

**GUÍA BÁSICA PARA EL
CONTEO ESTEROLÓGICO DE
COLOCALIZACIONES
CELULARES EN EL
MICROSCOPIO CONFOCAL DE
DISCO GIRATORIO OLYMPUS
BX51WI**

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

Esta guía describe la operación básica del microscopio Olympus BX51WI equipado con el módulo confocal de disco giratorio (Disk Scanning Unit; DSU) para observación y cuantificación celular en tejido o estructuras marcadas con hasta cuatro fluorocromos distintos, mediante métodos estereológicos.

Este manual pretende iniciar al usuario en los principios básicos del uso del DSU para fines de conteo estereológico, utilizando la prueba del “disector óptico”. Sin embargo, es altamente recomendable que el usuario interesado revise previamente literatura relacionada con la prueba estereológica de su interés. En la Unidad se encuentran disponibles artículos generales de estereología que pueden ser solicitados. De igual manera, si se requiere información más precisa que no se incluya en esta guía, se podrá contactar al Responsable de la Unidad para recibir asesoría individual.

Contacto:

Responsable:

Dr. Miguel Tapia Rodríguez

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

Tel. +(52) 55562 29185

mtapia@biomedicas.unam.mx

StereoInvestigator y MBF CX9000 son marcas registradas de MBF Bioscience. Olympus, BX5 WI y Disk-Scanning Unit son marcas registradas de Olympus Corporation.

C9100-02 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. Mozilla Firefox es software de licencia pública desarrollado por Mozilla Foundation.

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

Fecha de elaboración: Octubre de 2010

Historia de Revisiones:

Revisión 1: Enero 2021 - Agosto de 2021

Como citar:

Tapia-Rodríguez, M. “Guía Básica para el Conteo Estereológico de Colocalizaciones Celulares en el Microscopio Confocal de Disco Giratorio Olympus BX51WI”. Unidad de Microscopía, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 44p. 2021.

MICROSCOPIO

El microscopio DSU es una estación de trabajo basada en un estativo de microscopio vertical semi automatizado; cuenta con 2 carruseles de filtros para fluorescencia, uno trasero (interno) y uno delantero (este último numerado del 1 al 6, situado por debajo de los oculares) además de un carrusel de filtros de densidad neutra (ND) situado en la parte trasera de uso exclusivo para observación de muestras fluorescentes. Tiene la platina, el carrusel trasero de filtros para fluorescencia, el carrusel de filtros ND y el módulo DSU motorizados, pero el movimiento del revólver, del carrusel delantero de filtros para fluorescencia y del shutter frontal (situado inmediatamente abajo a la derecha del carrusel frontal de filtros para fluorescencia) es manual. El control de la platina se realiza mediante un joystick, y el control de los carruseles tanto de filtros traseros como de filtros ND se realiza mediante un controlador remoto localizado en la parte frontal derecha de la mesa anti vibratoria donde está situado el estativo. Para observación de muestras en campo claro utiliza una lámpara estándar de halógeno, cuya intensidad y encendido pueden ser regulados mediante un mando remoto manual (dimmer) localizado en la parte frontal izquierda de la mesa anti vibratoria y para la excitación de muestras fluorescentes utiliza una lámpara de mercurio HBO. Para visualización y adquisición de imágenes cuenta con dos dispositivos, una cámara digital a color de alta resolución espacial en la parte delantera y una cámara CCD de alta resolución temporal en la parte trasera. Es importante recalcar en este punto que el módulo DSU funciona únicamente con fluorescencia y utilizando el carrusel de filtros para fluorescencia y cámara traseros, por lo que la confocalidad en este microscopio solo es posible cuando se utiliza dicha combinación.

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 los carruseles de filtros traseros así como por el disco giratorio.

2) Filtro **U-MWU2** (espectros parecidos a **DAPI**)

Pase de banda de excitación: 330-385 nm

Espejo Dicroico: 400

Emisión: 420 nm

3) Filtro **U-MGFPHQ** (espectros parecidos a **GFP, FITC, AlexaFluor 488**)

Pase de banda de excitación: 460-480 nm

Espejo Dicroico: 485

Emisión: 495-540 nm

4) Filtro **U-MRFPHQ** (espectros parecidos a **Rodamina, AlexaFluor 555**)

Pase de banda de excitación: 535-555 nm

Espejo Dicroico: 565

Emisión: 570-625 nm

5) Filtro **U-N41008** (espectros parecidos a **Cy5, AlexaFluor 647**)

Pase de banda de excitación: 620-660 nm

Espejo Dicroico: 660

Emisión: 700-775 nm

Filtros Traseros:

1) Filtro **31000v2** (espectros parecidos a **DAPI/Hoechst/AMCA**)

Pase de banda de excitación: 350/50 nm

Espejo Dicroico: 400DCLP

Emisión: 460/50 nm

2) Filtro **41001** (espectros parecidos a **FITC/Bodipy/Fluo3/DiO**)

Pase de banda de excitación: 480/40 nm

Espejo Dicroico: Q505LP

Emisión: 535/50 nm

3) Filtro **41004** (espectros parecidos a **Texas Red**)

Pase de banda de excitación: 560/55 nm

Espejo Dicroico: Q595LP

Emisión: 645/75 nm

4) Filtro **41008** (espectros parecidos a **Cy5, AlexaFluor 647**)

Pase de banda de excitación: 620/60 nm

Espejo Dicroico: Q660LP

Emisión: 700/75 nm

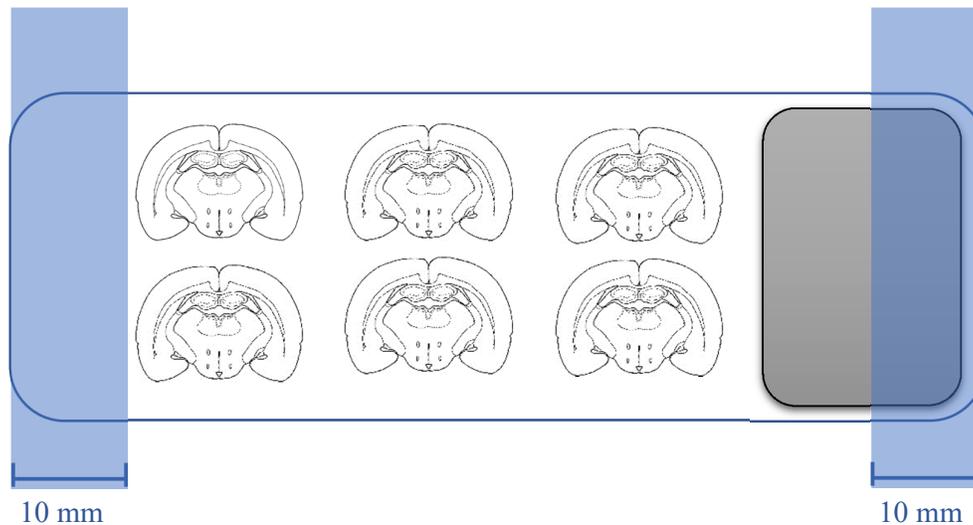
SOFTWARE

El software StereoInvestigator controla, -una vez encendidos los instrumentos-, la caja controladora de la platina motorizada (movimiento en X, Y y Z), las cámaras delantera y trasera (sólo una de ellas a la vez), el carrusel trasero de filtros para fluorescencia, el carrusel de filtros ND y el módulo DSU del microscopio. El software StereoInvestigator NO controla el revólver de objetivos, el shutter delantero para fluorescencia ni el carrusel delantero de filtros para fluorescencia, 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.

CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

El microscopio puede trabajar únicamente con muestras montadas en el sistema estándar de portaobjetos 75x25x1mm / cubreobjetos de 0.13-0.18 mm de grosor. Debido al diseño del portamuestras, se debe considerar que en las preparaciones histológicas a analizar deben quedar libres de muestra al menos 10mm desde los bordes externos hacia el centro, como se ilustra en la imagen a continuación:



OBJETIVOS DE INMERSIÓN LÍQUIDA

Los objetivos 40x y 60x son de inmersión en agua, y el objetivo de 100x es de inmersión en aceite. Cuando se requiera su uso, enfoque la región de interés de su preparación biológica con los objetivos de 10x o 20x mediante el digipod del joystick (ver más adelante) observando a través de los oculares del estativo; una vez enfocada cambie al objetivo de 4x y coloque una pequeña gota de agua desionizada o aceite (según corresponda) sobre la superficie del cubreobjetos situada en la región central del condensador; regrese al objetivo de inmersión seleccionado asegurándose de no ensuciar el resto de los objetivos con el medio de inmersión colocado sobre la muestra (por ejemplo para colocar el 100x gire directamente del 4x al 100x, para colocar el 60x gire 4x, 10x, 20x, 40x hasta llegar al 60x). Debido a que comparten inmersión en agua, es posible cambiar entre 40x y 60x sin problema; sin embargo, si se requiere cambiar a cualquier otro objetivo deberá removerse el agua tanto de los objetivos como de la preparación biológica con papel seda seco. Para el caso del objetivo de 100x, deberá removerse el aceite de inmersión tanto del objetivo como de la preparación mediante papel seda humedecido con 70% etanol.

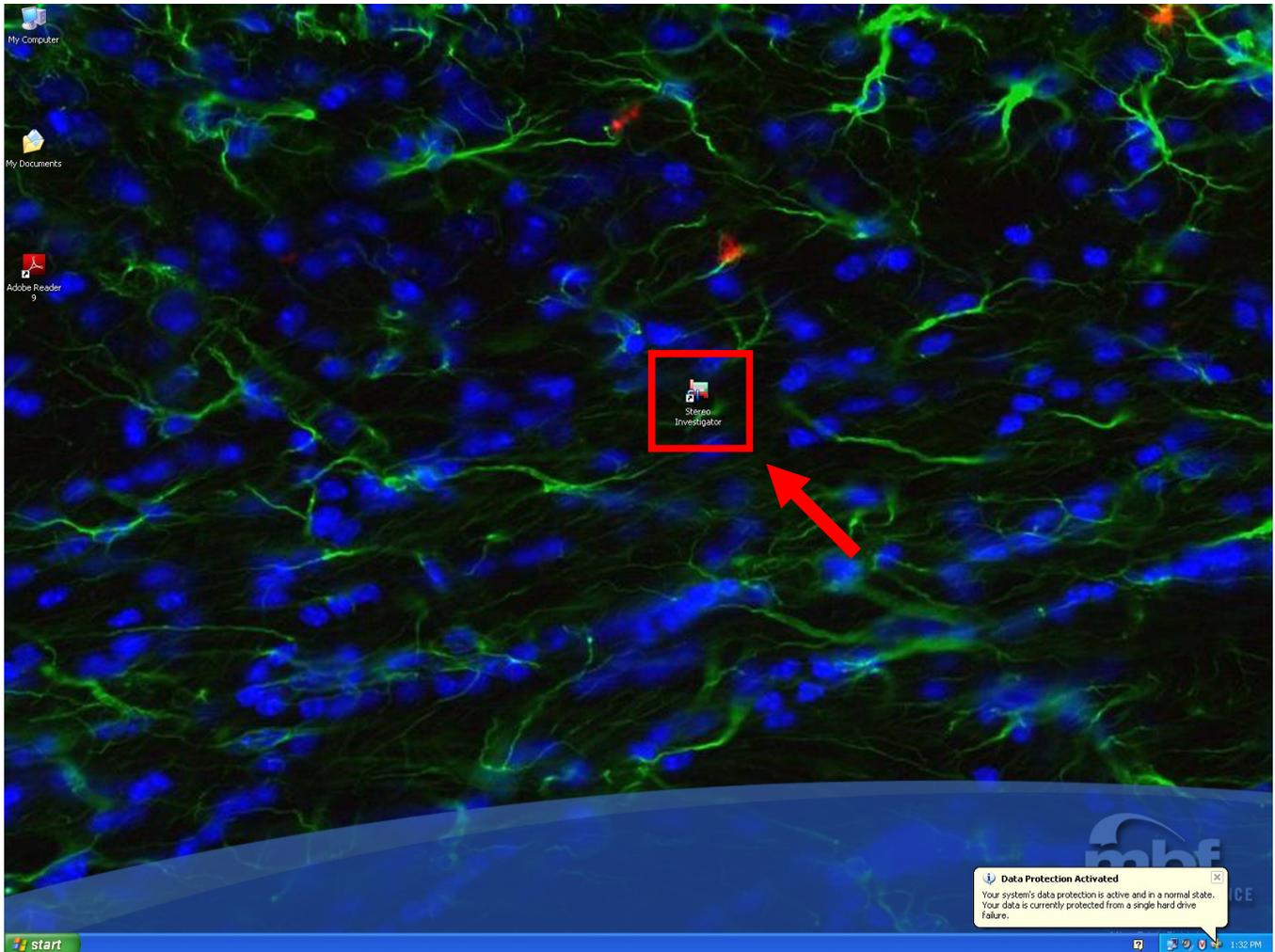
ENCENDIDO DEL EQUIPO

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, rotulada).
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 fuente de poder de la lámpara de fluorescencia (caja vertical blanca ubicada encima del módulo IX2-UCB). Esperar a que se encienda una luz verde situada en la porción superior izquierda de la cara frontal de la fuente.
6. Revisar que el carrusel de filtros de fluorescencia delanteros del microscopio esté situado en la posición 1 hacia al frente, que los objetivos de 4X o 10X estén alineados al condensador (quedando “al frente”) y que el shutter de fluorescencia esté desbloqueado. De igual manera, observar que en la posición 1 del carrusel de filtros delantero se observe una luz blanca en su mayor intensidad; para esto utilizar los botones MU+, MU-, FW+ o FW- del controlador del carrusel de filtros ND (situado en el lado derecho de la mesa antivibratoria del microscopio) hasta obtener tanto el color de luz como la intensidad mayor. Para evitar que se blanquee la muestra por la intensidad de esta luz, colocar manualmente el shutter en posición de bloqueo una vez que se tenga la luz requerida.

