

**GUÍA BÁSICA PARA LA
ESTIMACIÓN
ESTEREOOLÓGICA DE ÁREA Y
VOLUMEN MEDIANTE LA
PRUEBA DE CAVALIERI EN EL
MICROSCOPIO CONFOCAL DE
DISCO GIRATORIO OLYMPUS
BX-51WI**

**Miguel Tapia R.
Unidad de Microscopía
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México**

Fecha de elaboración: Octubre de 2011

Esta guía describe la operación básica del microscopio Olympus BX51WI equipado con el módulo confocal de disco giratorio (Disk Scanning Unit; DSU) para la estimación de área y volumen de tejido o estructuras marcadas con hasta cuatro fluorocromos distintos, mediante el método estereológico del Estimador de Cavalieri.

Este manual pretende iniciar al usuario en los principios básicos del uso del DSU para realizar dicha estimación. Sin embargo, es altamente recomendable que el usuario revise previamente literatura relacionada con el Estimador o Prueba de Cavalieri. En la Unidad se encuentran disponibles artículos generales de estereología que pueden ser solicitados. De igual manera, si se requiere información mas precisa que no se incluya en la guía, se podrá solicitar asistencia al responsable de la Unidad para recibir asesoría individual.

Contacto:

Responsable: Miguel Tapia Rodríguez

Cubículo C003, Planta Baja, Torre C. Sede Circuito Exterior.

Tel. +(52) (55) 5622-9185

mtapia@biomedicas.unam.mx

MicroBrightField, el logo de MicroBrightField, Stereo Investigator, Virtual Slice y MBF CX9000 son marcas registradas de MicroBrightField Inc.

Olympus es marca registrada de Olympus Corporation.

Hamamatsu es marca registrada de Hamamatsu Photonics K.K.

Microsoft, Windows, el logo de Windows XP y los elementos GUI del sistema operativo Windows XP son marcas registradas y/o propiedad de Microsoft Corporation.

Todas las marcas son utilizadas en la presente guía con fines educativos y sin ningún fin comercial.

SOFTWARE

El software StereoInvestigator controla, -una vez encendidos los instrumentos-, la caja de mando de la platina motorizada (movimiento en X, Y y Z), las cámaras delantera y trasera, el revólver de filtros traseros así como el módulo DSU del microscopio. El software StereoInvestigator NO controla los revólveres ni de objetivos ni de filtros delanteros por lo que cuando su movimiento sea requerido será de forma manual.

El software se puede operar empleando el mouse y el teclado de la computadora y esencialmente se utiliza de la misma manera en la que opera cualquier programa compatible con el ambiente Windows.

MICROSCOPIO

El microscopio DSU funciona utilizando una lámpara de mercurio HBO100 W/2; cuenta con 2 juegos de filtros, uno trasero y uno delantero para observar las muestras y tiene la platina y el revólver trasero motorizados. Además, tiene una cámara digital a color de alta resolución en la parte delantera y una cámara CCD de alta velocidad de captura en la parte trasera.

Camara delantera:

MBF CX9000 cámara digital a color, resolución espacial de 1600 (H) x 1200 (V).

Cámara trasera:

Hamamatsu C9100 cámara EM-CCD, resolución temporal de 32 frames / seg., resolución espacial de 1024 (H) x 1024 (V).

Filtros Delanteros:

1) **Posición DSU.** Permite el paso de la luz filtrada por el revolver de filtros traseros así como por el disco giratorio.

2) Filtro U-MWU2 (DAPI)

Pase de banda de excitación: 330-385 nm

Espejo Dicroico: 400

Emisión: 420 nm

3) Filtro U-MGFPHQ (GFP, eGFP)

Pase de banda de excitación: 460-480 nm

Espejo Dicroico: 485

Emisión: 495-540 nm

4) Filtro U-MRFPHQ (Rodamina, Alexa 555)

Pase de banda de excitación: 535-555 nm

Espejo Dicroico: 565

Emisión: 570-625 nm

5) Filtro **U-N41008 (Cy5, Alexa 647)**
Pase de banda de excitación: 620-660 nm
Espejo Dicroico: 660
Emisión: 700-775 nm

Filtros Traseros:

1) Filtro **31000v2 (DAPI/Hoechst/AMCA)**
Pase de banda de excitación: 350/50 nm
Espejo Dicroico: 400dclp
Emisión: 460/50 nm

2) Filtro **41001 (FITC/Bodipy/Fluo3/DiO)**
Pase de banda de excitación: 480/40 nm
Espejo Dicroico: Q505lp
Emisión: 535/50 nm

3) Filtro **41004 (Texas Red)**
Pase de banda de excitación: 560/55 nm
Espejo Dicroico: Q595lp
Emisión: 645/75 nm

4) Filtro **41008 (Cy5, Alexa 647)**
Pase de banda de excitación: 620/60 nm
Espejo Dicroico: Q660lp
Emisión: 700/75 nm

