, which allows to direct a beam of laser to a limited focal plane established by the user thus preventing the acquisition of out-of-focus information. This in turn improves significantly the spatial resolution of the acquired images (in particular in «z» or depth plane), generating more accurate information than that provided by conventional fluorescence microscopy. Confocal microscopy is particularly useful for acquiring and analyzing images from thick specimens, such as tissue samples containing structures like cells and for observing subcellular structures, which are either autofluorescent or have been targeted with fluorescent molecules. The main advantage of this technique is that it generates high-resolution images from as less as 0.5 microns in depth and that together with the use of free-access image software, it allows to perform three-dimensional reconstructions. Continuous improvements to the technique have made of confocal microscopy a fairly amenable tool for scientists

working in biomedical, biological and biotechnological areas. The purpose of this review is to provide a general view on the principles and applications of confocal microscopy in the field of biomedicine discussing its advantages as compared to those offered by conventional fluorescence microscopy. Confocal microscopy is a powerful tool in the field of biomedical research and is readily available in microscopy facilities nationwide including the Instituto Nacional de Rehabilitación.

Introducción

El desarrollo de la microscopia confocal surgió hace más de 50 años con la generación de un primer aparato diseñado por Marvin L. Minsky en 1957. Sin embargo, pasarían todavía 30 años antes de que la microscopia confocal empezara a usarse en las ciencias biológicas.^{1,2} La microscopia confocal hace uso de la fluorescencia convencional, pero introduce el principio de confocalidad, que se refiere a la colimación de un punto de luz en un plano particular de una muestra, aunque hay diferencias importantes entre la microscopia convencional de fluorescencia y la confocal.^{3,4} Así, comenzaremos por mencionar en qué consiste la microscopia de fluorescencia para después presentar los principios y aplicaciones de la microscopia confocal.

La microscopia de fluorescencia convencional es aquella que utiliza una fuente de luz, generalmente una lámpara de mercurio, xenón o diodos emisores de luz (LEDs) para excitar los electrones de moléculas fluorescentes contenidos en una muestra. Estas moléculas absorben una parte de la energía proporcionada por la luz y emiten fotones que se filtran en un rango específico de longitud de onda para ser captados por el observador en una longitud de onda específica. El resultado permite visualizar estructuras microscópicas, naturalmente fluorescentes o premarcadas con diversos fluorocromos en células y tejidos de plantas o animales.⁵⁻⁷ Por lo general, las muestras biológicas, especialmente de tejido, tienen un grosor en el rango de las decenas de micrómetros. En términos de microscopia, esto representa una muestra gruesa y las imágenes que derivan de su observación están contaminadas por la luz emitida debido a la superposición de los elementos del tejido que están fuera de foco, tanto por encima como por debajo del plano enfocado. De esta manera, la región enfocada de interés contiene la luz proveniente del plano focal, pero también de los planos que están fuera de foco (*Figura 1*).

Principio del sistema de microscopia confocal

La microscopia confocal forma parte de las técnicas de microscopia de luz fluorescente. No obstante,

los microscopios confocales, a diferencia de los de fluorescencia convencional, emplean láser como fuente de luz. La posibilidad de obtener una imagen confocal radica en que la luz proveniente del láser pasa por un diafragma o *pinhole*, que consiste en un pequeño orificio en el filtro detector de la luz que impide el paso de la luz procedente de los planos de la muestra que están fuera de foco (*Figura 2*). Esto da como resultado que el observador pueda recibir la luz proveniente de una región de sólo 500 nanómetros de profundidad contenida en un corte de tejido cuyo grosor esté en el rango de las decenas de micras. A la imagen que contiene información de una zona de grosor menor al de la muestra se le denomina «corte óptico»; una de las grandes ventajas de la microscopia confocal es que permite realizar varios cortes ópticos finos en muestras gruesas y además efectuar reconstrucciones tridimensionales a partir de varios cortes ópticos continuos. Con la confocalidad es posible entonces obtener una imagen con la información proveniente de la región enfocada (en los planos x, y, z) y se elimina el resto de la luz proveniente de la muestra. El resultado es una imagen con una alta resolución espacial en la que pueden distinguirse dos puntos que se encuentran a una distancia de 200 μm micras en los planos «x, y», y de 500 μm micras en el plano «z».⁸⁻¹¹

Otro de los componentes esenciales del microscopio confocal es el detector o fotomultiplicador (*photomultiplier tube*) que multiplica la corriente producida por la luz emitida, lo que facilita la detección de fotones individuales provenientes de la muestra y moléculas fluorescentes de interés aun cuando se encuentren en cantidades muy bajas en la muestra. Los microscopios confocales se manejan a través de una computadora y un programa especializado, de manera que las imágenes de este tipo no pueden observarse a través de los oculares, sino que se despliegan en el monitor de una computadora.