En los monitores aparecerá la siguiente ventana:



Como “User name” teclear “**U. Microscopia**” sin acento. Como “Password” teclear “**dsu.123**”. Esto permitirá el ingreso al sistema operativo, así como la conexión automática a la unidad de red compartida del Instituto.

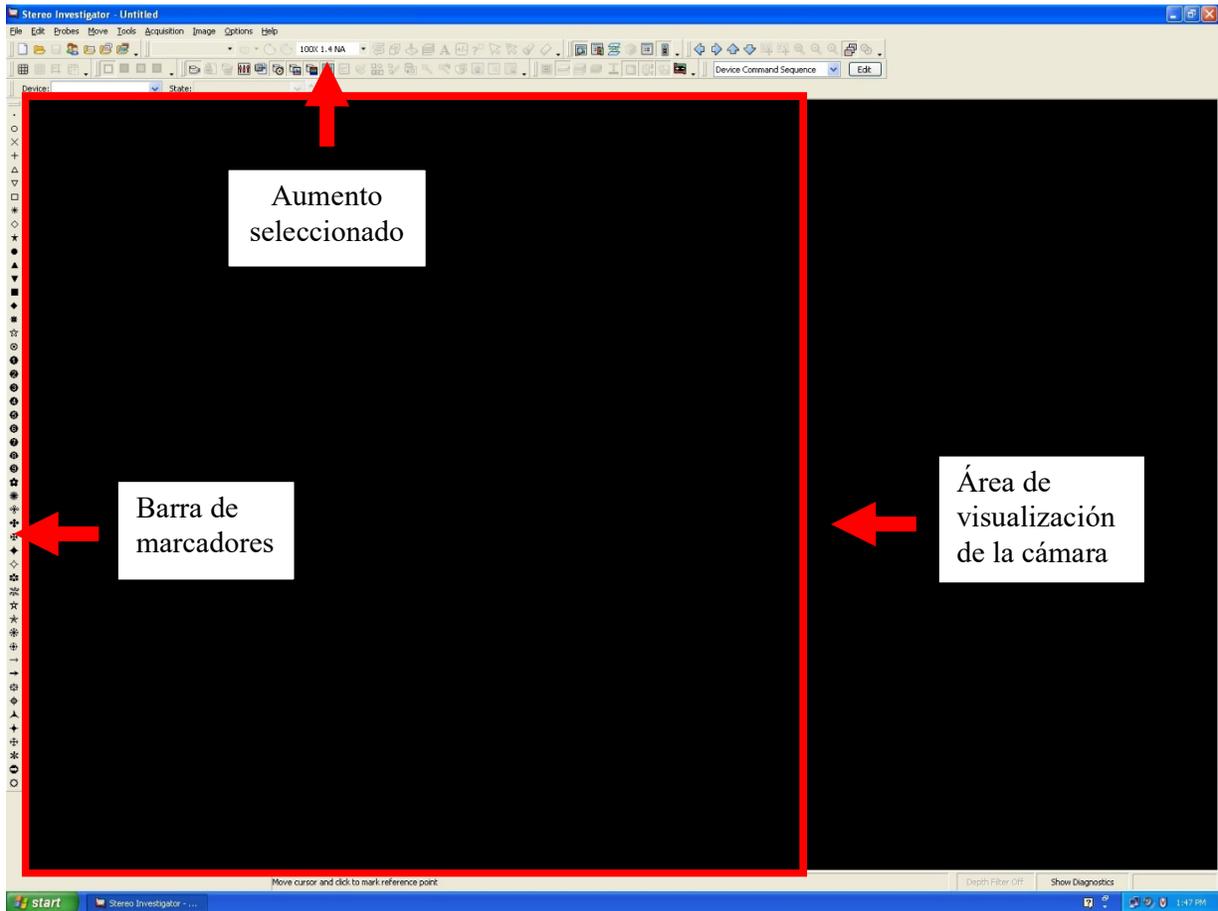


Monitor 1

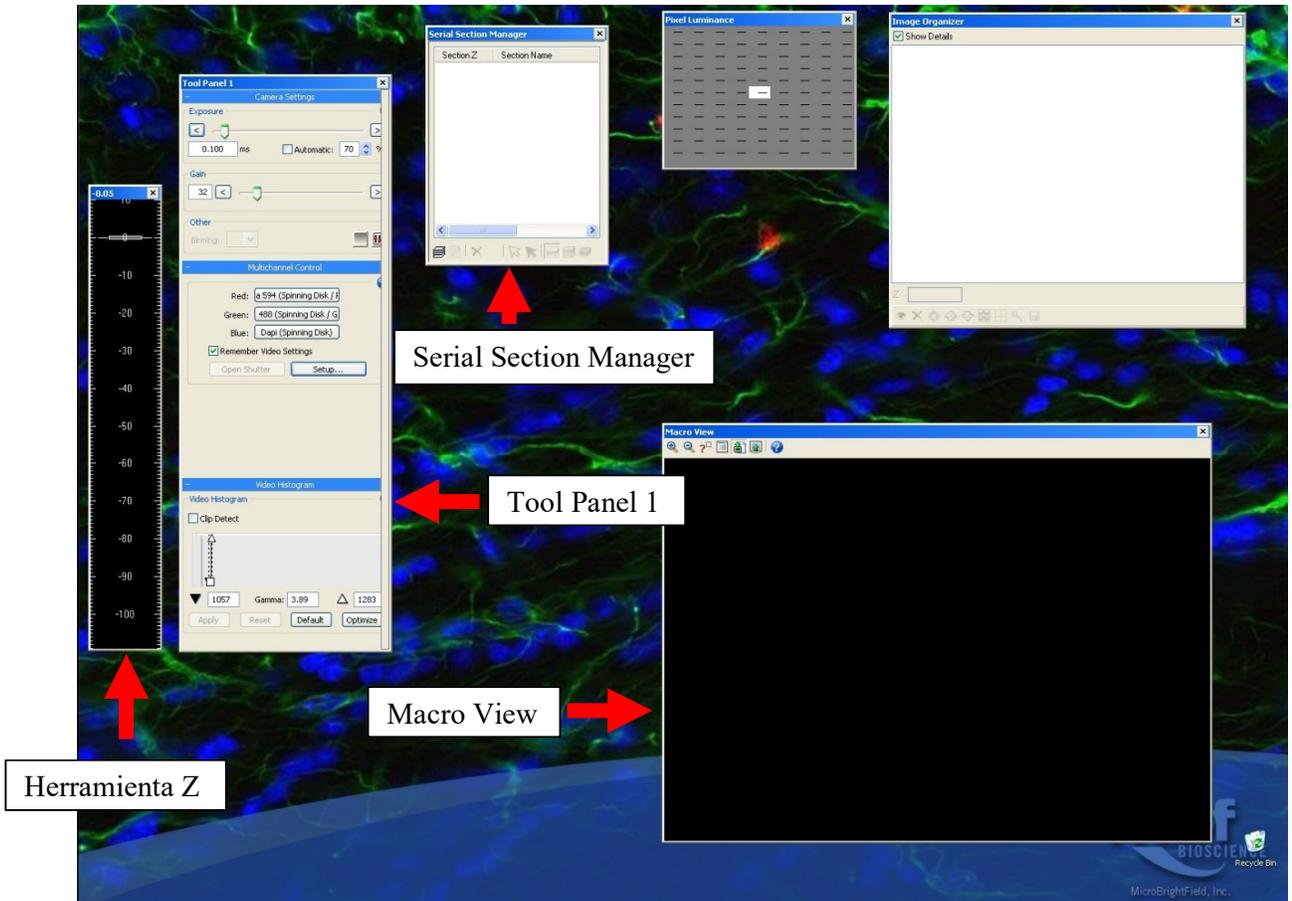
7. Haga doble click en el ícono “**Stereo Investigator**” para iniciar el software que opera el DSU. Aparecerá la siguiente ventana:



8. Seleccione como Group “**Unidad de Microscopia**” y como Profile “**Confocal Back Camera**” o el perfil que haya creado el Responsable de la Unidad, y luego haga click en “**OK**”. Esta acción abrirá la ventana principal del programa así como sus distintos módulos, los cuales aparecerán en los dos monitores como se muestra a continuación.



Monitor 1



Monitor 2

Tool Panel 1 (en Monitor 2)



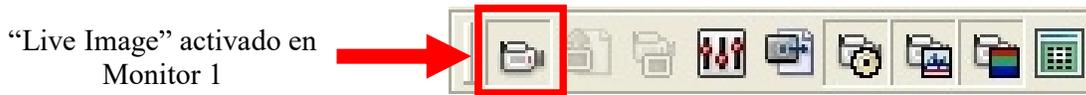
Image Acquisition: Contiene el comando “**Live Image**” que permite mostrar/ocultar en el área de visualización del **Monitor 1** las señales detectadas por la cámara. También este módulo es útil si se requiere capturar imagen de alguna región de interés; con la opción de realizar una captura a través del eje Z, con los fluorocromos activos listados en el módulo “**Multichannel Control**”.

Camera Settings: En este módulo se pueden ajustar de manera manual los parámetros de exposición y de sensibilidad de la cámara. Para la mayoría de las tinciones fluorescentes, se recomienda que el tiempo de exposición se base en un histograma de video con un rango entre 450 y 2000 en el módulo “**Video Histogram**”. De igual manera, que se procure que los valores de sensibilidad y umbral permanezcan en **0**. No se recomienda que se deje que la cámara detecte de manera automática el nivel de exposición.

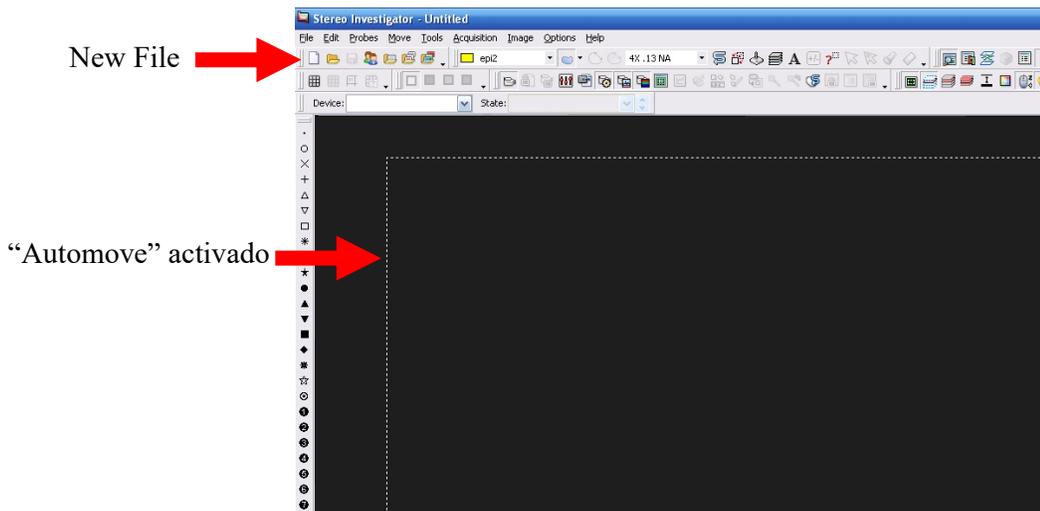
Multichannel Control: En este módulo se puede seleccionar cualquier fluoróforo de la lista haciendo click sobre el botón correspondiente y los carruseles de filtros traseros se moverán automáticamente a la configuración para dicho fluoróforo. “**Close shutter**” impedirá el paso de la fluorescencia al espécimen. Si la opción “**Remember Video Settings**” se encuentra activada, los valores de exposición, sensibilidad y umbral del módulo “**Camera Settings**” para cada fluoróforo en cada magnificación y con/sin disco giratorio serán recordados de manera independiente.