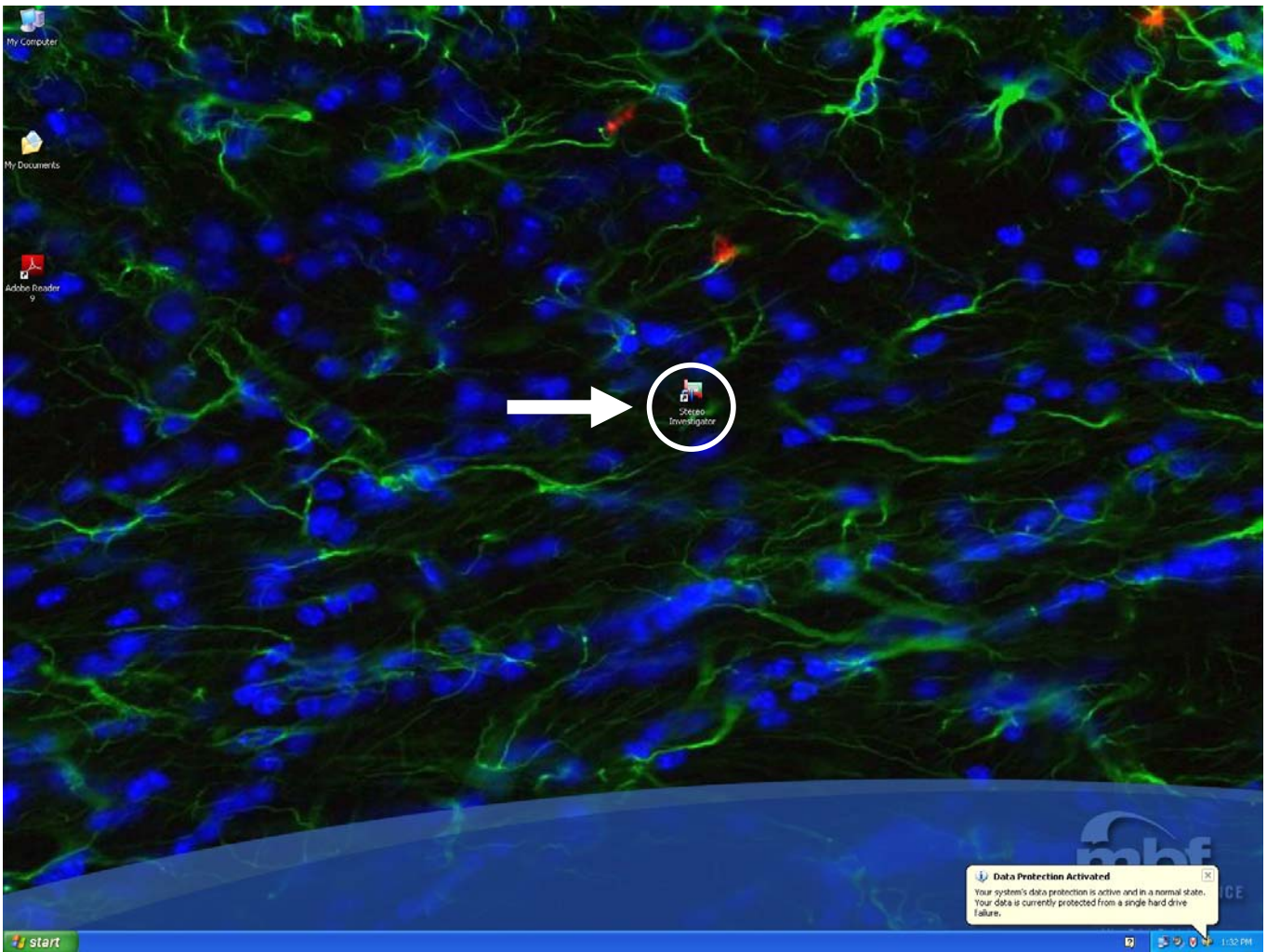
ENCENDIDO DEL EQUIPO

1. Encender la estación de trabajo (conformada por el CPU y los dos monitores).
2. Encender el módulo IX2-UCB del microscopio (caja vertical blanca).
3. Encender la caja de control de la platina motorizada Lep (caja vertical gris claro).
4. Encender la cámara trasera (Hamamatsu, caja horizontal gris con crema).
5. Encender la lámpara de fluorescencia (ubicada encima del módulo IX2-UCB).
6. Revisar que el revólver de cubos frontales del microscopio esté situado en la posición 1, que los objetivos de 4X o 10X estén al frente del revólver y que el shutter de fluorescencia esté desbloqueado, en el caso de manejar muestras marcadas con fluorescencia.

En los monitores aparecerá la siguiente ventana:

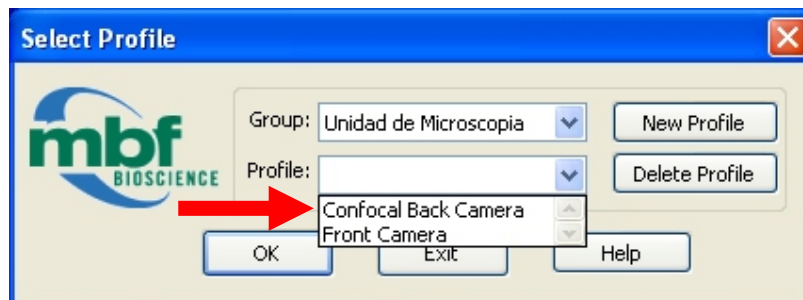


Como “User name”, teclear “**Unidad**”. Como “Password” teclear “**dsu.123**”. Esto permitirá el ingreso al sistema operativo, así como la conexión automática a las unidades de red compartidas del Instituto (X para la Sede de Circuito Escolar; W para la Sede de Circuito Exterior). Si no se realizara la conexión, favor de informar al responsable técnico para que solucione el problema.