Con el programa que controla el microscopio confocal puede determinarse la ganancia de excitación de la muestra y obtener secciones ópticas múltiples en el plano «z», es decir en el plano de la profundidad de la muestra. A partir de estas imágenes, es posible generar de forma automatizada

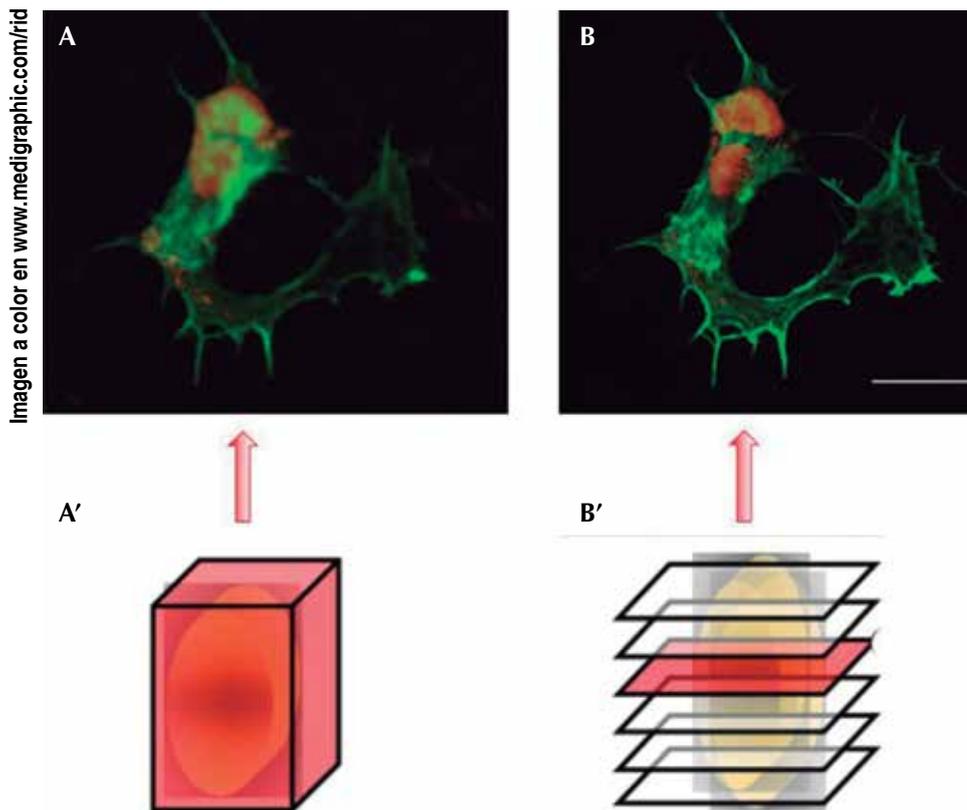


Figura 1.

Comparación entre imágenes obtenidas con un microscopio de fluorescencia y un sistema de microscopía confocal. Rojo: núcleos; verde: actina. **A)** Células de neuroblastoma capturadas con microscopía convencional de fluorescencia, en las que se observa la fluorescencia emitida por un plano focal que comprende 7 μm de profundidad. **A')** Esquematación del plano focal capturado en A). **B)** Se muestra el mismo campo que en A) adquirido con microscopía confocal, en el que la fluorescencia emitida corresponde a un plano focal que comprende 1 μm de grosor. **B')** Esquematación del plano focal capturado en B). Escala de calibración: 10 μm (imagen, cortesía de Patricia Ferrera y Dra. Clorinda Arias, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

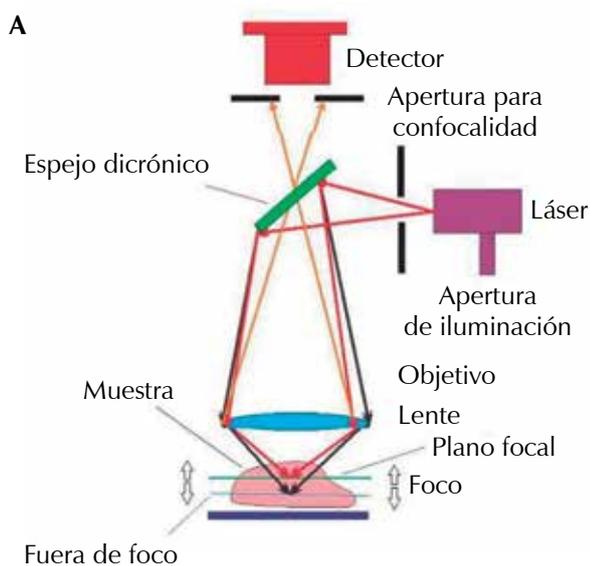


Figura 2. Diagrama del sistema de microscopía láser confocal. Se indica con flechas la incidencia, el reflejo y la filtración de la luz láser que impacta en la muestra y la luz reflejada por ésta que llega al sistema de detección.

una reconstrucción del tejido en el plano «z» (un *z-stack*) que contiene la información del grosor de todo el tejido con una alta resolución espacial.¹²⁻¹⁵ Si consideramos que el *z-stack* contiene la información sumada de un número de planos focales, la imagen resultante contiene tres dimensiones (3D). El software permite girar la imagen 3D y así obtener información adicional de la muestra (Figura 3). Estas herramientas de reconstrucción de imágenes se han usado ampliamente en el campo de biomedicina para determinar la colocalización estructural de elementos celulares que se encuentren a una distancia máxima de 500 nanómetros.