Video Histogram: Muestra y modula la intensidad de señal detectada por la cámara. Para la mayoría de los casos, “**Optimize**” ajusta de manera automática el histograma de video a niveles aceptables; si requiere un mayor contraste al visualizar la imagen en el monitor puede activar la opción de “**Clip Detect**” (pone la señal en escala de grises y el fondo en azul). Si la imagen se observa con mucho ruido de fondo y el histograma presenta valores de blanco menores a 2000, se recomienda aumentar la exposición de la cámara en el módulo “**Camera Settings**”.

9. Dar click en el icono “**Live Image**” situado en las barras de herramientas del **Monitor 1**, o en el botón “**Live Image**” del módulo “**Image Acquisition**” del “**Tool Panel 1**” en el **Monitor 2**. El área de visualización de la cámara en **Monitor 1** tornará de negro absoluto a gris.



Es importante hacer notar que mientras no se dé un click dentro del área de visualización de la cámara digital en el **Monitor 1**, se tendrá libre movimiento de la platina con el joystick; si se diera click entonces se activaría automáticamente la región de “**Automove**”, quedando el sistema de movimiento en modo de grabación en los ejes X, Y y Z y se bloquearía el movimiento libre con el joystick. Si esto ocurre, generar un archivo nuevo para resetear la configuración (**File | New** o dar click en el primer ícono de las barras de herramientas en el **Monitor 1**).



10. Cerciorarse de tener un aumento adecuado tanto en el estativo como en el software para visualizar la tinción (4X o 10X) en los cortes histológicos. **Los aumentos deben ser siempre concordantes entre el estativo y el software para evitar errores de magnificación en este último.**

11. Para observar la tinción a través de la cámara digital, colocar manualmente el shutter del estativo en posición de desbloqueo. Posteriormente, seleccionar la tinción requerida del listado del bloque “**Multichannel Control**” del “**Tool Panel 1**” en el **Monitor 2** dando click en el botón correspondiente.



Multichannel Control (en Tool Panel 1)

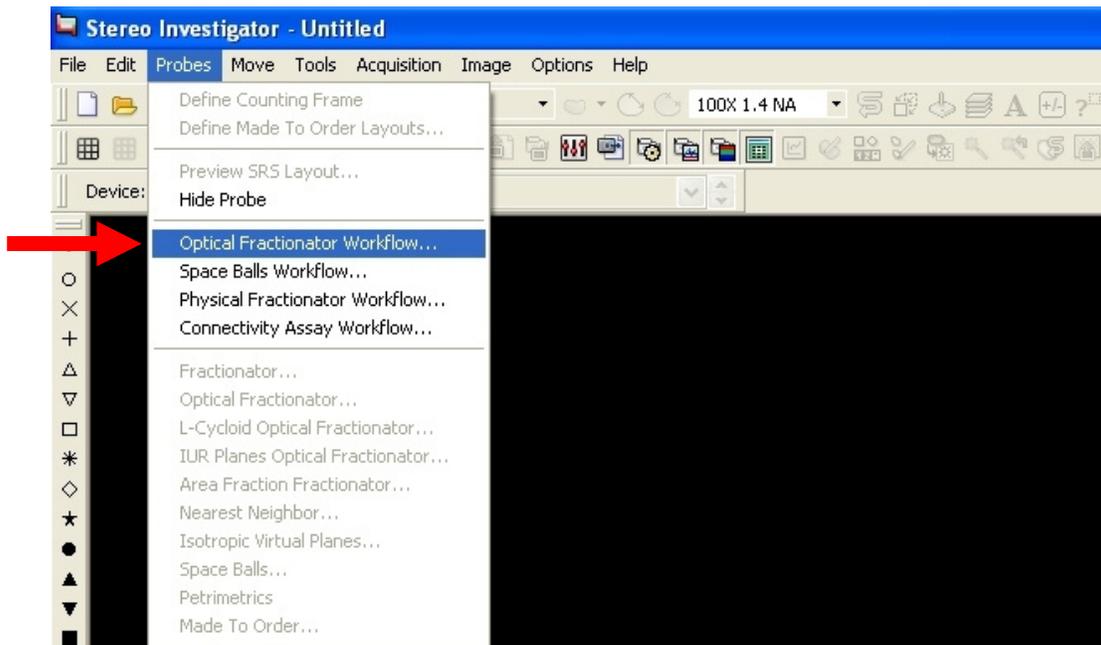
Los carruseles de filtros traseros se moverán de acuerdo a la configuración de fluorocromo solicitada y la tinción aparecerá desplegada en el **Monitor 1**.

Si en su sesión no se encuentra enlistado en el módulo **Multichannel Control** el fluoróforo que requiere observar, o bien requiere activar/desactivar el disco giratorio, puede realizar el cambio dando click en el botón **“Setup...”** de dicho módulo. Aparecerá la ventana **“Acquire Setup”**. Seleccione la primer pestaña **“Multichannel Acquires”**:



En las dos pestañas de “**Multichannel Acquires**” se mostrarán los canales (channels) que pueden ser configurados para visualización y captura; los canales que podrán ser usados serán aquellos que estén marcados con una palomita en su respectivo comando “**Acquire channel**”; los canales que no estén seleccionados en “**Acquire Setup**” no estarán disponibles en el módulo “**Multichannel Control**”; en este sentido se recomienda que no active canales que no va a utilizar. Para cambiar de fluoróforo, o para activar o desactivar el disco giratorio, seleccione el fluorocromo que requiera de la lista, cada uno en un canal separado. Si lo requiere, puede cambiar el nombre del botón de cada canal dando click en el rectángulo situado al lado del comando “**Acquire channel**” así como el gradiente LUT que desplegará la imagen en captura, este último dando click en el cuadro de color situado junto al rectángulo. Una vez que haya finalizado la configuración para los fluoróforos presentes en su muestra, dé click en “**OK**”. La ventana “**Acquire Setup**” se cerrará.

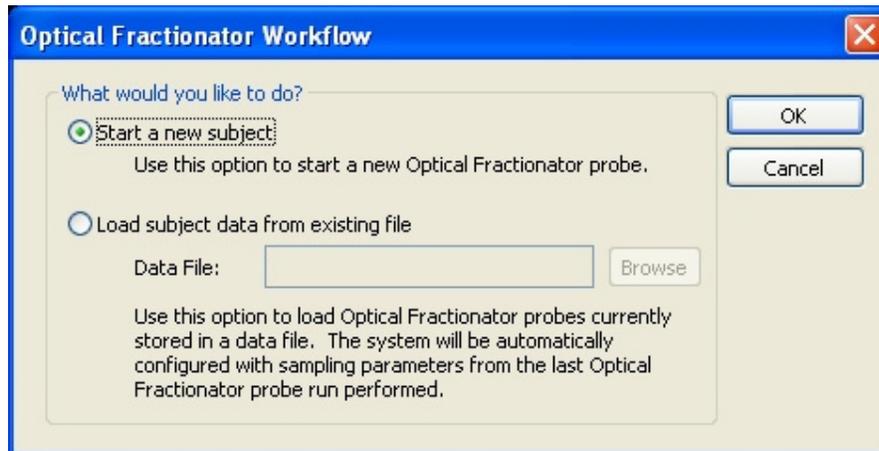
12. Realizar el enfoque fino del campo de visión moviendo cuidadosamente la perilla negra (digipod) situada en la parte lateral derecha del joystick. Una vez enfocado, se puede utilizar la palanca del joystick para moverse entre los cortes montados en el portaobjetos para localizar uno de los bordes del área de interés del primer corte del muestreo (Nota: Puede activarse el modo de desplazamiento rápido en XY dejando presionado el botón situado en la punta de la palanca del joystick). Una vez localizado el corte inicial, puede colocar manualmente el shutter en posición de bloqueo mientras se realiza la configuración inicial del software para el conteo.



13. En el menu “**Probes**” seleccionar “**Optical Fractionator Workflow**” para el caso de que se necesite contar células; “**Space Balls Workflow**” para el caso de que se necesite contar longitud de procesos citoplasmáticos; “**Physical Fractionator Workflow**” para el caso de que se necesite contar estructuras en cortes adyacentes menores a 20 micras de

grosor, o “**Connectivity Assay Workflow**” para el caso de que se necesite contar estructuras alveolares. En la presente guía se utilizará el “**Optical Fractionator Workflow**”.

Enseguida aparecerá esta ventana:



14. Si se trata de un nuevo estudio, seleccionar “**Start a new subject**”; si hay sesiones previas con datos almacenados en el programa, seleccionar “**Load subject data from existing file**”. En la presente guía se utilizará como ejemplo la primera opción.

Enseguida aparecerá la ventana “**Optical Fractionator Workflow**” del lado izquierdo del **Monitor 1**; indicando el paso 1 del flujo de trabajo. El workflow ha sido diseñado en tres secciones principales, la primera consta de los pasos 1 al 4 y es en donde se especificarán los datos de la muestra así como las regiones que serán evaluadas; los pasos 5 al 9 establecen los parámetros del conteo estereológico, y los pasos 10 y 11 son mediante los cuales se realiza el conteo y se analizan los resultados del mismo (ver más adelante):

Optical Fractionator Workflow

- Indicate the Areas Used for Counting
 1. Set up the Subject
 2. Set Microscope to Low Magnification
 3. Trace your Region(s) of Interest
 4. Set Microscope to High Magnification
- Define Probe Configuration
 5. Measure Mounted Thickness
 6. Define the Counting Frame Size
 7. Define SRS Grid Layout
 8. Define Disector Options
 9. Save Sampling Parameters
- Perform Counting
 10. Count Objects
 11. View the Sampling Results

Prev Step Next Step

Subject Information

Your name:

Subject:

Notes:

Use Saved Sampling Parameters

Use an existing sampling configuration? Yes No

Enter Serial Section Information

Note: If you are unsure about the number of sections to count, leave it at the default value of 1. Additional sections can be added at Step 11.

of Sections to Count:

Section's Cut Thickness: μm

Section Evaluation Interval:

Starting Section Number:

Z-Value of First Section: μm

Pasos del Flujo de Trabajo

8

Una vez llenados todos los campos, hacer click en "Next Step"

1

Llenar estos campos apropiadamente

2

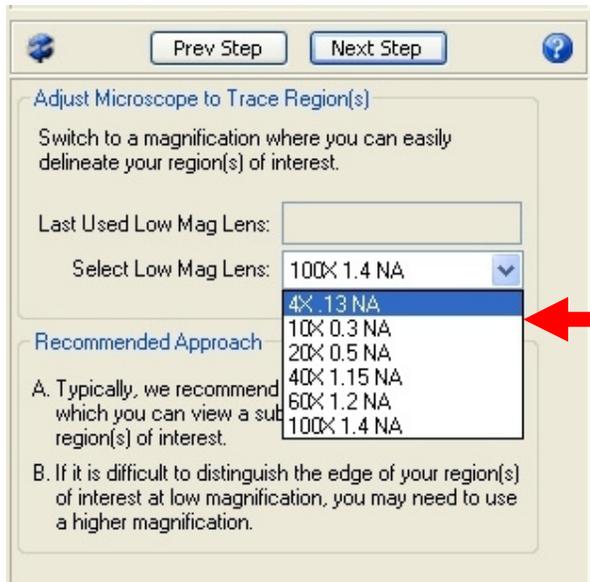
Escoger "No" si es un estudio completamente nuevo y no se han almacenado configuraciones con anterioridad, escoger "Yes" si ya se han establecido los parámetros de muestro con anterioridad y se desea aplicar dichos ajustes al muestreo actual

3
4
5
6
7

Número de cortes a contar.
Grosor del corte al cual se procesó el tejido.
Intervalo al cual será definido el conteo (periodicidad).
Escoger "Randomize" de preferencia.
Este valor se establece automáticamente con el número de corte en el que se iniciará el conteo

15. El siguiente paso es escoger una magnificación óptica que nos permita trazar el contorno de la región de interés. Esto ya se realizó previamente en el paso 10 de la presente guía; comúnmente se recomienda usar 10X pero si la fluorescencia es lo suficientemente intensa se podrá realizar el trazo a 4X, lo cual significa un trazado de los contornos más rápido, aunque ligeramente menos preciso. En este punto cerciorarse que el comando “**Live Image**” esté activado y que el aumento tanto en el estativo como en el software sean los mismos.