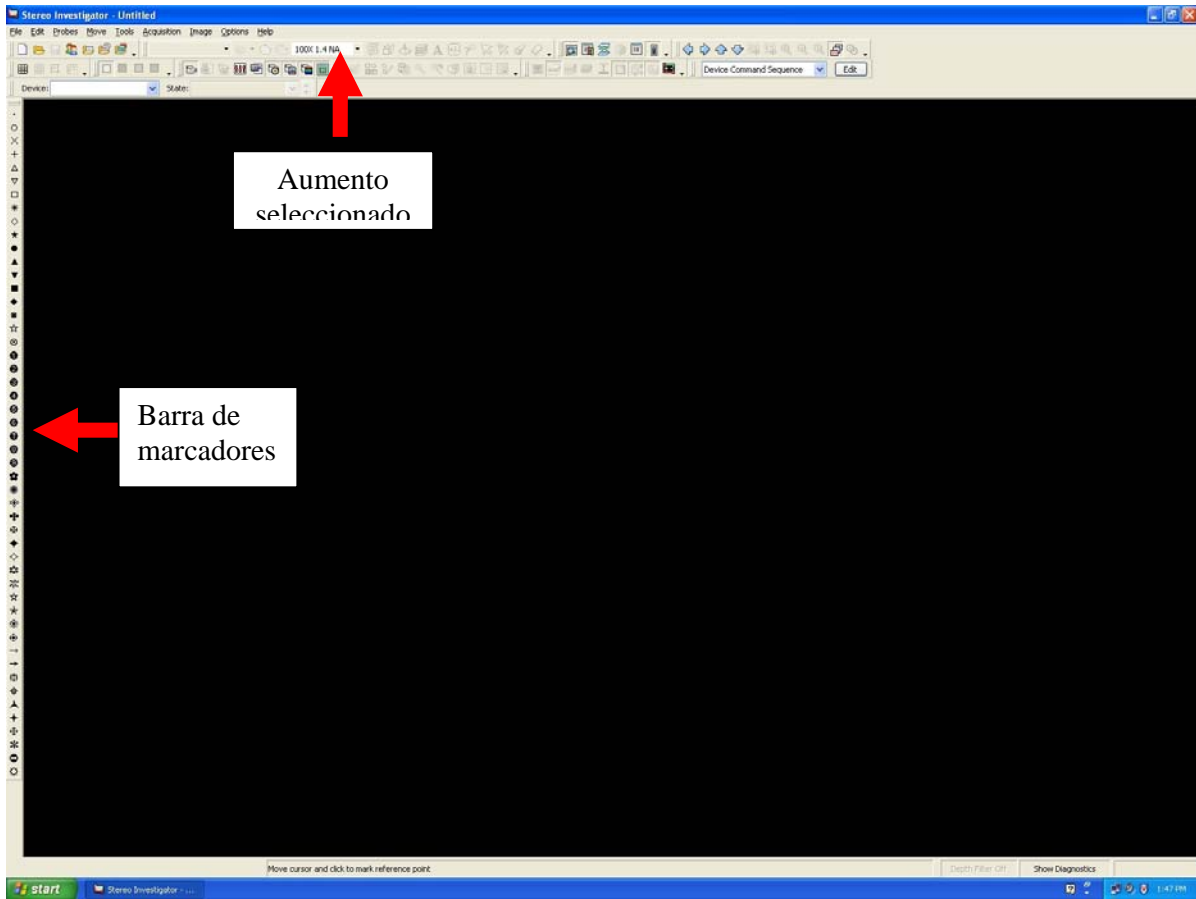


Monitor 1

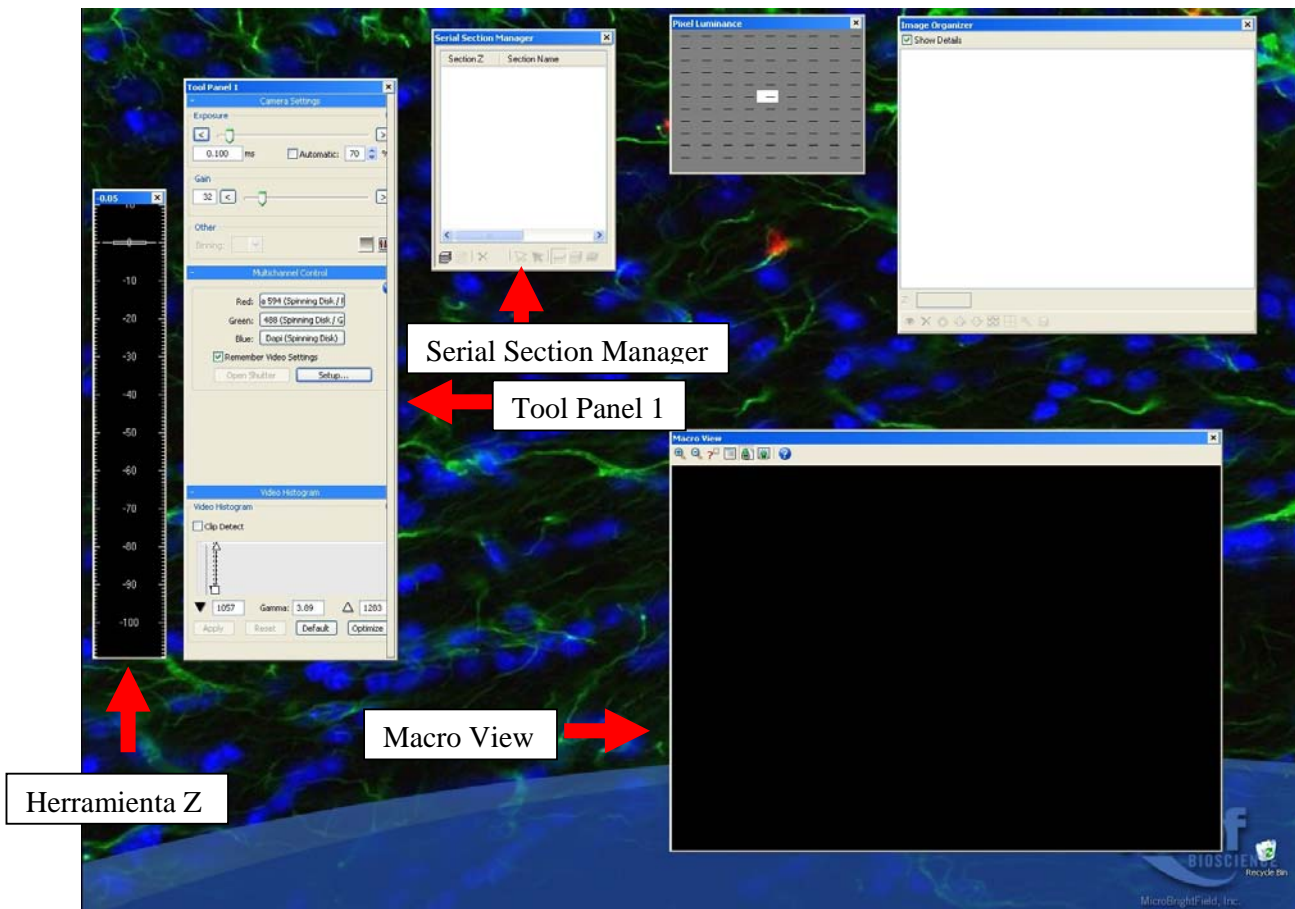
7. Haga doble click en el ícono “Stereo Investigator” para iniciar el software que opera el DSU. Aparecerá la siguiente ventana (Select Profile):



8. Seleccionar como Profile “Confocal Back Camera” y luego dar click en “OK”. Esta acción abrirá la ventana principal del programa.

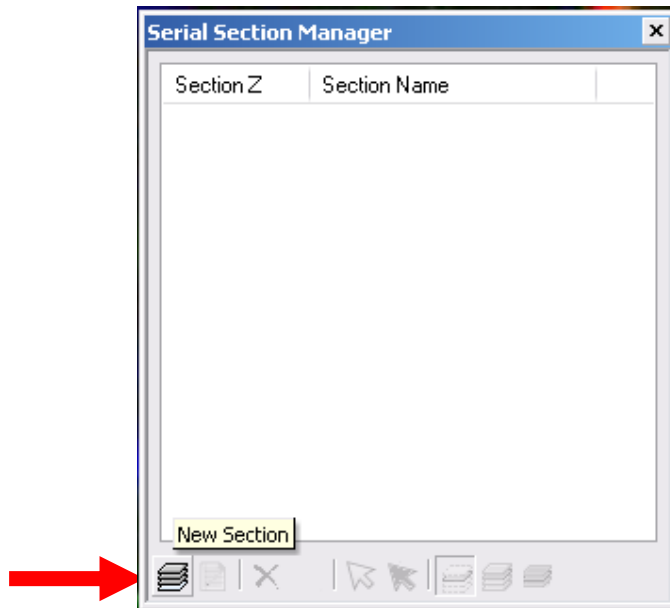


Monitor 1



Monitor 2

9. En el menú “Tools” revisar que “Serial Section Manager” esté activado. Si no lo está, dar click izquierdo para activarlo. En el Monitor 2, en la ventana de “Serial Section Manager” dar click izquierdo en el icono inferior (“New Section”) como se muestra a continuación:



10. Esto abrirá una nueva ventana de menú (Serial Section Setup):

Indicarle al software (1) el número de cortes que serán utilizados para realizar la prueba, (2) la periodicidad de muestreo, (3) el grosor de corte al cual se cortó el tejido y (4) el grosor final obtenido después del procesamiento del mismo; si se cuentan con cortes seriados de toda la estructura, se puede seleccionar al azar cual será el corte inicial (5).

Serial Section Setup

Section Information

1 Number of sections: 1

2 Evaluation Interval: 1

3 Section Cut thickness: 0.00 (µm)

4 Mounted Thickness: 0.00 (µm)

Starting Z level (optional): 0.00 (µm)

Starting section number: 1

5 Pick Random

Note

The 'Evaluation Interval' can be used to create non-consecutive sections. For example, an interval of '2' would skip every other section, while still creating the total 'Number of sections'.

Stereo Investigator assumes that subsequent sections are the same thickness, but you will be able to modify this later if necessary.

The section cut thickness for new sections is:

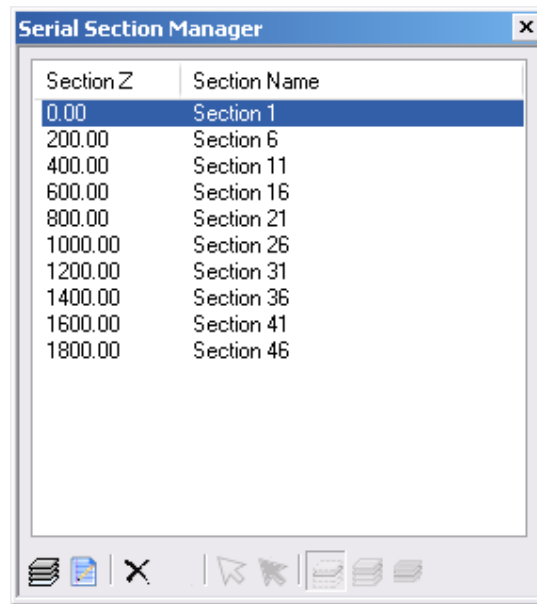
Added

Subtracted

OK Cancel

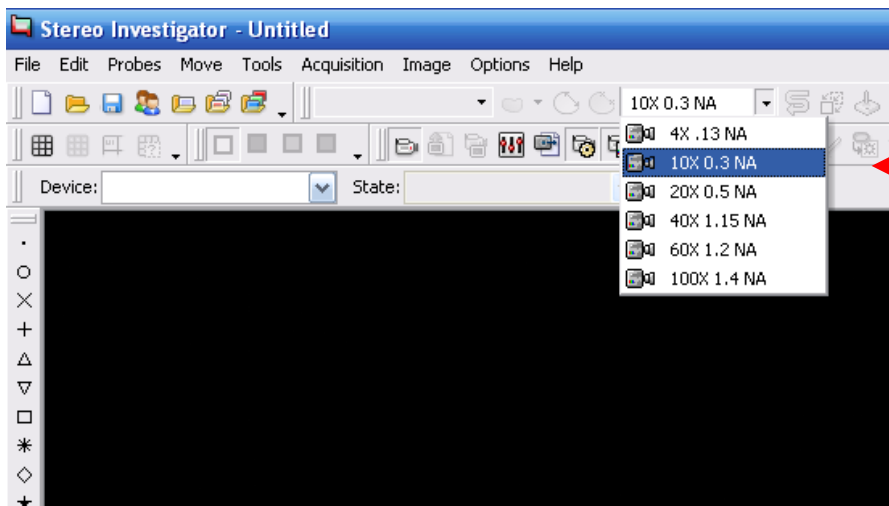
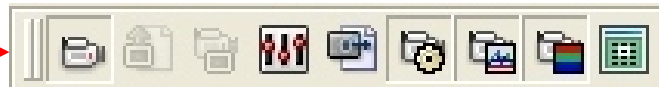
Una vez llenados todos los campos, hacer click en “OK”

11. Al completar “Serial Section Setup”, el “Serial Section Manager” mostrará el número de cortes totales que tendrán que ser trazados; comenzaremos trazando el contorno del corte 1 (Section 1, resaltado en azul).



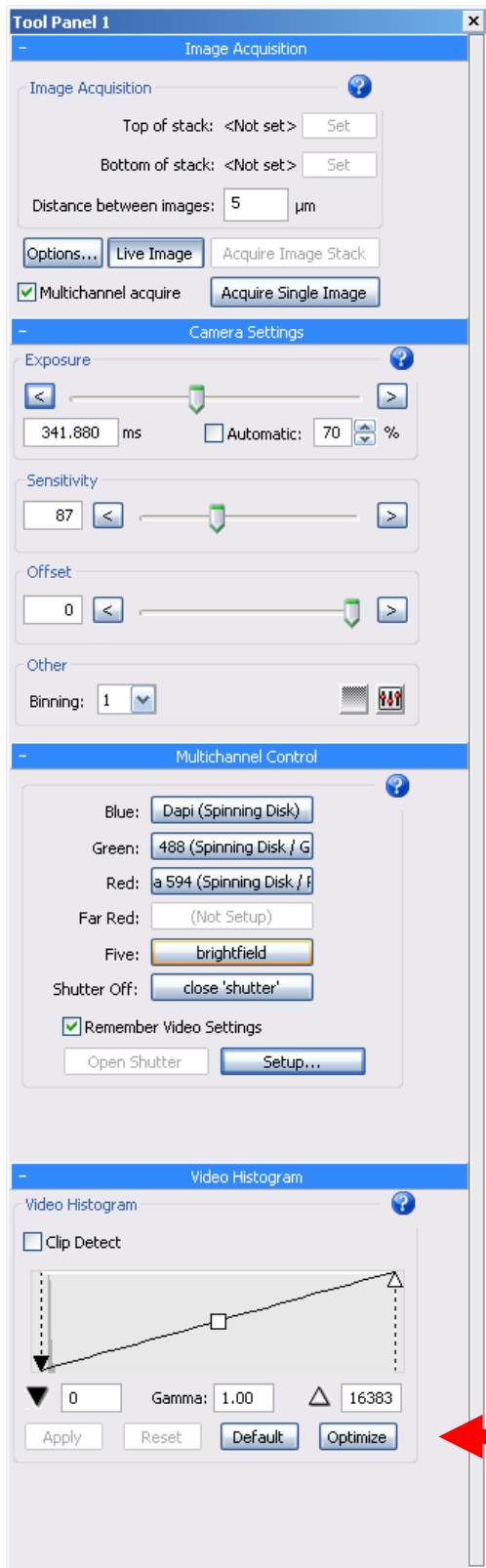
12. El siguiente paso es escoger una magnificación óptica que nos permita trazar el contorno de la región de interés. Comúnmente se recomienda usar 10X pero si la fluorescencia es lo suficientemente fuerte se podrá realizar el trazo a 4X, lo cual significa un trazado de los contornos más rápido, pero menos preciso. En este punto si no se encuentra activada, activar la opción de “Live Image”. En el microscopio, cambiar manualmente los objetivos al aumento deseado (normalmente 4X, 10X o 20X), según se seleccionó en el software. Con ayuda de la perilla lateral del joystick, enfocar la imagen hasta que se observe la región de interés.

“Live Image” activado



Seleccionar el aumento al cual se realizará el trazado de la región de interés; en este caso se seleccionará “10X”. En el microscopio, revisar que el objetivo de 10X esté al frente y se vea imagen en el Monitor 1.

13. En el Monitor 1 se debe comenzar a observar la muestra. Para obtener una imagen nítida de la misma, ir al “Multichannel Control” del “Tool Panel 1” en el Monitor 2 y escoger algún canal que nos de resolución de la estructura de interés, por ejemplo, “Brightfield”, “Dapi” (si es que está presente en la muestra) o alguna otra tinción fluorescente de gran brillantez y que defina claramente los contornos de la región a estudiar. Para la presente guía se utilizará el campo claro (“brightfield”).

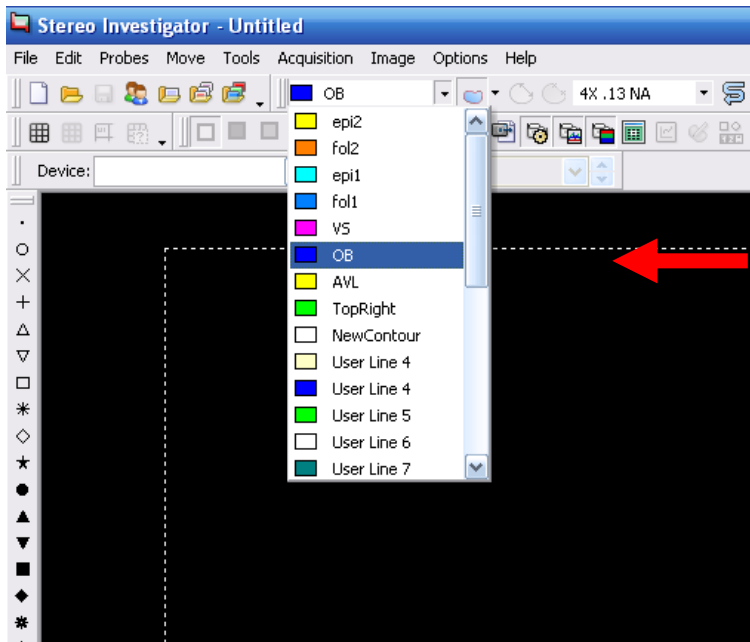


En este panel se pueden ajustar de manera manual los parámetros de exposición y de sensibilidad de la cámara. No se recomienda que se deje que la cámara detecte de manera automática el nivel de exposición, ni abusar de la Sensitivity y el Offset por el riesgo de crear falsos positivos.