Aparte del estativo o cuerpo del microscopio y la computadora que controla los parámetros de adquisición de la imagen, un microscopio confocal requiere: 1) una fuente de luz con varios láser con emisiones distintas que incluyan argón (458, 476, 488, 496 y 514 nm), helio-neón (543 nm), helio-neón (633 nm) y diodo azul (405 nm); 2) filtros ópticos de excitación que permitan el paso de los rangos de longitud de onda que se ajusten al espectro de los fluorocromos que se desea excitar; y 3) filtros de barrera que den el paso sólo a la fluorescencia

emitida en la longitud de onda que se desea detectar eliminando otras no deseadas.¹² Los microscopios más modernos cuentan con un sistema de filtros acusto-ópticos sintonizables «Acousto-Optic Tunable Filters (AOTFs)» que están acoplados a una o más fuentes de luz láser y a un aparato electro-óptico que restringe las longitudes de onda tanto de excitación, como de emisión. Esta configuración permite el análisis de un mayor número de partículas fluorescentes que los microscopios que utilizan filtros externos.

En cuanto a los objetivos, debe contarse con aquellos que tengan aumentos mayores de 40x. Es importante mencionar que los objetivos 10x y 20x son útiles para enfocar la muestra al hacer la observación por los oculares, pero no se usan para la captura confocal, ya que la confocalidad se pierde. La razón es que tanto la resolución espacial como el grosor óptico de la sección dependen de la apertura numérica (N.A.) del objetivo (a mayor N.A. mayor paso de luz y mayor resolución) y los objetivos 10x y 20x suelen tener N.A. bajas para propósitos de obtención de imágenes confocales.¹⁶ Vale la pena acotar que todos los parámetros de adquisición de la imagen (por ejemplo, filtros de emisión y excitación a usar, objetivo, diámetro del *pinhole*, sensibilidad del fotomultiplicador) son decisión del investigador y que el programa realizará la captura de la imagen con base en los parámetros seleccionados.

Aplicaciones de la microscopia confocal

Los tipos de muestras que se analizan por microscopia confocal son básicamente los mismos que se utilizan para observación con epifluorescencia. El investigador evalúa muestras biológicas incluidas en parafina, congeladas o fijadas y montadas en laminillas. Estas muestras pueden ser de tejidos humanos, animales y vegetales, células en cultivo, cortes de órgano frescos y pequeñas especies como insectos, helmintos, protozoarios y una gran variedad de organismos.^{17,18} Con la utilización de un sistema confocal invertido a diferencia de uno de óptica vertical es posible trabajar con cajas y placas de cultivo, así como con organismos pequeños para su observación directa.^{19,20}

La microscopia confocal sirve como herramienta para estudios de expresión y coexpresión de proteínas u otro tipo de biomoléculas en una preparación. La colocalización óptica de dos biomoléculas, por ejemplo, permite determinar si una proteína de interés se expresa simultáneamente en una misma región de la célula o si dos o más proteínas se encuentran físicamente cerca bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas. A través de esta técnica se obtienen no sólo imágenes estáticas, sino también se capturan procesos que ocurren en tiempo real. En un sistema confocal acoplado a una incubadora de células pueden diseñarse experimentos en los