“Live Image” activado →



← 2 Dar click en “Next Step”

1 Seleccionar el aumento más apropiado para el trazado de los contornos de interés

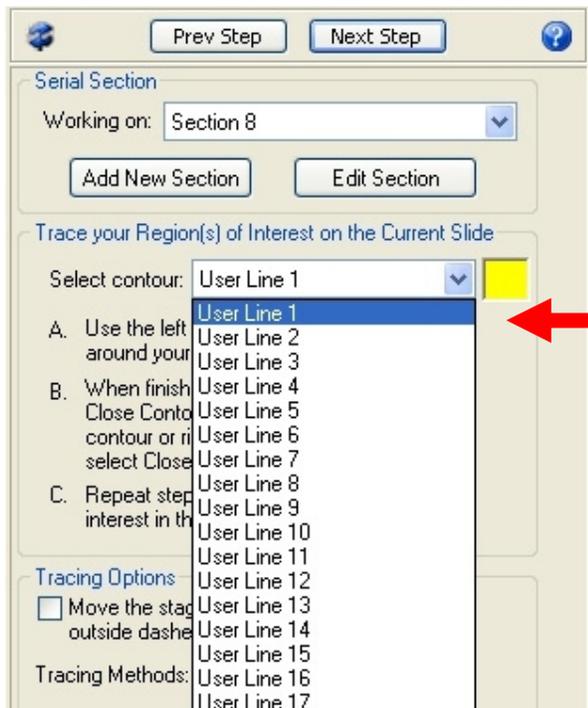
16. En el módulo “**Multichannel Control**” del “**Tool Panel 1**” escoger algún canal cuya marca fluorescente delimite la estructura completa de interés dando click en el botón correspondiente, por ejemplo “**Dapi**” o alguna otra tinción fluorescente presente en la muestra de gran brillantez y que delimite claramente los límites anatómicos de la(s) región(es) a analizar; si hay que hacer ajuste de imagen, utilizar las herramientas del “**Tool Panel 1**” en el **Monitor 2**.



← Seleccionar **Dapi** o una tinción equivalente (sin Spinning disk)

Si aún no se ha hecho, o se está comenzando el trazado de un nuevo corte histológico, en este paso del workflow se puede mover la platina hacia la región de interés mediante el joystick. Una vez situado ahí, colocar manualmente el shutter del estativo en posición de desbloqueo.

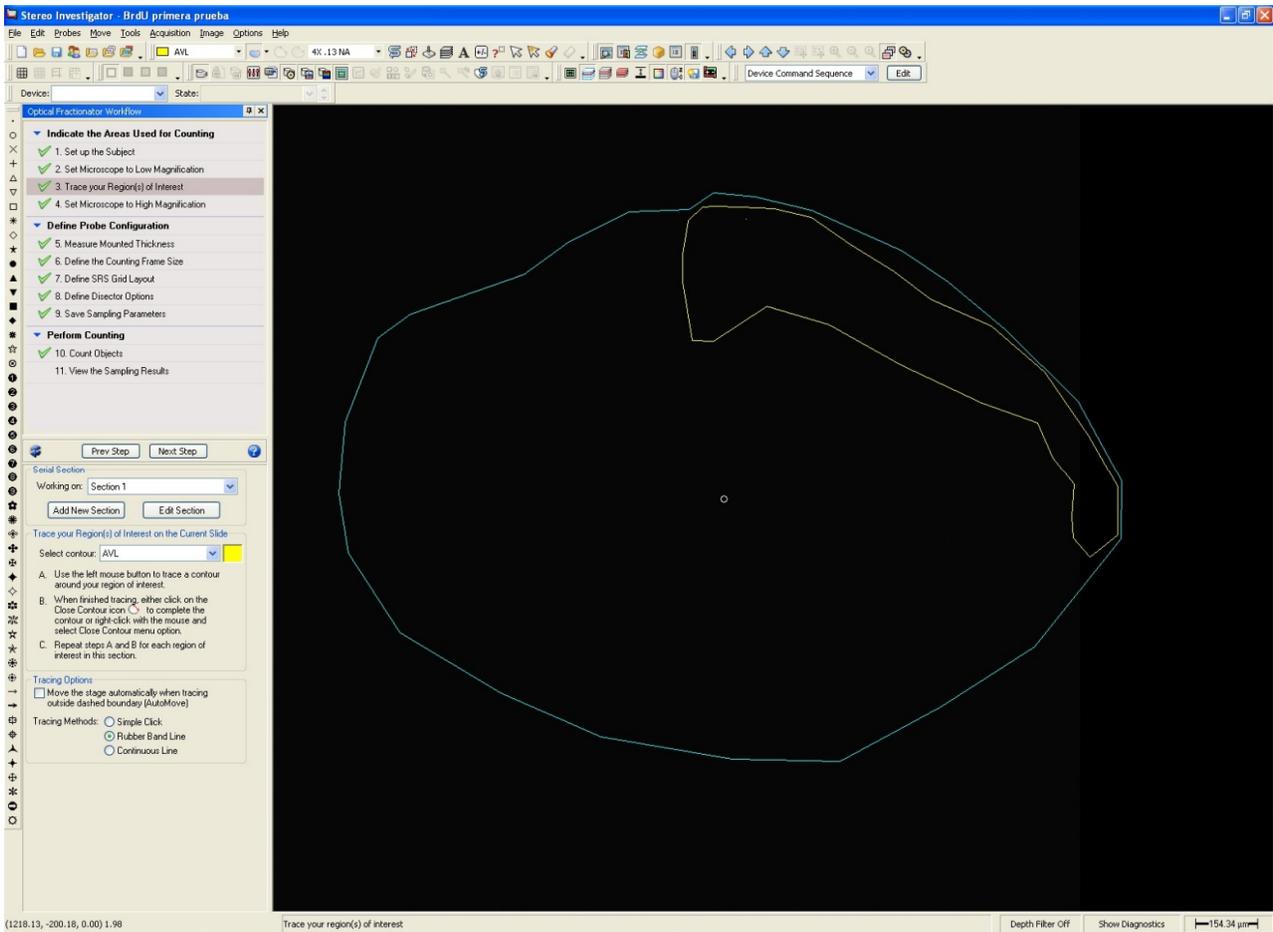
17. El siguiente paso es seleccionar los contornos a utilizar y realizar el trazado del (los) contorno (s) de la (s) región (es) de interés. Diversos contornos pueden ser trazados con líneas de diferente color para delimitar regiones distintas. De manera opcional, en las barras de herramientas del programa se pueden escoger diferentes líneas durante el trazado de los contornos.



2 Una vez finalizado el trazado, dar click en “Next Step”

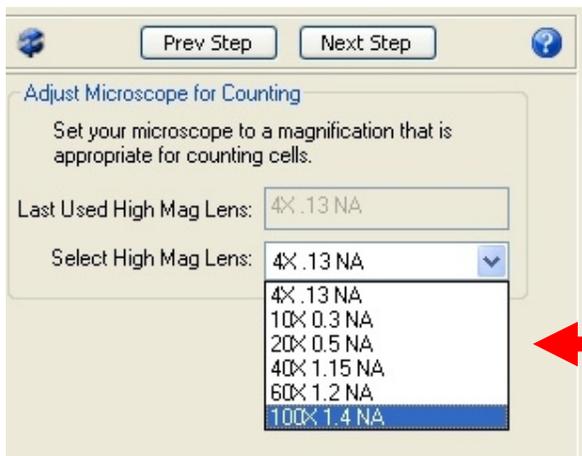
1

Seleccionar una línea para comenzar a trazar. Para iniciar, dar click en uno de los bordes de la región de interés; notará que aparece un pequeño círculo que parpadea en el lugar en el que se dio click. A continuación, dar click en un punto más alejado pero perteneciente también al borde de la región de interés. Notará que se traza una línea entre el primer y el segundo click. Continuar dando click sobre regiones espaciadas del borde de la región de interés. Notará que una vez que un click atraviese la línea punteada del “Automove” en el **Monitor 1**, la platina motorizada se moverá hacia la dirección correspondiente. Continuar trazando el contorno. Una vez terminado el trazo de la región de interés, 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 de un mismo corte histológico.



Ejemplo de 2 contornos trazados en un corte histológico de bulbo olfatorio, en turquesa el contorno exterior del mismo y en amarillo una región de interés.

18. El siguiente paso es seleccionar una magnificación conveniente para detectar las células a contar. Normalmente los aumentos de 60X y 100X nos dan la resolución necesaria para detectar los límites precisos de las células a contar. En el microscopio, cambiar manualmente los objetivos a 60X (inmersión en agua) o a 100X (inmersión en aceite), según se seleccionó en el software. Si será conteo de colocalizaciones, éste deberá realizarse a 100X. Con el digipod, realizar el enfoque lentamente para evitar lastimar el objetivo. En el **Monitor 1** deberá mostrarse la región a alto aumento enfocada.



← **2** Una vez seleccionado, dar click en "Next Step"

← **1** Seleccionar un aumento conveniente para el conteo celular, normalmente 60X o 100X

19. El siguiente paso es determinar la manera como se medirá el grosor del corte histológico durante el conteo estereológico; esta cuestión es importante para la determinación del volumen de la estructura y de la estimación del número celular ya que para evitar errores en las estimaciones, se requiere que a lo largo del eje Z haya la posibilidad de contar al menos 3 células completas; de esta manera, es muy importante tener en cuenta que cortes más delgados que $20\mu\text{m}$ de grosor final NO son recomendados para contar mediante estereología. De manera práctica y antes de iniciar un conteo, se recomienda medir previamente los grosores finales; si se cuenta con un estimado previo de grosor de los cortes histológicos, este puede ser tomado en cuenta para las estimaciones del número celular activando la opción **“Manually enter the average mounted thickness”** e ingresando el valor en el campo **“Average Mounted Thickness”** de la sección **“Manual Adjustment (Optional)”** Si el grosor de la región no se ha medido, se recomienda que en este paso se realice una medición de distintas zonas de la región de interés activando la opción **“Measure mounted thickness before counting”**.

Prev Step Next Step ?

Refocus to top of section at each grid site

Choose Your Method(s) For Measuring

Measure the mounted thickness while counting

Manually enter the average mounted thickness

Measure mounted thickness before counting

Measure Mounted Thickness While Counting

Measure mounted thickness at sampling sites

Evaluation Interval: measure every site(s).

Manual Adjustment (Optional)

If you are absolutely confident that you know what the average mounted thickness of your tissue is, you may enter it, rather than taking individual measurements.

Average Mounted Thickness: μm

Measure Mounted Thickness Before Counting (Optional)

If you wish to get an accurate measurement of the thickness of your section before counting, use the joystick to move to various areas and focus to the top and bottom Z positions.

Start Taking Measurements

1

Seleccionar **“Refocus to the top of section at each grid site”**, **“Measure the mounted thickness while counting”** y **“Measure mounted thickness at sampling sites”** every 1 site.

Si se cuenta con el valor promedio de grosor del corte histológico a evaluar, seleccionar **“Manually enter the average mounted thickness”** y en **“Average Mounted Thickness”** ingresarlo.

Si no se cuenta con mediciones previas de grosor, seleccionar **“Measure mounted thickness before counting”** y dar click en **“Start Taking Measurements”**

Refocus to top of section at each grid site
 Choose Your Method(s) For Measuring
 Measure the mounted thickness while counting
 Manually enter the average mounted thickness
 Measure mounted thickness before counting
 Measure Mounted Thickness While Counting
 Measure mounted thickness at sampling sites
 Evaluation Interval: measure every site(s).
 Manual Adjustment (Optional)
 If you are absolutely confident that you know what the average mounted thickness of your tissue is, you may enter it, rather than taking individual measurements.
 Average Mounted Thickness: μm

2 Una vez seleccionadas, dar click en “Next Step”

1 Seleccionar “**Measure the mounted thickness while counting**” y “**Measure mounted thickness at sampling sites**” every 1 site.