En esta sección se puede seleccionar cualquier fluoróforo de la lista y el revolver trasero de cubos de fluorescencia se moverá automáticamente a dicho fluoróforo. “Close shutter” impedirá el paso de la fluorescencia al espécimen.

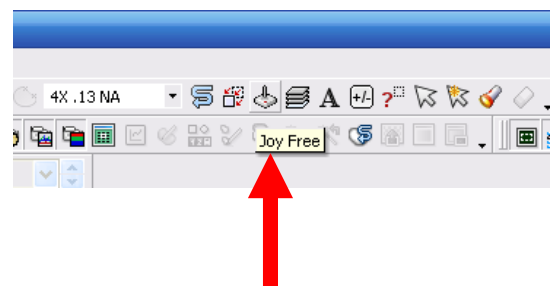
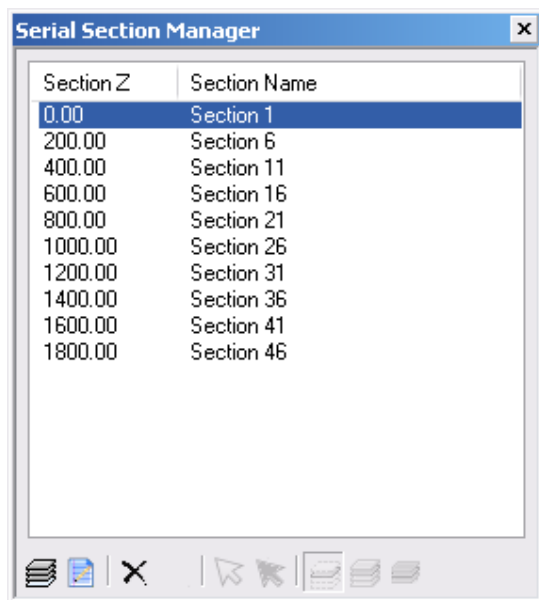
Para la mayoría de los casos, “Optimize” ajusta de manera automática el histograma de video a niveles aceptables; si se requiere una mayor definición se puede utilizar la opción de “Clip Detect” para realizar el ajuste de imagen de modo manual.

14. El siguiente paso es seleccionar el contorno a utilizar. Diversos contornos pueden ser trazados con líneas de diferente color para delimitar regiones distintas.



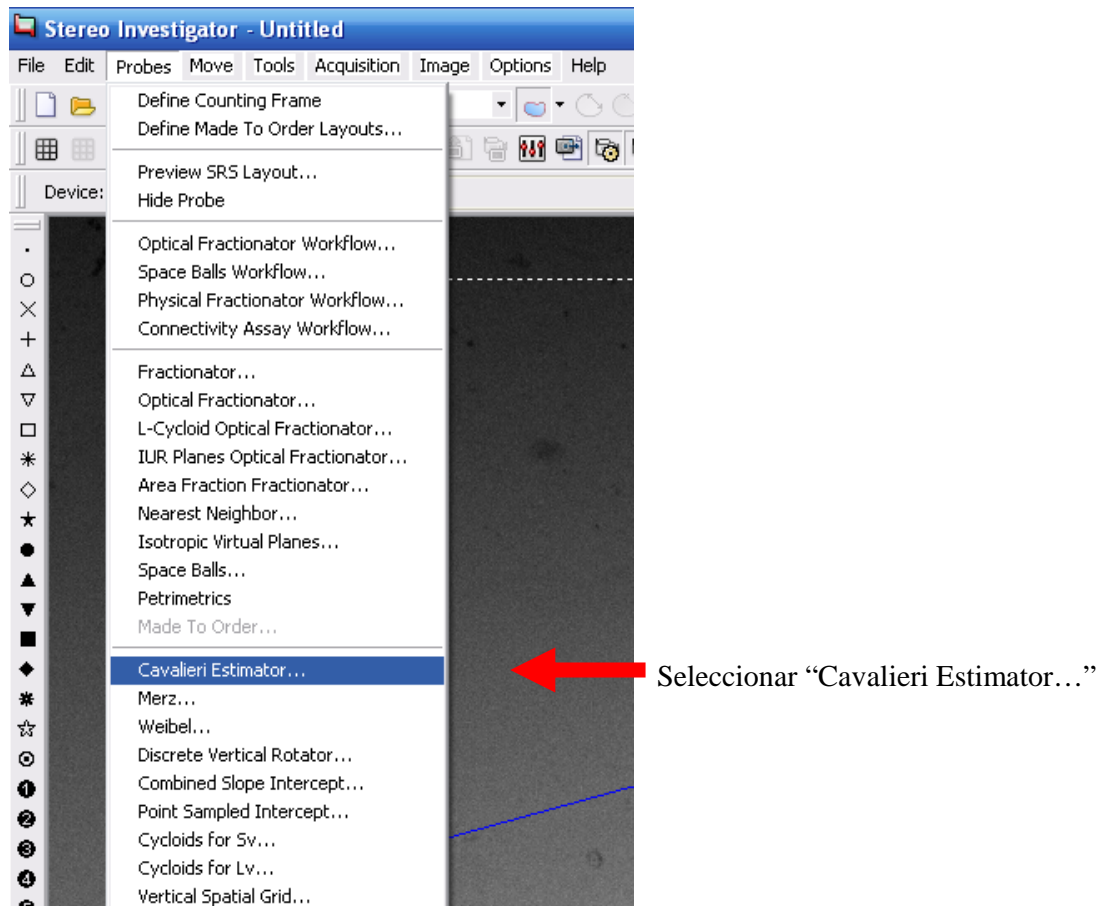
Seleccionar una línea para comenzar a trazar. El movimiento de la platina seguirá al trazado en pantalla. Una vez terminado el trazo del contorno deseado, dar click derecho sobre el mismo y seleccionar la opción “Close contour”. De ser necesario, seleccionar otra línea y repetir el procedimiento hasta tener trazadas todas las regiones de interés.

15. Es aconsejable que primero se tracen todos los contornos de interés antes de aplicar la prueba. Para ello, una vez que se ha terminado con el contorno (s) de interés en el corte 1, pasar al siguiente dando click izquierdo sobre el corte siguiente (en este ejemplo sería la sección 6). Dar click en el icono de “Joy Free” para que con ayuda del joystick podamos localizar en el microscopio el corte que corresponde (en este caso sería el corte 6) y se muestre en el Monitor 1. Posteriormente volver a dar click en “Joy Free” para que se pueda empezar a trazar la nueva sección. De manera subsecuente, repetir este paso hasta terminar de realizar el trazado del resto de los contornos de interés.

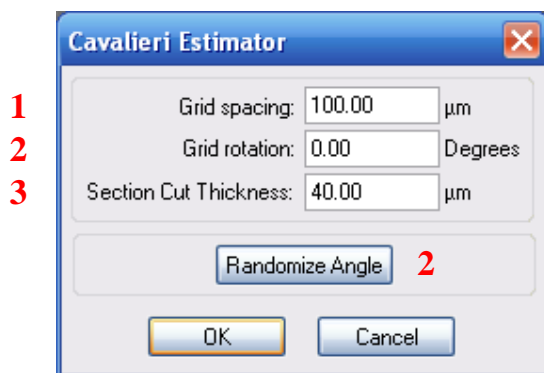


Dar click izquierdo sobre el icono de “Joy Free” para liberar el movimiento del joystick, y volverlo a presionar una vez encontrado el siguiente corte de interés para empezar a trazar los contornos.