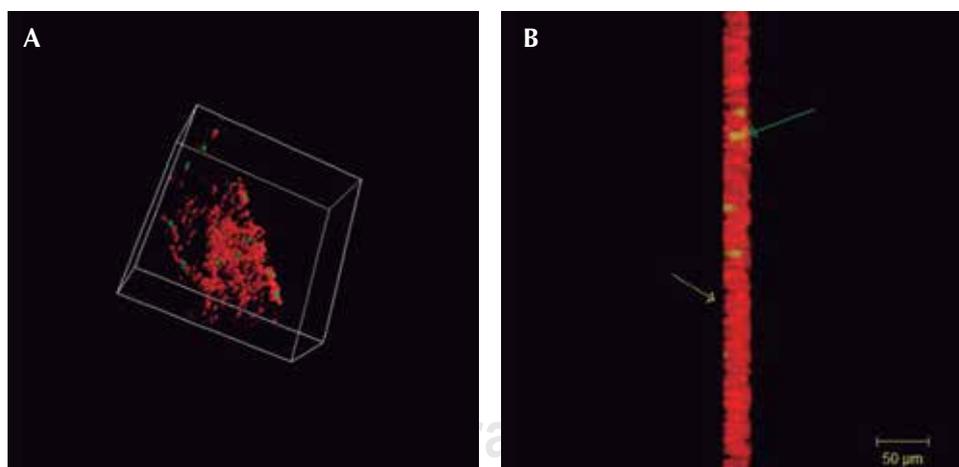


Figura 3. Imágenes tridimensionales de proyecciones en el eje «y» obtenidas por microscopia confocal. (A-B) Se muestran imágenes de secciones ópticas obtenidas de un corte longitudinal de una vena humana umbilical perfundida con células tumorales del linfoma U937 adheridas al endotelio vascular. Los núcleos endoteliales se observan en rojo al ser teñidos con yoduro de propidio (flecha blanca) y en color verde se observan las células U937 al ser marcadas por tinción con carboxifluoresceína (flecha verde). En **A** se muestra una imagen que puede rotar en distintos ángulos. **B** muestra una imagen lateral de células tumorales verdes en medio de la zona de núcleos de células endoteliales.

que el investigador sea capaz de monitorear todo un proceso dinámico o cambios fisiológicos y adquirir videos en tiempo real de las observaciones para su posterior análisis. Los procesos celulares que se estudian pueden ser muy variados como actividades enzimáticas, fagocitosis, apoptosis, reacciones de oxidación, pH intracelular, comunicación o unión entre células, entre otras.^{21,22}

Algunas de las aplicaciones de la microscopia confocal en la investigación en biomedicina abarcan: el análisis de colocalización de biomoléculas membranales o intracelulares; cambios en la expresión y distribución de moléculas en organelos y el análisis 3D de componentes y organelos celulares (Figura 4).^{23,24}

En el área de la dermatología, la microscopia confocal se utiliza en el estudio de queratosis seborreica, angioma, queratosis actínica, melanoma maligno, psoriasis y pénfigo vulgar, entre otras.^{25,26} La microscopia confocal es de suma utilidad en el

área oftalmológica, pues se usa como herramienta diagnóstica de infecciones de la córnea y en la evaluación de la vasculatura del limbo, la conjuntiva, la homeostasis celular ocular, la degeneración macular y permite la visualización *in vivo*, en tiempo real y con alta resolución de las delgadas capas de los tejidos del globo ocular. Se usa también para identificar las características del proceso de cicatrización de heridas de la córnea tras una cirugía o por el desgaste impuesto por el uso de lentes de contacto. Esta herramienta se ha usado para monitorear los cambios en la densidad de queratocitos de pacientes con queratocono, así como para observar los cambios temporales en la densidad y la organización de los nervios subepiteliales en respuesta a cirugía o en procesos patológicos.^{27,28}

En el área músculo-esquelética, la incorporación de tetraciclina al hueso y su carácter fluorogénico ha permitido evaluar por microscopia confocal procesos como la osteonecrosis y osteorradionecrosis mandibular.²⁹ En estudios de osteoartritis (OA) se ha logrado evaluar cambios en la morfología de los condrocitos y en la microestructura del cartílago de pacientes con OA mediante la reconstrucción de imágenes en 3D. En la colocación de implantes o en terapias celulares ha sido posible estudiar la regeneración del tejido y evaluar el estado de lubricación de las articulaciones. La medicina regenerativa y del desarrollo es otra de las áreas en las que la microscopia confocal es esencial, ya que gracias a ella se han logrado capturar imágenes de alta resolución de etapas y alteraciones en el desarrollo embrionario y la identificación de proteínas en la diferenciación y regeneración de tejidos u órganos.³⁰⁻³⁵ El diagnóstico genético es otra área beneficiada por la microscopia confocal, pues en conjunto con la técnica de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) ha sido posible evidenciar genes candidatos involucrados en enfermedades hereditarias, observándose su ubicación a través del marcaje de cromosomas en células vivas.^{36,37}

En las patologías infecciosas y parasitarias, la microscopia confocal permite monitorear procesos de fagocitosis, autofagia y apoptosis en células infectadas por diversos agentes patógenos como el VIH, micoplasmas, *Acanthamoeba*, *Aspergillus*, helmintos, algunos tipos de herpes virus, entre muchas otras.³⁸⁻⁴¹

En el área oncológica, esta técnica ayuda a identificar y determinar el espaciamiento de neovasos, así como la permeabilidad celular de los mismos y las anomalías estructurales que se presentan durante la progresión tumoral, ya sea en biopsias o en modelos