20. El siguiente paso es determinar el tamaño del **cuadro de conteo**. El tamaño del mismo dependerá de la densidad celular de la muestra (mayor número de células a contar = menor tamaño de cuadro de conteo). El tamaño máximo del cuadro de conteo estará delimitado por la resolución de la cámara.

Counting Frame Display
 Force the counting frame to be square
 Snap to increments of micron(s)
 Counting Frame Size
 X: μm Y: μm

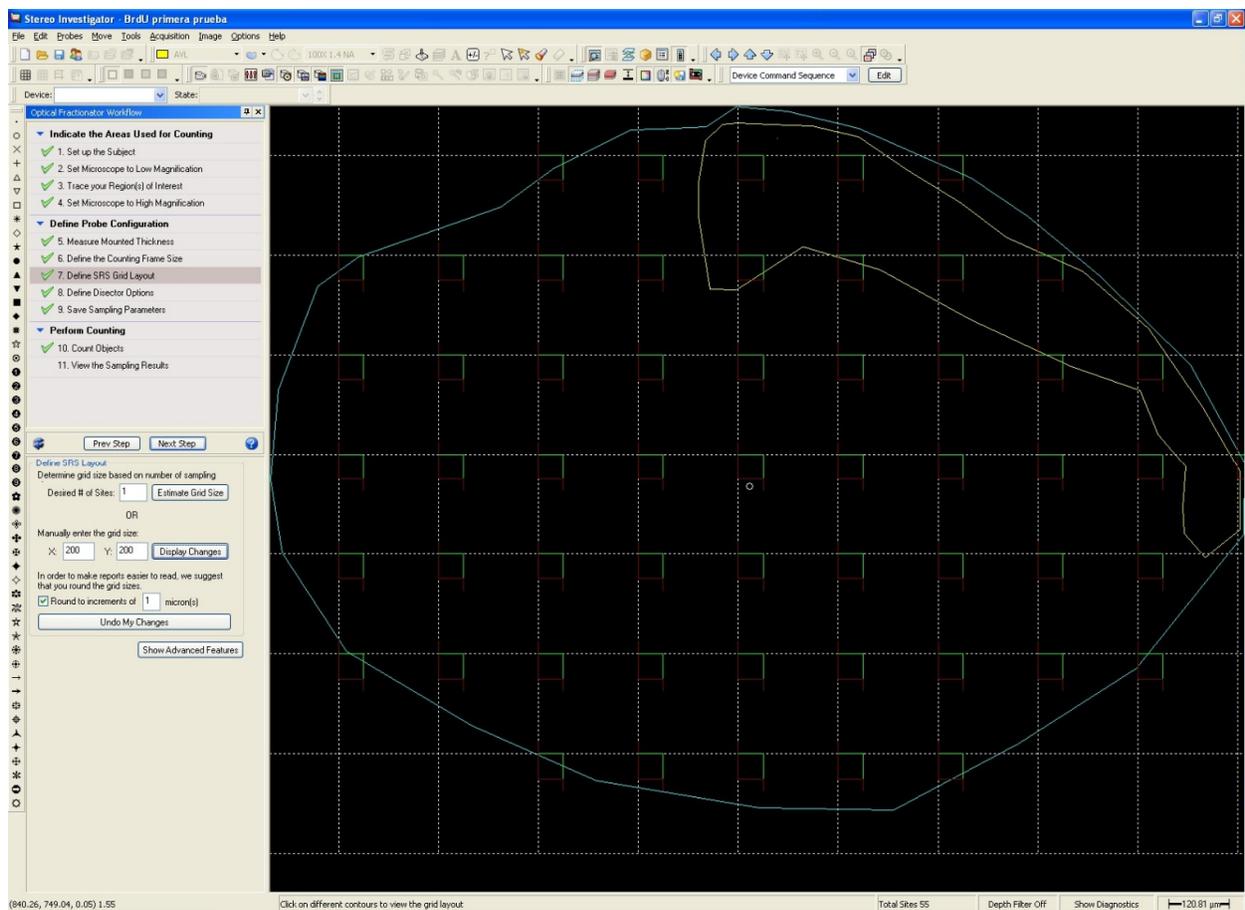
 OR
 Graphically adjust the counting frame by dragging the corners or edges to the desired size.
 Change the position of the counting frame by placing the cursor in the center and dragging the mouse.

2 Una vez seleccionadas las opciones, dar click en “Next Step”

1 De manera práctica, un cuadro de conteo de **50x50 μm** es eficiente para una primera aproximación. Si se encuentran o se desean otros valores, dar click en “**Display Changes**” para observar los cambios en pantalla.



21. El siguiente paso es determinar el tamaño de la “**mall**a de conteo”. Como en el paso anterior, el tamaño de la mall



22. El siguiente paso es definir la **altura del disector óptico**, la cual dependerá del grosor final que presenten los cortes histológicos, y éste a su vez debe estar determinado por mediciones previas. Normalmente, se recomienda que la altura del disector óptico sea de al menos 25μm, con las zonas de guarda de 5 μm arriba y abajo del mismo, por lo que durante la preparación experimental se debe de considerar obtener una tinción homogénea a lo largo de un grosor final de los cortes histológicos de al menos 35μm.

4 Una vez completados todos los campos requeridos, dar click en “Next Step”

1 Seleccionar “Center the disector between the guard zones.”

2 Ingresar la altura del disector óptico.

3 Seleccionar “Manual Focus”

23. El siguiente paso es crear un archivo dentro del software con los parámetros seleccionados para realizar el conteo. Es importante hacer notar que todos los cortes que sean cuantificados de una estructura dada deben serlo con los mismos parámetros y que el archivo creado puede ser invocado en sesiones subsecuentes.

3 Una vez completados, hacer click en “Next Step”

1 Llenar estos campos apropiadamente

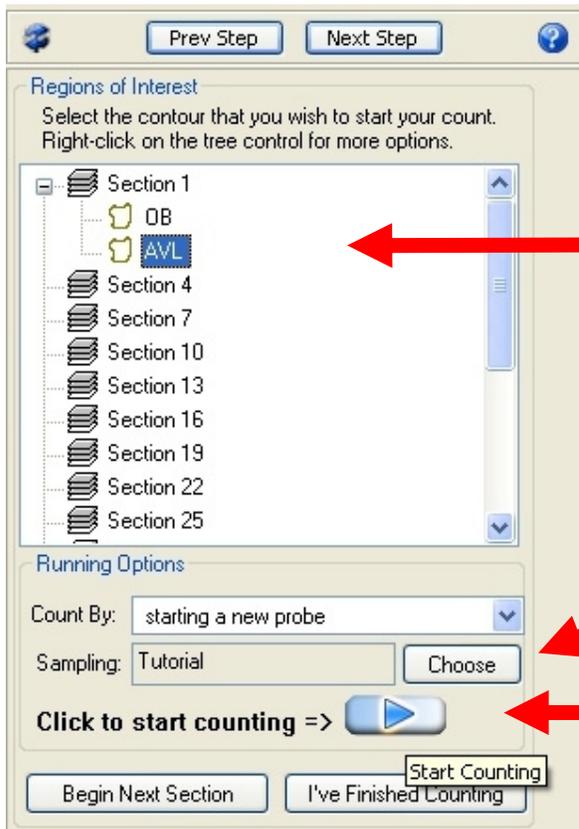
2 Dar click en “Save your Current Settings” para que se guarden los parámetros de conteo

Parameter	Value
Low Mag Lens	4X .13 NA
High Mag Lens	100X 1.4 NA
Counting Frame X	50.00 μm
Counting Frame Y	50.00 μm
Grid Size X	200.00 μm
Grid Size Y	200.00 μm
Grid Rotation	0.00 degrees
Desired Sites	1
Section Cut Thickness	45.00 μm
GuardZone Type	Percentage
Top Guard Zone Percent	0.05 %
Disector Height	25.00 μm
Focusing Method	Manual Focus
Refocus at each site	true

24. El siguiente paso define la región que se va a contar y los parámetros de conteo (previamente guardados) que serán utilizados. Si se ha trazado más de una región por corte histológico, primero se debe muestrear una región y las demás de manera subsecuente.



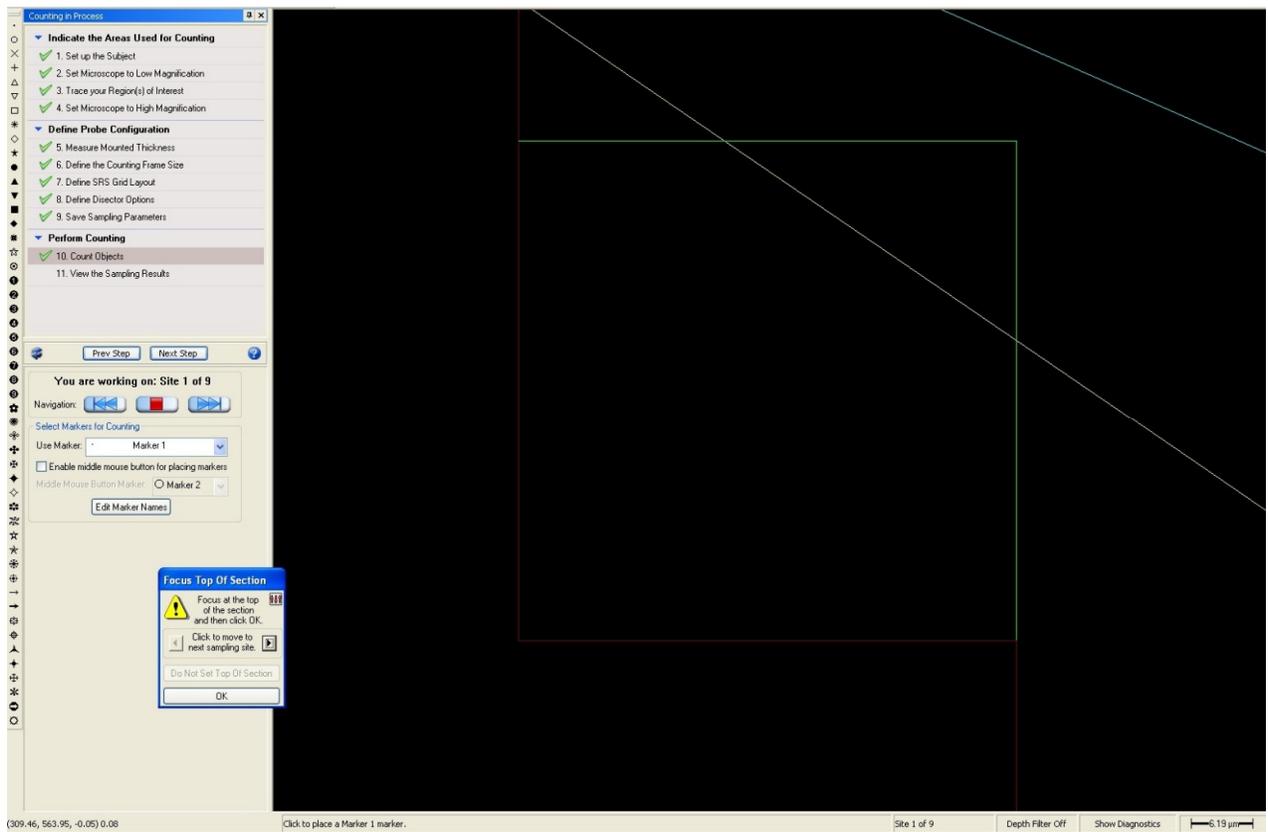
1 Para el caso de conteo de colocalizaciones, seleccionar en el “**Tool Panel 1**”, uno de los dos canales a contar; y SIEMPRE usar las opciones marcadas con “Spinning Disk”. En este ejemplo se utilizan los fluoróforos Alexa 488 y Alexa 594. En la pantalla se mostrará la región seleccionada en el canal seleccionado.