16. una vez trazados todos los contornos de las regiones de interés de todos los cortes, ir al menú “Probes” y dar click izquierdo sobre “Cavalieri Estimator...”.

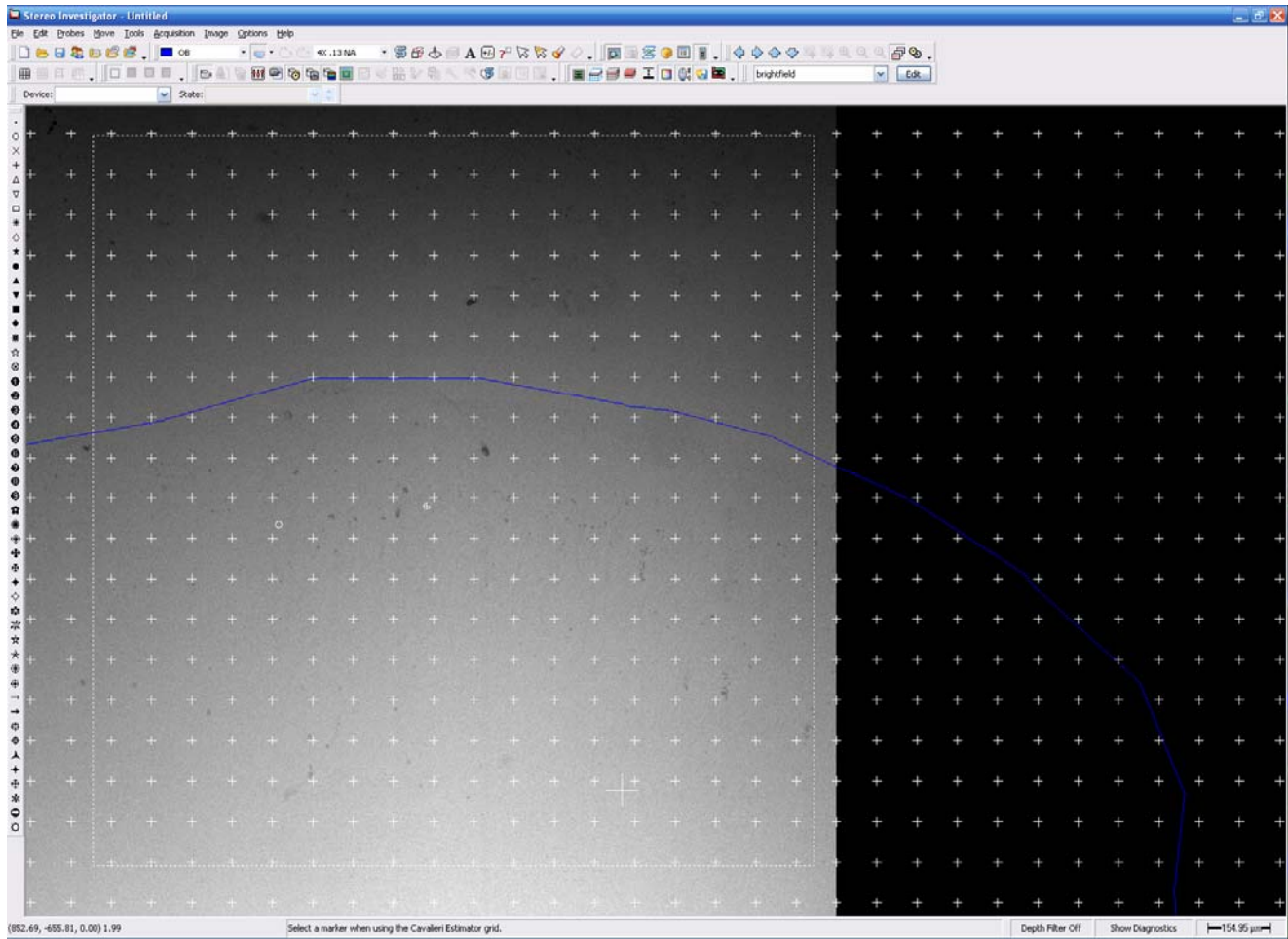


Esto bloqueará varios menús del programa y se desplegará automáticamente la siguiente ventana (Cavalieri Estimator):



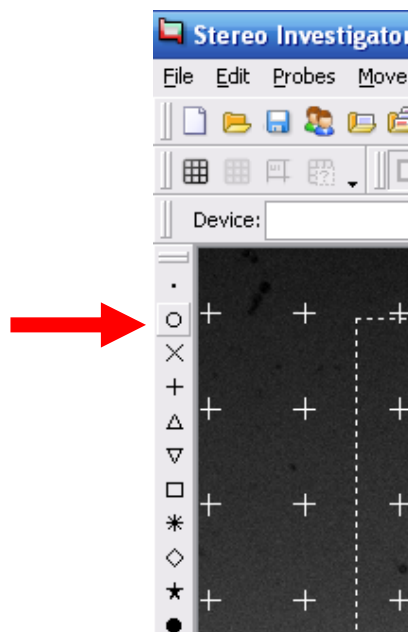
Se puede ajustar el tamaño de la gradilla asignando valores en “Grid spacing” (1); entre menor sea el valor ingresado, más estrecha será la gradilla y será más precisa la determinación del contorno; sin embargo, tomará más tiempo el “pintado” del contorno. También se puede girar la gradilla en “Grid rotation” asignándole un valor o dando click en el botón “Randomize Angle” (2). El valor de “Section Cut Thickness” (3) ya viene indicado por el valor introducido en el paso 10.

Una vez asignados los valores, dar click en “OK”. La pantalla mostrará ahora una gradilla de cruces blancas, con el espaciamiento seleccionado:

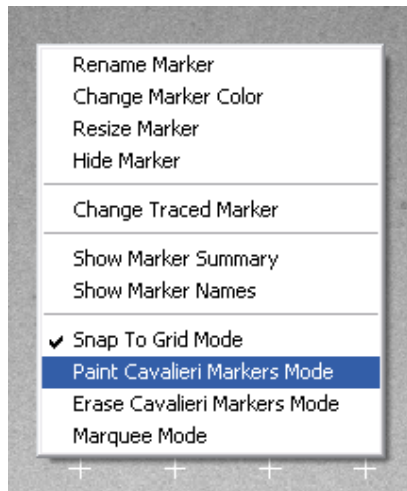


17. El siguiente paso es seleccionar un marcador para “pintar” el interior del contorno (s) de interés. Para ello seleccionamos un ícono de la barra de marcadores para cada contorno que se desee medir:

Para seleccionar, hacer click izquierdo sobre el marcador de interés. El ícono del marcador seleccionado será resaltado, y la barra de contornos se tornará inactiva.