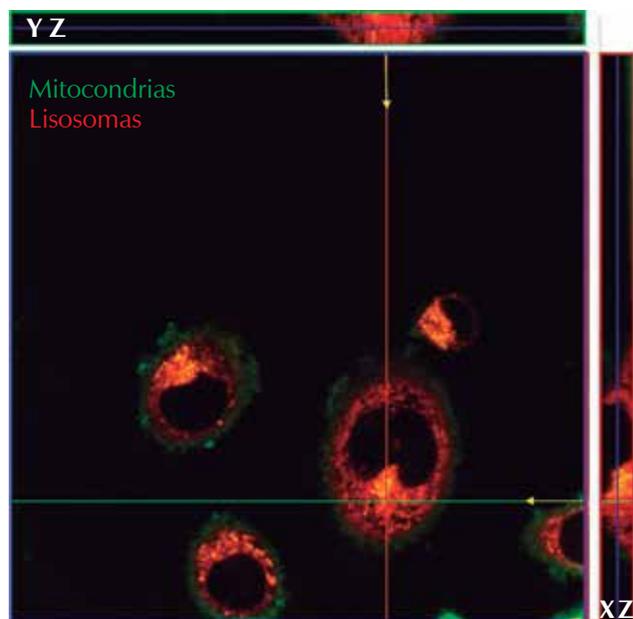


Figura 4. Imagen confocal que contiene la información de un z-stack. La imagen obtenida a partir de 10 secciones ópticas muestra la fluorescencia de células HeLa teñidas con mitotracker (verde) y lisotracker (rojo). Imagen central: plano XY; las flechas amarillas indican los planos ortogonales observados en YZ (superior) y XZ (derecha) correspondientes a la imagen central. Nótese que pueden definirse las regiones de colocalización y las regiones en las que sólo se encuentran mitocondrias o lisosomas. Escala de calibración 20 micras.

Imagen a color en www.medigraphic.com/rid

animales. En modelos *in vitro* de melanoma se han observado re-arreglos del citoesqueleto y cambios en el perfil de proteínas involucradas en la invasión tumoral. Algunas herramientas especializadas para usarse *in vivo* derivadas del principio de confocalidad como la endomicroscopia confocal (sin fluorescencia) contribuyen a un mejor diagnóstico de tumores como en el cáncer gastrointestinal.⁴²⁻⁴⁴

En modelos murinos de cáncer de mama se ha estudiado el desarrollo de tumores y se ha identificado por ultrasonido, imagenología y por microscopia confocal la formación de microtumores en áreas ductales y alveolares de la mama. Al igual que el ultrasonido existen otras técnicas de imagen no invasivas como la resonancia magnética, tomografía computarizada, la tomografía por emisión de positrones y la ecografía óptica, que evidencian procesos de angiogénesis en seres humanos y animales, pero éstos tienen una menor resolución y especificidad que la microscopia confocal, por lo que estas técnicas pueden ser complementarias.^{45,46}

Requisitos para analizar una muestra por microscopia confocal:

- 1) Pueden analizarse células fijas, muestras de tejido o especímenes de un grosor que no exceda el espacio disponible entre una laminilla y un cubreobjetos.
- 2) Las muestras deben estar marcadas con moléculas fluorescentes o ser autofluorescentes.
- 3) Los fluorocromos con los que se marquen las muestras deben estar en correspondencia con los láser y con los filtros de excitación y emisión con los que cuenta el microscopio, puesto que estos láser deben ser capaces de excitar la molécula de interés en la longitud de onda deseada. Los fluorocromos comerciales pueden ser sustancias fluorescentes como el yoduro de propidio o la carboxifluoresceína o anticuerpos acoplados a fluorocromos y deben considerarse los rangos de longitud de onda de cada uno si van a utilizarse en la misma muestra.
- 4) El tejido biológico debe estar correctamente perfundido para evitar autofluorescencia proveniente de células y vasos sanguíneos.

Aplicaciones avanzadas de microscopia confocal

Recuperación de fluorescencia por fotoblanqueo (FRAP)

La técnica de recuperación de la fluorescencia posterior al fotoblanqueo o FRAP (por sus siglas en inglés,

Fluorescence Recovery After Photobleaching) es una técnica que permite analizar la difusión y movimiento de macromoléculas biológicas mediante el blanqueo o destrucción de las moléculas fluorescentes en una zona de interés de una muestra. Los estudios de FRAP requieren que la muestra no esté fijada y puede llevarse a cabo en células o tejidos vivos marcados con partículas fluorescentes unidas a la molécula de interés biológico.

Los experimentos de FRAP consisten en la obtención de una serie de imágenes utilizando una intensidad baja de láser para determinar la fluorescencia inicial y luego se aplica un alto nivel de la luz durante un tiempo corto en la región de interés para destruir las moléculas fluorescentes. Posteriormente se captura la imagen nuevamente con una intensidad baja del láser. Al final, se obtienen imágenes que permitan analizar la redistribución de las moléculas a través de la recuperación de la fluorescencia en el tiempo en la región «blanqueada». Esta técnica se ha usado principalmente para analizar la movilidad de las moléculas de lípidos en la membrana celular y se puede utilizar para el estudio de la dinámica de proteínas fuera de la membrana, una región dentro del citoplasma o estructuras celulares.

Transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET)

La técnica de transferencia de energía de resonancia Förster (fluorescente) o FRET (por sus siglas en inglés, *Förster or Fluorescence Resonance Energy Transfer*) se utiliza para determinar la proximidad entre dos moléculas marcadas dentro de la célula o en un mismo microambiente. Con ella es posible determinar la colocalización a nivel molecular, puede utilizarse tanto en preparaciones vivas, como en muestras fijas y llevarse a cabo empleando microscopios de óptica vertical e invertidos. El principio de FRET se basa en la presencia de dos moléculas fluorescentes: un donante y un receptor. La molécula «donante» se excita a una longitud de onda específica emitida por el láser. La energía generada por la excitación de esta molécula excita a su vez otra molécula que se encuentra muy cercana y esta última emite una fluorescencia detectable. Para que la transferencia de energía ocurra, el espectro de absorción del fluoróforo receptor debe traslapar al de emisión de fluorescencia del donador y la distancia entre las dos moléculas debe oscilar entre 1-10 nm.

La técnica de FRET es una herramienta valiosa para el estudio y cuantificación de las interacciones

en transducción de señales, la síntesis de complejos entre proteínas, la dinámica de membranas y el acoplamiento tridimensionales entre moléculas.

Incluso en la actualidad puede combinarse la captura de una imagen de microscopia electrónica con la obtenida por el confocal, aportando una imagen de la misma muestra con la información de ambos sistemas; a esta técnica se le llama microscopia correlativa.⁴⁷⁻⁴⁹

Conclusiones

La microscopia confocal es una herramienta de uso amplio en la investigación biomédica y sus diferentes aplicaciones abarcan la posibilidad de realizar análisis desde un nivel tejido-estructural hasta el molecular. Los avances científicos que esta técnica aporta la consolidan como una técnica de vanguardia al alcance de nuestra comunidad biomédica que permite fortalecer el vínculo con la investigación clínica.

Glosario de términos

Confocalidad: colimación de un punto de luz en un plano de profundidad particular de una muestra.

Corte óptico: imagen que despliega la luz emitida por una región específicamente iluminada en el plano «z» de una muestra.

Apertura numérica (A.N): se refiere a la capacidad de colección de luz y poder de resolución (a una distancia fija) de un objetivo. Se define como: $A.N. = I.R. \cdot \sin \theta$ donde I.R. es el índice de refracción del medio, por ejemplo, aire, agua o aceite y θ es la mitad del ángulo del máximo cono de luz que sale o entra al objetivo.

Resolución espacial: se refiere al número de píxeles utilizados en la construcción de una imagen digital. Las imágenes con mayor resolución espacial se componen de un mayor número de píxeles que las de menor resolución espacial.

Pinhole (diafragma): colimador de luz que permite el paso de un haz específico de luz y es capaz de eliminar la luz desenfocada que proviene de diferentes planos focales de una muestra gruesa.

Plano focal o plano óptico: se refiere al plano en el que el objetivo proyecta a foco la imagen de interés.

Z-stack: se refiere a reconstrucción en tres dimensiones de una imagen a partir del apilamiento digital de varias imágenes espacialmente adyacentes.

Bibliografía

1. Sheppard CJ, Wilson T. The theory of the direct-view confocal microscope. *J Microsc.* 1981; 124: 107-117.
2. Amos WB, White JG, Fordham M. Use of confocal imaging in the study of biological structures. *Appl Opt.* 1987; 26: 3239-3243.
3. Coling D, Kachar B. Principles and application of fluorescence microscopy. *Curr Protoc Mol Biol.* 2001. Chapter 14: Unit 14. 10. doi: 10.1002/0471142727.mb1410s44.
4. Sluder G, Nordberg JJ. Microscope basics. *Methods Cell Biol.* 2003; 72: 1-10.
5. Saldúa MA, Olsovsky CA, Callaway ES, Chapkin RS, Maitland KC. Imaging inflammation in mouse colon using a rapid stage-scanning confocal fluorescence microscope. *J Biomed Opt.* 2012; 17: 016006. doi: 10.1117/1.JBO.17.1.016006.
6. Sezgin E, Schwille P. Fluorescence techniques to study lipid dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3 (11): a009803. doi: 10.1101/cshperspect.a009803.
7. White JG, Amos WB, Fordham M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J Cell Biol.* 1987; 105: 41-48.
8. Wessels JT, Yamauchi K, Hoffman RM, Wouters FS. Advances in cellular, subcellular, and nanoscale imaging *in vitro* and *in vivo*. *Cytometry A.* 2010; 77: 667-676.
9. Wolenski, JS, Julich D. Fluorescence microscopy gets faster and clearer: roles of photochemistry and selective illumination. *Yale J Biol Med.* 2014; 87: 21-32.
10. Dufour P, Dufour S, Castonguay A, McCarthy N, De Koninck Y. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy for functional cellular imaging: Advantages and challenges or one photon is good... but two is better. *Med Sci (Paris).* 2006; 22: 837-844.
11. Stelzer EH, Wacker I, De Mey JR. Confocal fluorescence microscopy in modern cell biology. *Semin Cell Biol.* 1991; 2: 145-152.
12. Fritzky L, Lagunoff D. Advanced methods in fluorescence microscopy. *Stud Health Technol Inform.* 2013; 185: 23-42.
13. Földes-Papp Z1, Demel U, Tilz GP. Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview. *Int Immunopharmacol.* 2003; 3 (13-14): 1715-1729.
14. Cardinale M. Scanning a microhabitat: plant-microbe interactions revealed by confocal laser microscopy. *Front Microbiol.* 2014; 5: 94.
15. Wright SJ, Centonze VE, Stricker SA, De Vries PJ, Paddock SW, Schatten G. Introduction to confocal microscopy and three-dimensional reconstruction. *Methods Cell Biol.* 1993; 38: 1-45.
16. Piston DW. Choosing objective lenses: the importance of numerical aperture and magnification in digital optical microscopy. *Biol Bull.* 1998; 195: 1-4.