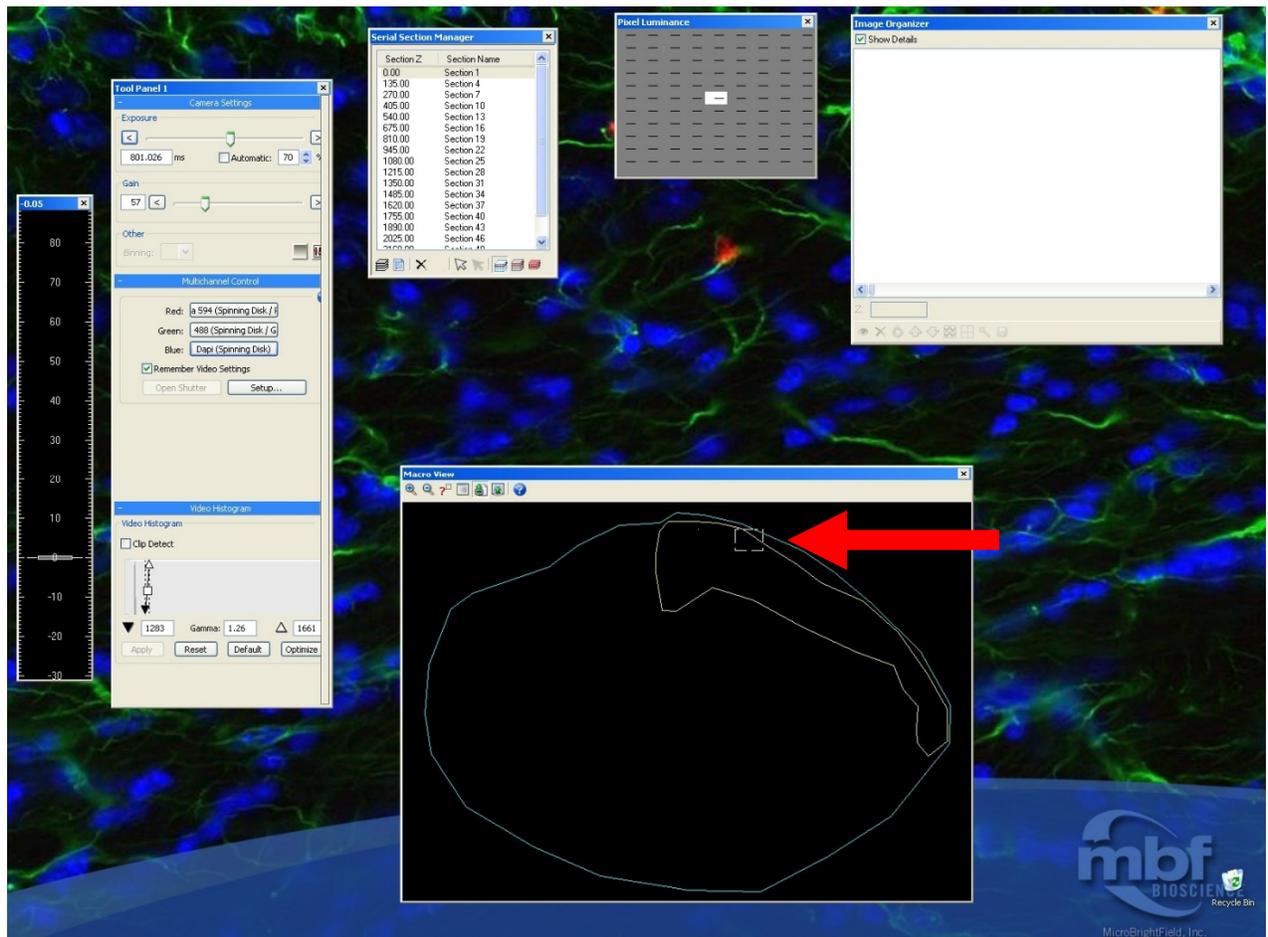
2 Seleccionar la región de interés que será sometida a conteo

3 Seleccionar el archivo que posee los parámetros de conteo previamente guardados.

4 Hacer click en el botón de “**Start**” para comenzar a contar



Monitor 1



Monitor 2. En la ventana “MacroView” se muestra en un recuadro blanco la región que se está explorando.

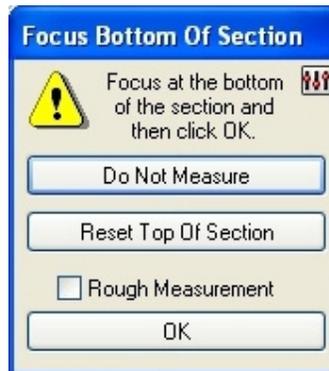
25. al iniciar el conteo, la platina motorizada se moverá automáticamente al primer sitio de conteo sistemático y aleatorio. Para cada uno de los sitios de conteo, aparecerá la ventana **“Focus Top Of Section”**; esta herramienta le sirve al programa para determinar el grosor real del sitio que se explorará. Utilizando la perilla derecha del joystick, colocarse en el borde superior (último elemento en foco) del corte para marcar el inicio del mismo. En la ventana de la herramienta Z una barra blanca horizontal comenzará a desplazarse hacia un valor determinado. Una vez hecho esto, dar click en **“OK”**. La barra horizontal blanca de la herramienta Z se colocará en **“0”**.

Nota: el programa no permite ninguna acción hasta que se señale el grosor del sitio en cuestión.



Una vez localizado el inicio del corte, dar click en **“OK”**

26. Inmediatamente aparecerá la ventana de **“Focus Bottom Of Section”**. Utilizando otra vez la perilla derecha del joystick, colocarse ahora en el borde inferior del corte (también último elemento en foco) para indicar el final del mismo. En la ventana de la herramienta Z la barra blanca horizontal comenzará a desplazarse hacia un valor positivo. Una vez hecho esto, dar click en **“OK”**.

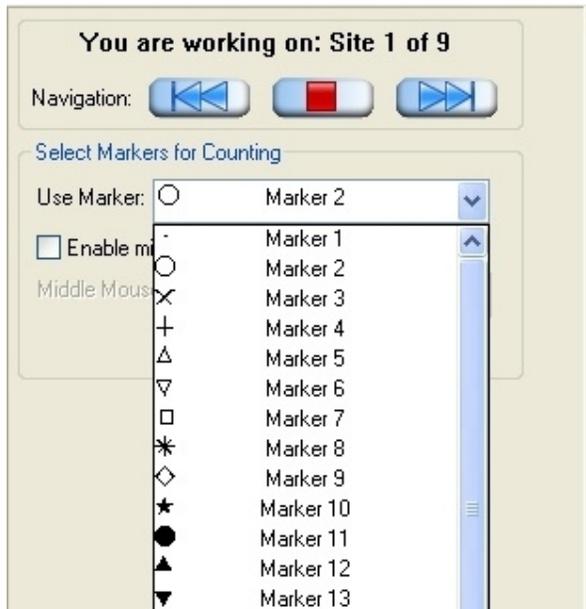


Una vez localizado el final del corte, dar click en **“OK”**

El microscopio volverá automáticamente al valor dado de inicio del corte.

Nota: Si el movimiento en Z del usuario excede la altura dada del disector óptico, los colores verde y rojo del cuadro de conteo se tornarán amarillos.

27. A continuación se debe seleccionar un “marcador” para colocar en el sitio preciso donde se encuentre una célula de interés. Un marcador puede simbolizar una marca sencilla o una colocación de acuerdo a su elección. Se sugiere utilizar marcadores de buena visibilidad en pantalla, tales como los marcadores “**Marker 2**” al “**9**”.



Seleccionar un marcador para cada uno de los tipos celulares de interés o colocaciones

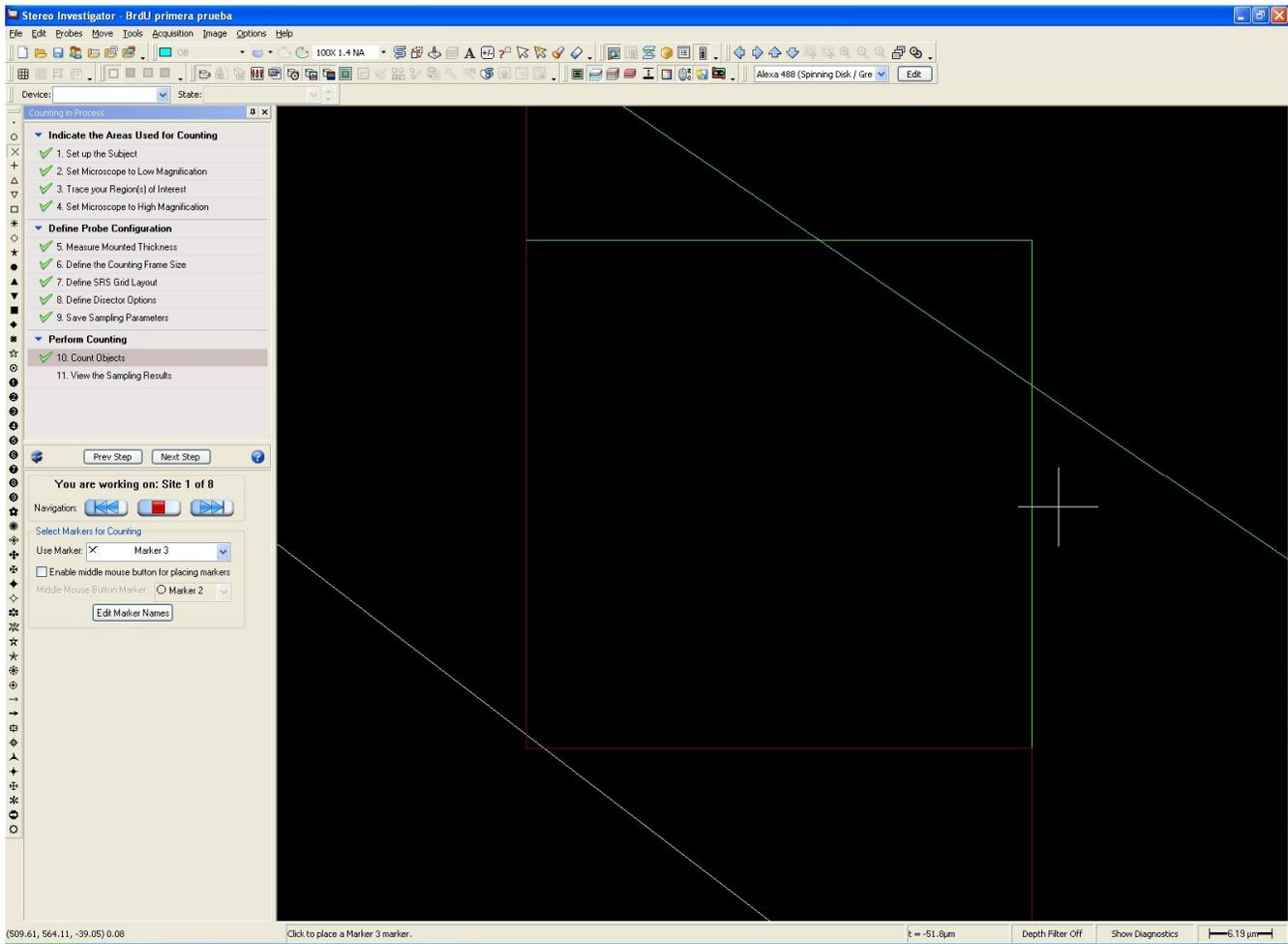
Una vez seleccionado un marcador, se le puede asignar un nombre haciendo click en “**Edit Marker Names**”.



Click para cambiar nombre de marcador

Nota: El marcador seleccionado para una población celular debe ser el mismo a lo largo de todos los sitios y todos los cortes a contar, la elección del mismo solo se lleva a cabo una vez al el inicio de los conteos.