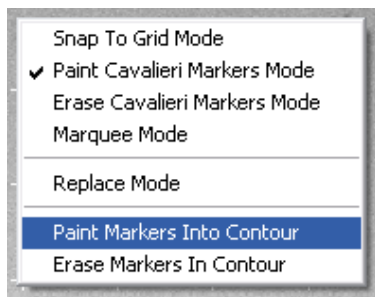


18. A continuación dar click derecho sobre el contorno de interés. Se mostrará el siguiente menú:



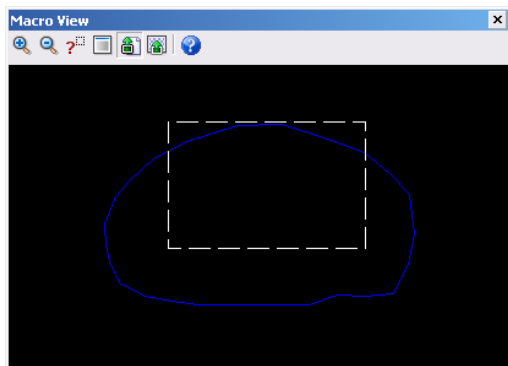
Seleccionar "Paint Cavalieri Markers Mode"

19. Enseguida, volver a dar click derecho sobre el contorno de interés. Ahora se mostrará el siguiente menú:

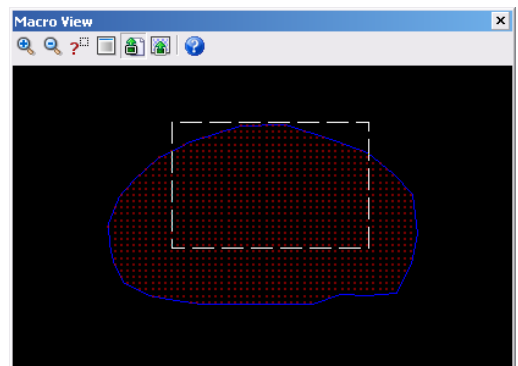


Seleccionar "Paint Markers Into Contour"

En la ventana de Macro View en el Monitor 2 se mostrará el interior del contorno de interés "pintado" con marcadores:



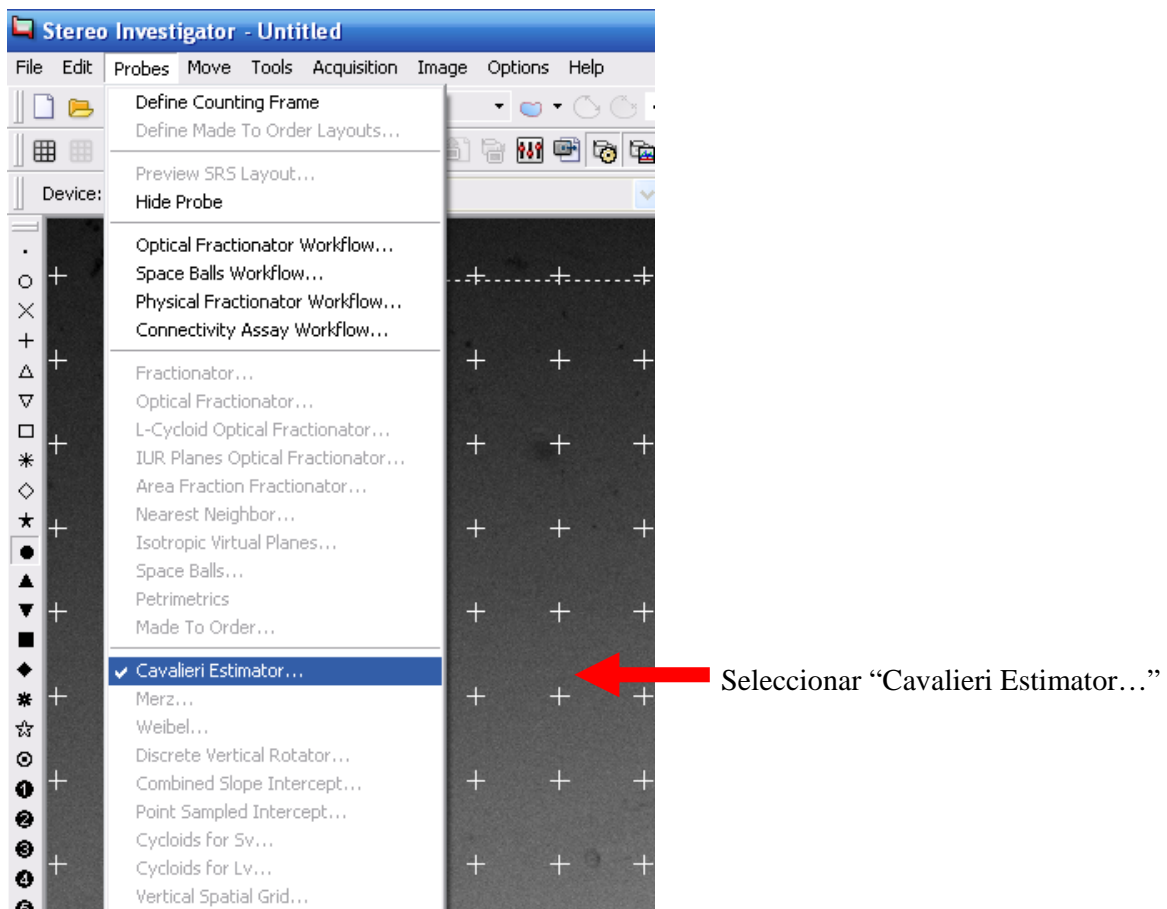
Antes de "Paint Markers Into Contour"



Después de "Paint Markers Into Contour"

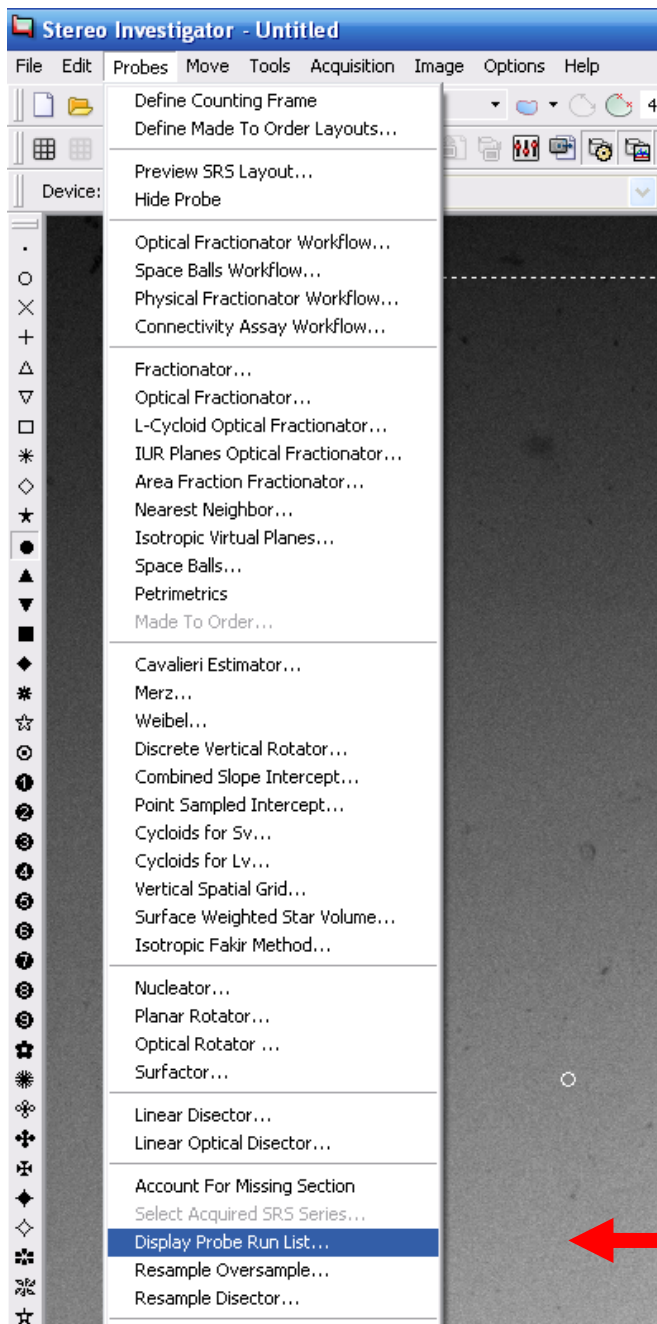
20. Una vez pintados todos los contornos de interés del primer corte, ir al siguiente. Para esto, en el “Serial Section Manager” seleccionar el corte subsecuente y repetir los pasos 17 al 19 para cada corte trazado.