17. Piliszek A, Kwon GS, Hadjantonakis AK. *Ex utero* culture and live imaging of mouse embryos. *Methods Mol Biol.* 2011; 770: 243-257.
18. Selever J, Kong JQ, Arenkiel BR. A rapid approach to high-resolution fluorescence imaging in semi-thick brain slices. *J Vis Exp.* 2011; 26: 53. doi: 10.3791/2807.
19. Ethell DW, Cameron DJ. Imaging and 3D reconstruction of cerebrovascular structures in embryonic zebrafish. *J Vis Exp.* 2014; (86). doi: 10.3791/50417.
20. Xiao W, Chen X, Li W, Ye S, Wang W, Luo L et al. Quantitative analysis of injury-induced anterior sub-capsular cataract in the mouse: a model of lens epithelial cells proliferation and epithelial-mesenchymal transition. *Sci Rep.* 2015; 5: 8362. doi: 10.1038/srep08362.
21. Choi S, Kim JW, Lee YJ, Delmas T, Kim C, Park S et al. Evaluation of transdermal delivery of nanoemulsions in *ex vivo* porcine skin using two-photon microscopy and confocal laser-scanning microscopy. *J Biomed Opt.* 2014; 19 (10): 106006. doi: 10.1117/1.JBO.19.10.106006.
22. Hwang Y, Ahn J, Mun J, Bae S, Jeong YU, Vinokurov NA et al. *In vivo* analysis of THz wave irradiation induced acute inflammatory response in skin by laser-scanning confocal microscopy. *Opt Express.* 2014; 22: 11465-11475.
23. Beauquis J, Vinuesa A, Pomilio C, Pavia P, Saravia F. Hippocampal and cognitive alterations precede amyloid deposition in a mouse model for Alzheimer's disease. *Medicina (B Aires).* 2014; 74: 282-286.
24. Frasconi P, Silvestri L, Soda P, Cortini R, Pavone FS, Iannello G. Large-scale automated identification of mouse brain cells in confocal light sheet microscopy images. *Bioinformatics.* 2014; 30: i587-i593.
25. Koehler MJ, Speicher M, Lange-Asschenfeldt S, Stockfleth E, Metz S, Elsner P et al. Clinical application of multiphoton tomography in combination with confocal laser scanning microscopy for *in vivo* evaluation of skin diseases. *Exp Dermatol.* 2011; 20: 589-594.
26. Sattler E, Kastle R, Arens-Corell M, Welzel J. How long does protection last? *In vivo* fluorescence confocal laser scanning imaging for the evaluation of the kinetics of a topically applied lotion in an everyday setting. *Skin Res Technol.* 2012; 18: 370-377.
27. Edwards K, Pritchard N, Vagenas D, Russell A, Malik RA, Efron N. Utility of corneal confocal microscopy for assessing mild diabetic neuropathy: baseline findings of the LANDMark study. *Clin Exp Optom.* 2012; 95: 348-354.
28. Wu T, Ahmed A, Bril V, Orszag A, Ng E, Nwe P. Variables associated with corneal confocal microscopy parameters in healthy volunteers: implications for diabetic neuropathy screening. *Diabet Med.* 2012; 29: e297-e303.
29. Pautke C, Bauer F, Bissinger O, Tischer T, Kreutzer K, Steiner T et al. Tetracycline bone fluorescence: a valuable marker for osteonecrosis characterization and therapy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68: 125-129.
30. Lanzetta A, Corradini C, Verdoia C, Miani A, Castano S, Castano P. The nervous structures of anterior cruciate ligament of human knee, healthy and lesioned, studied with confocal scanning laser microscopy. *Ital J Anat Embryol.* 2004; 109: 167-176.
31. Jensen CG, Poole CA, McGlashan SR, Marko M, Issa ZI, Vujcich KV et al. Ultrastructural, tomographic and confocal imaging of the chondrocyte primary cilium *in situ*. *Cell Biol Int.* 2004; 28: 101-110.
32. Jones CW, Smolinski D, Keogh A, Kirk TB, Zheng MH. Confocal laser scanning microscopy in orthopaedic research. *Prog Histochem Cytochem.* 2005; 40: 1-71.
33. Pautke C, Vogt S, Kreutzer K, Haczek C, Wexel G, Kolk A et al. Characterization of eight different tetracyclines: advances in fluorescence bone labeling. *J Anat.* 2010; 217: 76-82.
34. Luzzati F, Fasolo A, Peretto P. Combining confocal laser scanning microscopy with serial section reconstruction in the study of adult neurogenesis. *Front Neurosci.* 2011; 5: 70. doi: 10.3389/fnins.2011.00070.
35. Tam JM, Castro CE, Heath RJ, Mansour MK, Cardenas ML, Xavier RJ et al. Use of an optical trap for study of host-pathogen interactions for dynamic live cell imaging. *J Vis Exp.* 2011; (53). doi: 10.3791/3123.
36. Volpi EV, Bridger JM. FISH glossary: an overview of the fluorescence *in situ* hybridization technique. *Biotechniques.* 2008; 45: 385-409. doi: 10.2144/000112811.
37. Golub NV, Kuznetsova VG, Rakitov RA. First karyotype data on the family *Myerslopiidae* (Hemiptera, *Auchenorrhyncha*, *Cicadomorpha*). *Comp Cytogenet.* 2014; 8: 293-300.
38. Cavanagh HD, Petroll WM, Alizadeh H, He YG, McCulley JP, Jester JV. Clinical and diagnostic use of *in vivo* confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology.* 1993; 100: 1444-1454.
39. Das K, De la Garza G, Siwak EB, Scofield VL, Dhanda-yuthapani S. *Mycoplasma genitalium* promotes epithelial crossing and peripheral blood mononuclear cell infection by HIV-1. *Int J Infect Dis.* 2014; 23: 31-38.
40. Martins VP, Moraes SB, Pinheiro CS, Assis NR, Figueiredo BC, Ricci ND et al. Sm10.3, a member of the micro-exon gene 4 (MEG-4) family, induces erythrocyte agglutination *in vitro* and partially protects vaccinated mice against *Schistosoma mansoni* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8 (3): e2750.
41. Vatter HA, Brinton MA. Differential responses of disease-resistant and disease-susceptible primate macrophages and myeloid dendritic cells to simian hemorrhagic fever virus infection. *J Virol.* 2014; 88: 2095-2106.
42. Wang WQ, Wu JF, Xiao XQ, Xiao Q, Wang J, Zuo FG. Narrow-band UVB radiation promotes dendrite formation by activating Rac1 in B16 melanoma cells. *Mol Clin Oncol.* 2013; 1: 858-862.
43. De Palma GD. Confocal laser endomicroscopy in the *in vivo* histological diagnosis of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol.* 2009; 15: 5770-5775.