28. A continuación, comenzar a buscar por las células de interés dentro del cuadro de conteo:

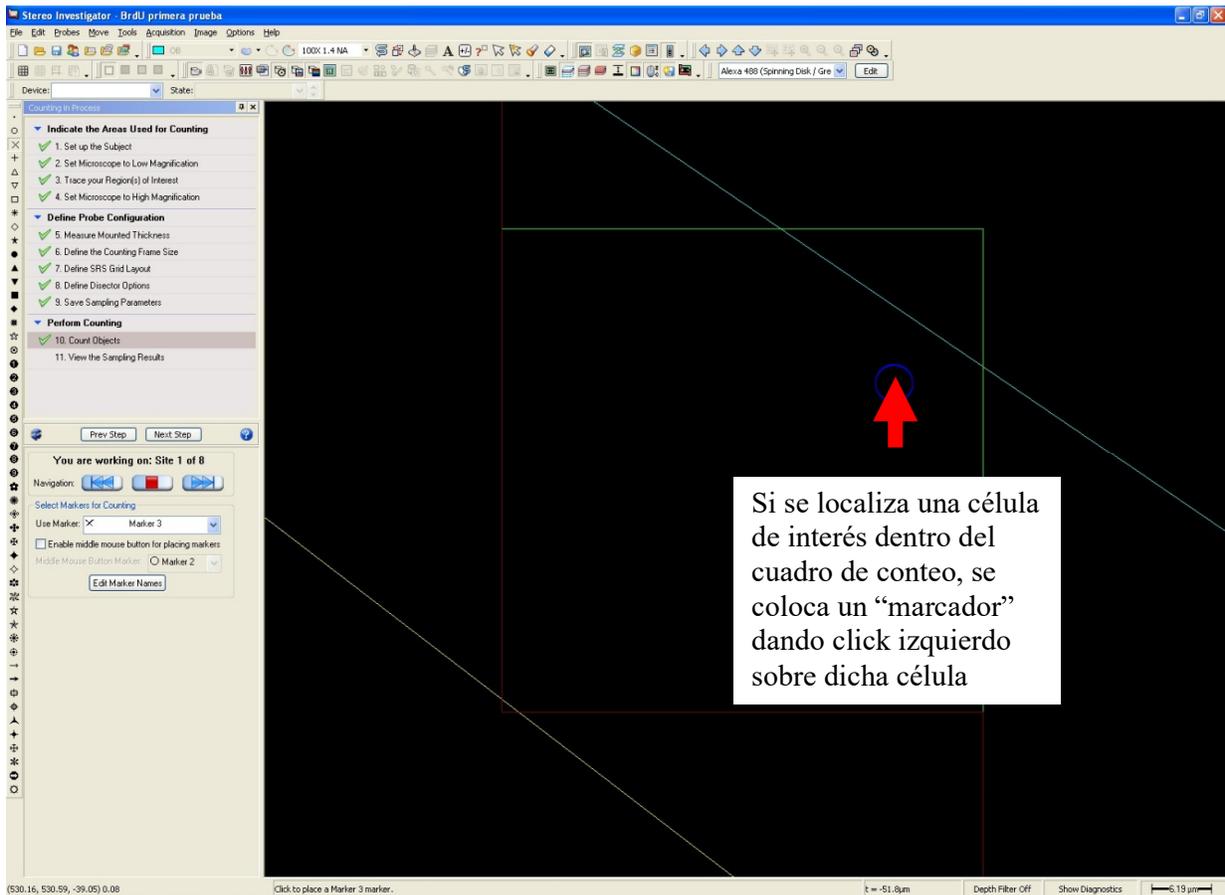


Comenzar a buscar por las células de interés desde la parte superior del corte hasta el final del mismo, utilizando el control del micrométrico (digipod) disponible en el joystick. Un criterio importante para realizar el conteo es definir si se tomarán en cuenta las células que “toquen” el borde superior o las que “toquen” el borde inferior del corte; este criterio debe ser definido antes de comenzar a contar y debe permanecer a lo largo de todos los cortes a contar. El cuadro de conteo tiene una parte roja y una parte verde (ver imagen). Si la célula está dentro del cuadro de conteo o toca las líneas verdes, se toma en cuenta la célula y se le coloca un “marcador”. Si la célula está fuera del cuadro de conteo o toca las líneas rojas, es excluida del conteo y no se le coloca ningún marcador. Cuando el micrométrico excede los límites en Z del cuadro de conteo, éste se torna amarillo y es indicativo de que ya no se pueden “marcar” células aunque las hubiere. Lo anterior aplica para el caso de estar contando células marcadas para un solo fluoróforo; si se están buscando células con colocación de dos o más marcas, primero buscar las células en un canal (p.e. en el canal verde “Alexa 488 Spinning Disk / Green”) y posteriormente buscarlas en el canal subsecuente (p.e. en el canal rojo “Alexa 594 Spinning Disk / Red”). El cambio de filtros se realiza desde el “**Multichannel Control**” del “**Tool Panel 1**” como se muestra en la siguiente figura:



Click para cambiar de fluorocromo

Los filtros pueden ser cambiados desde el “**Multichannel Control**” las veces que sean necesarias para confirmar las colocalizaciones. Si las células que presentan colocalización cumplen con los lineamientos estereológicos descritos anteriormente, se les coloca un “**marcador**”.



29. Una vez escaneado completamente el sitio se procede con el siguiente.

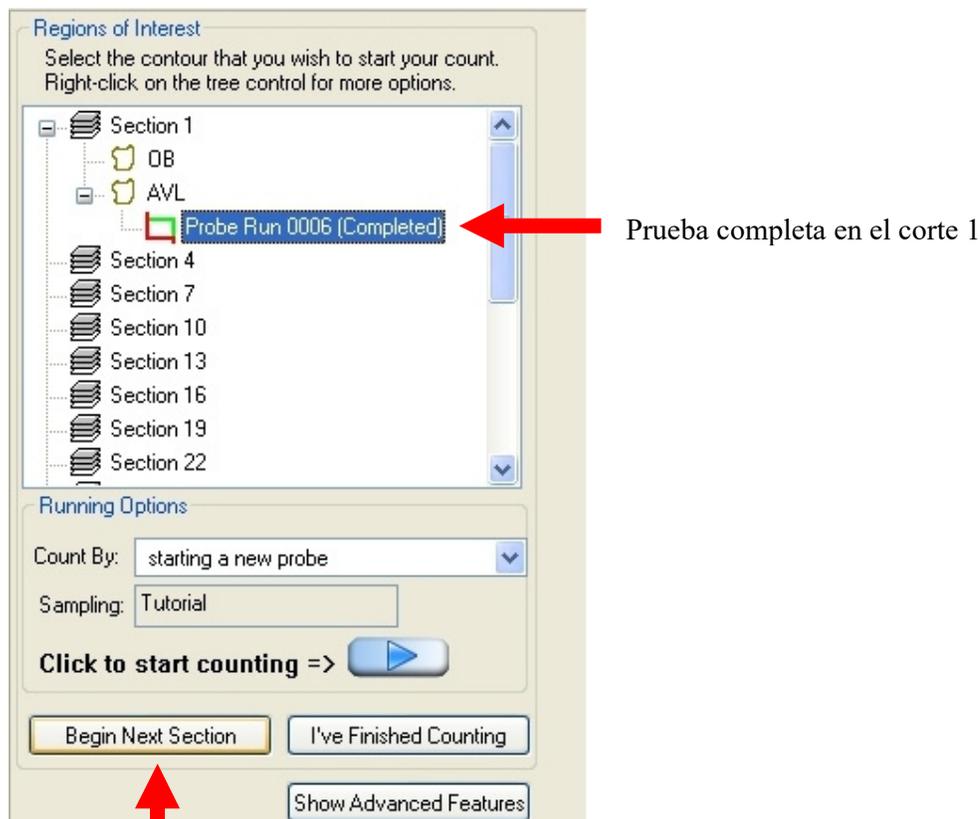


Se desplegará el siguiente sitio para realizar el conteo y reaparecerá la ventana “**Focus Top Of Section**”. Repetir los pasos 25, 26 y 28 de la guía hasta culminar todos los sitios para el corte en cuestión.

30. Una vez contados todos los sitios, aparecerá el siguiente mensaje:



Cuando se de click en “OK” aparecerá que la “Probe Run XXXX” está completa. Si se desea, puede continuar el conteo en la sección siguiente dando click en “**Begin Next Section**” Cabe mencionar que el muestreo de un solo corte no es suficiente para desplegar resultados confiables de un conteo estereológico.

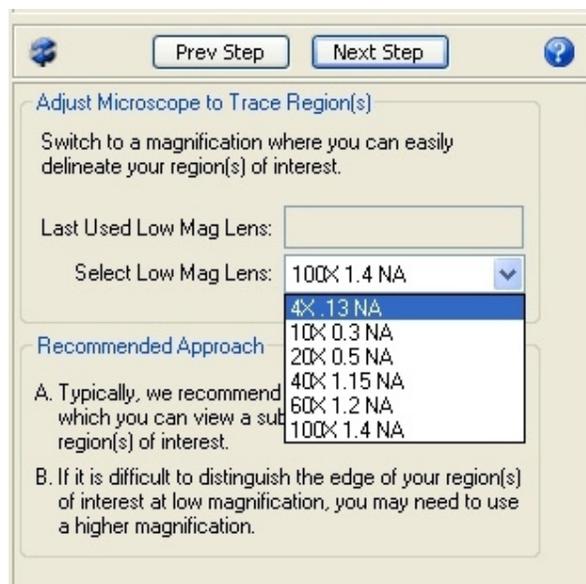


Dar click aquí para proceder al trazado del siguiente corte

31. Si no existen trazos previos de los cortes subsecuentes, aparecerá el siguiente mensaje:



Al dar click en “OK”, el programa redirigirá automáticamente al usuario al paso 2 del Workflow (paso 15 de la presente guía):



Repetir los pasos hasta completar los trazos y los conteos en todos los cortes seleccionados. Afortunadamente, los pasos 5, 6, 7, 8 y 9 del Workflow (pasos 19 al 23 de la presente guía) son omitidos en los cortes subsecuentes. Solo hay que tener cuidado de estar posicionados en la región de interés del corte histológico correcto y de seleccionar el archivo con los parámetros de muestreo correctos.



1 Revisar que el archivo que posee los parámetros de conteo previamente guardados sea el correcto.

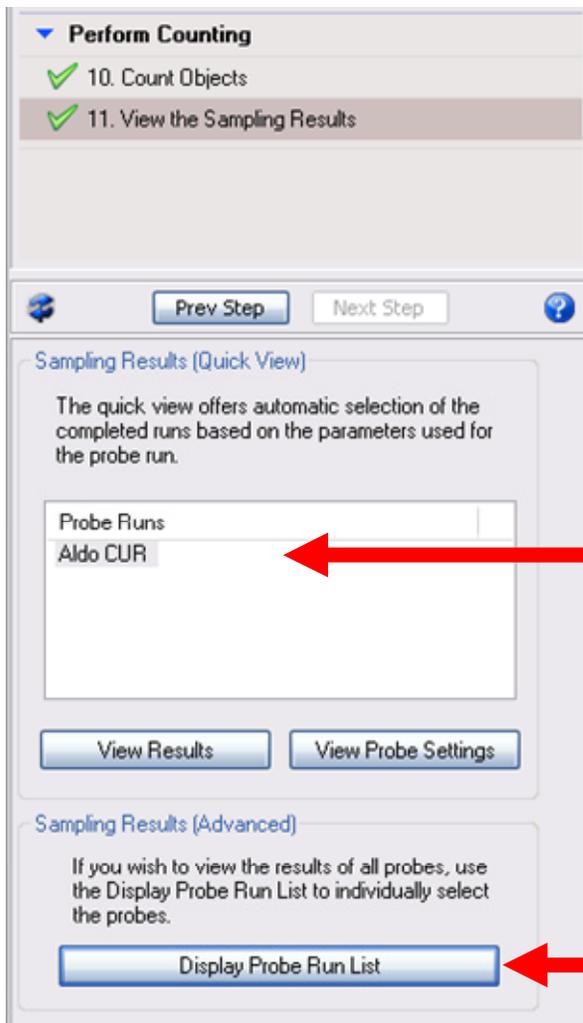
2 Hacer click en el botón de “Start” para comenzar a contar

32. una vez concluidos los conteos de todos los cortes seleccionados de la muestra biológica de interés, dar click en “**I’ve Finished Counting**”



Click aquí

Aparecerá la ventana siguiente:



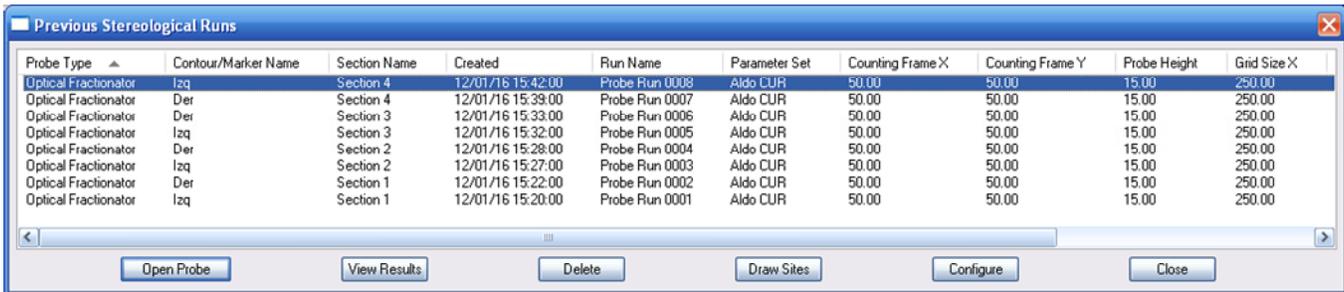
1

Seleccionar el archivo de parámetros con el que se realizó el muestreo (si se muestreó con más de un archivo de parámetros, éstos aparecerán listados, los resultados se mostrarán segregados y los estimados de número celular serían incorrectos, por lo que resulta importante muestrear todos los cortes de un sujeto experimental con los mismos parámetros).