21. Una vez pintados todos los contornos de interés de todos los cortes, ir al menú “Probes” y dar click en “Cavalieri Estimator...”:



Esto activará los menús que habían sido previamente bloqueados.

22. En el menú “Probes”, seleccionar “Display Probe Run List...”



Seleccionar “Display Probe Run List...”

Aparecerá la siguiente ventana (Previous Stereological Runs):

Probe Type	Contour/Marker Name	Section Name	Created	Run Name	Section Thickness	Grid Spacing
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 1	11/07/11 12:30:00	Probe Run 0005	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 6	11/07/11 12:30:00	Probe Run 0004	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 11	11/07/11 12:30:00	Probe Run 0003	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 16	11/07/11 12:30:00	Probe Run 0002	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 46	11/07/11 12:39:00	Probe Run 0007	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 41	11/07/11 12:39:00	Probe Run 0008	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 26	11/07/11 12:39:00	Probe Run 0011	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 31	11/07/11 12:39:00	Probe Run 0010	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 36	11/07/11 12:39:00	Probe Run 0009	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 21	11/07/11 12:39:00	Probe Run 0012	40.00	100.00

Open Probe View Results Delete Draw Sites Configure Close

23. Solo como control, verificar que estén todos los cortes de interés, que se les haya corrido la misma prueba (en este caso, Cavalieri Estimator), que hayan sido pintados con el mismo marcador (en este caso, Marker 11) y que tengan el mismo tamaño de malla (en este caso, 100 micras). Seleccionar todos los cortes de interés presionando la tecla Shift + click en el último corte de interés. Quedará así:

Probe Type	Contour/Marker Name	Section Name	Created	Run Name	Section Thickness	Grid Spacing
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 1	11/07/11 12:30:00	Probe Run 0005	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 6	11/07/11 12:30:00	Probe Run 0004	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 11	11/07/11 12:30:00	Probe Run 0003	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 16	11/07/11 12:30:00	Probe Run 0002	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 46	11/07/11 12:39:00	Probe Run 0007	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 41	11/07/11 12:39:00	Probe Run 0008	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 26	11/07/11 12:39:00	Probe Run 0011	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 31	11/07/11 12:39:00	Probe Run 0010	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 36	11/07/11 12:39:00	Probe Run 0009	40.00	100.00
Cavalieri Estimator	Marker 11	Section 21	11/07/11 12:39:00	Probe Run 0012	40.00	100.00

Open Probe View Results Delete Draw Sites Configure Close

24. Dar click en “View Results”. Se abrirá la siguiente ventana (Section Periodicity):

Section Periodicity

Section Periodicity

Systematic sampling involves using only every nth serial section. Enter the sampling interval (the value of n).

OK Cancel

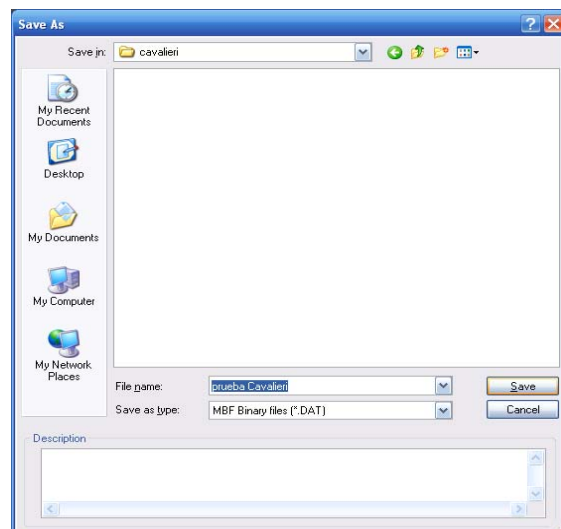
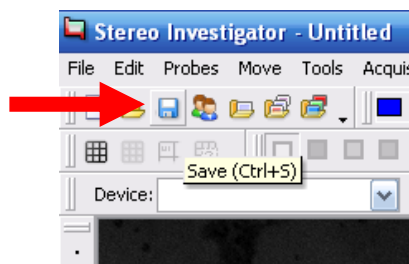
La periodicidad mostrada será el valor introducido en el paso 10. En este caso, la periodicidad fue de 5. Dar click en “OK”.

25. Finalmente se desplegará la siguiente ventana (Cavalieri Estimator Results):

Category	Result
Marker 11	10263
Estimated Area (μm^2)	102630000.
Estimated Volume (μm^3)	20526000000.
Volume Corrected for OverProjection (μm^3)	20071200000.
Variance Due To Noise	92.776
Variance of SURS, m=0	132030.30
Variance of SURS, m=1	6601.52
A	10626893.00
B	9746944.00
C	8691739.00
Variance of SURS, alpha(q)	106623.63
q	0.0827
alpha(q)	0.0673
Coefficient of Error (Gundersen), m=0	0.035
Coefficient of Error (Gundersen), m=1	0.008
Coefficient of Error (Gundersen), alpha(q)	0.032
D	7543556.00
Coefficient of Error (Roberts/Cruz-Drive)	2.618

Como se ilustra en este ejemplo, la prueba de Cavalieri nos da el valor estimado (en micras) de área y volumen totales de la región de interés, incluyendo los cortes no muestreados. Como la prueba de Cavalieri es un estimado estadístico, requiere de un valor de confianza. El coeficiente de error de Gundersen es en este caso nuestro indicador de la confianza del estimado. Si el coeficiente de error de Gundersen es menor a 0.10, nuestros datos serán estadísticamente válidos. Si se desea manejar los datos en un programa externo, se puede dar click en “Copy All Results To Clipboard” y pegarlos en el programa de interés.

26. Para guardar el trabajo realizado, dar click en el icono de “Save” y guardarlo en la carpeta correspondiente a su grupo de trabajo. La extensión de StereoInvestigator es *.dat.



27. Si se ha finalizado con el trabajo, se puede cerrar el programa. Si se desea comenzar con otra muestra, dar click en el icono “New”.



Al terminar de utilizar la estación de trabajo, apagar sus distintos componentes comenzado por la lámpara de fluorescencia (si fue utilizada), el módulo IX2-UCB, la caja de control de la platina motorizada, la cámara que fue utilizada, y la computadora. Finalmente, limpiar cuidadosamente la zona de trabajo.