44. Choi KS, Jung HY. Confocal laser endomicroscopy and molecular imaging in Barrett esophagus and stomach. *Clin Endosc.* 2014; 47: 23-30.
45. Tilli MT, Parrish AR, Cotarla I, Jones LP, Johnson MD, Furth PA. Comparison of mouse mammary gland imaging techniques and applications: reflectance confocal microscopy, GFP imaging, and ultrasound. *BMC Cancer.* 2008; 8: 21. doi: 10.1186/1471-2407-8-21.
46. Coda S, Thillainayagam AV. State of the art in advanced endoscopic imaging for the detection and evaluation of dysplasia and early cancer of the gastrointestinal tract. *Clin Exp Gastroenterol.* 2014; 7: 133-150.
47. Siegel N, Brooker G. Improved axial resolution of FINCH fluorescence microscopy when combined with spinning disk confocal microscopy. *Opt Express.* 2014; 22: 22298-22307.
48. Yew E, Rowlands C, So PT. Application of multiphoton microscopy in dermatological studies: a mini-review. *J Innov Opt Health Sci.* 2014; 7 (5): 1330010.
49. Zehri AH, Ramey W, Georges JF, Mooney MA, Martirosyan NL, Preul MC et al. Neurosurgical confocal endomicroscopy: A review of contrast agents, confocal systems, and future imaging modalities. *Surg Neurol Int.* 2014; 5: 60. doi: 10.4103/2152-7806.131638.