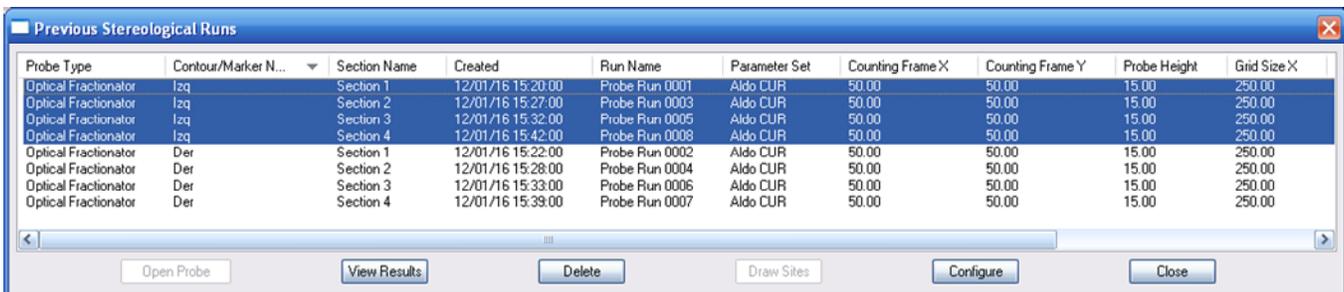
2

Dar click en “**Display Probe Run List**”

33. Aparecerá la siguiente ventana:

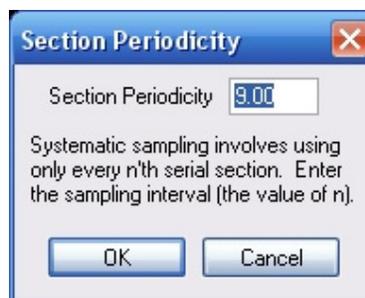


Puede darse el caso de que como en la imagen superior, se hayan realizado conteos con los mismos parámetros de dos regiones distintas (en el ejemplo, hemisferio izquierdo y hemisferio derecho) y se quiera el estimado de cada región de manera independiente. La ventana **“Display Probe Run List”** permite administrar los conteos y ordenarlos por tipo de prueba, nombre de contorno, nombre de la prueba, etc. Para segregar los **“Izq”** de los **“Der”** simplemente hay que dar click en la variable **“Contour/Marker Name”** y enlistará de manera ordinal los conteos:



Una vez enlistados, seleccionar los conteos pertenecientes a un mismo muestreo dando click en cada uno de ellos manteniendo presionada la tecla **“Shift”**. Cada uno de ellos se resaltará en fondo azul.

34. Dar click en el botón **“View Results”**. Aparecerá la ventana **“Section Periodicity”**, con la periodicidad dada en el paso 14 de la presente guía. Si no hubo ningún ajuste en cuanto al número de cortes histológicos muestreados, dar click en **“OK”**, si se modificó el espaciamiento entre los cortes muestreados, ingresar el nuevo valor y posteriormente dar click en **“OK”**



35. Se desplegará la ventana “**Sampling Results**”, la cual contiene varios apartados con resultados del conteo estereológico; en la pestaña “**Parameters**” se despliegan los parámetros generales con los cuales fue realizado el conteo estereológico.

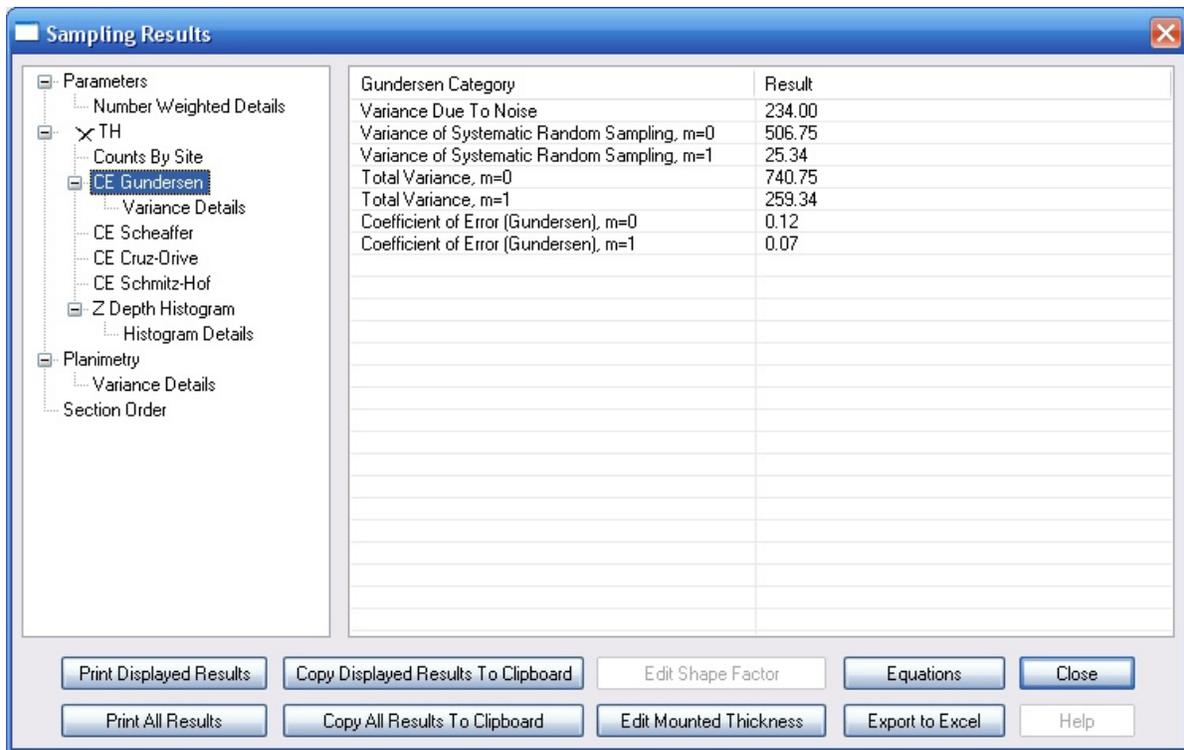
Category	Result
Data File Name	C:\Documents and Settings\Neurolocida\My Do
Date And Time	
Region	AVL
Sampling Parameter Set	AVL OB 45 micras (malla 3)
Number Of Sampling Sites	207
Counting Frame Area (XY) (µm²)	900.000
Disector Height (Z) (µm)	35.0
Disector Volume (XYZ) (µm³)	31500.0
Guard Zone Distance (µm)	0.0
Shape Factor	8.56
Counting Frame Width (X) (µm)	30.0
Counting Frame Height (Y) (µm)	30.0
Sampling Grid (X) (µm)	110.0
Sampling Grid (Y) (µm)	110.0
Sampling Grid Area (XY) (µm²)	12100.0
Section Thickness (µm) ¹	43.0
Mean Measured Section Thickness (µm)	46.8
Mean Measured Section Thickness with Counts (µm)	46.7
Number Weighted Mean Section Thickness (µm)	46.6
Section Evaluation Interval	9.000000

¹ Mean thickness of mounted tissue

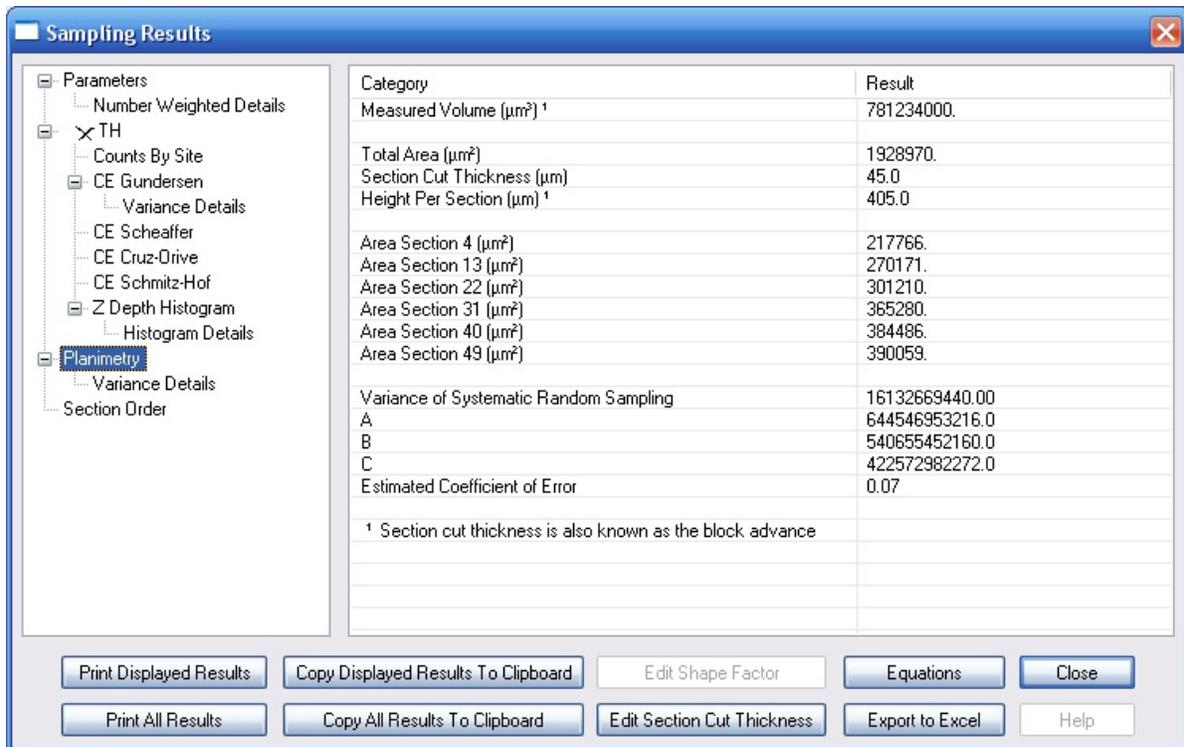
En las pestañas de marcadores se despliegan los estimados estereológicos de la (s) población (es) celular (es) de interés. Normalmente el número que se reporta es el de “**Estimated Population using Mean Section Thickness**”. Esta pestaña también despliega el número total de marcadores utilizados (**Total Markers Counted**).

Category	Result
Optical Fractionator Population Estimates	
Estimated Population using User Defined Section Thickness	34785
Estimates using Section Thickness Measured at Counting Sites	
Estimated Population using Mean Section Thickness	37869
Estimated Population using Mean Section Thickness (only using Sites with Counts)	37802
Estimated Population using Number Weighted Section Thickness	37663
Total Markers Counted	234

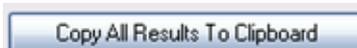
Al tratarse de un método de conteo inferencial, se utilizan valores estadísticos estándar (para el caso de conteos estereológicos, coeficientes de confianza) para medir la precisión de las estimaciones de número celular obtenidas; de los coeficientes enlistados en la ventana de “**Sampling Results**”, el más reportado en la literatura es el **Coefficiente de Error de Gundersen**, el cual se encuentra en la pestaña “**CE Gundersen**”. Si el coeficiente de Gundersen es menor o igual a 0.10 (siendo $m=0$ o $m=1$ dependiente del tamaño del muestreo), se considera que el conteo es válido. Si el valor obtenido al finalizar el conteo es mayor a 0.10, se requerirá incrementar el número de cortes a contar o hacer más estrecha la malla o más grande el cuadro de conteo, dependiendo del valor obtenido, y se deberá realizar un nuevo conteo. Si es el caso de que sólo se estreche la malla o se haga más grande el cuadro de conteo, el nuevo conteo puede ser realizado sobre los mismos cortes, pero si se requiere incrementar el número de cortes a contar deberá realizarse una nueva corrida de configuración, en la cual se establecerán los cortes histológicos a contar.



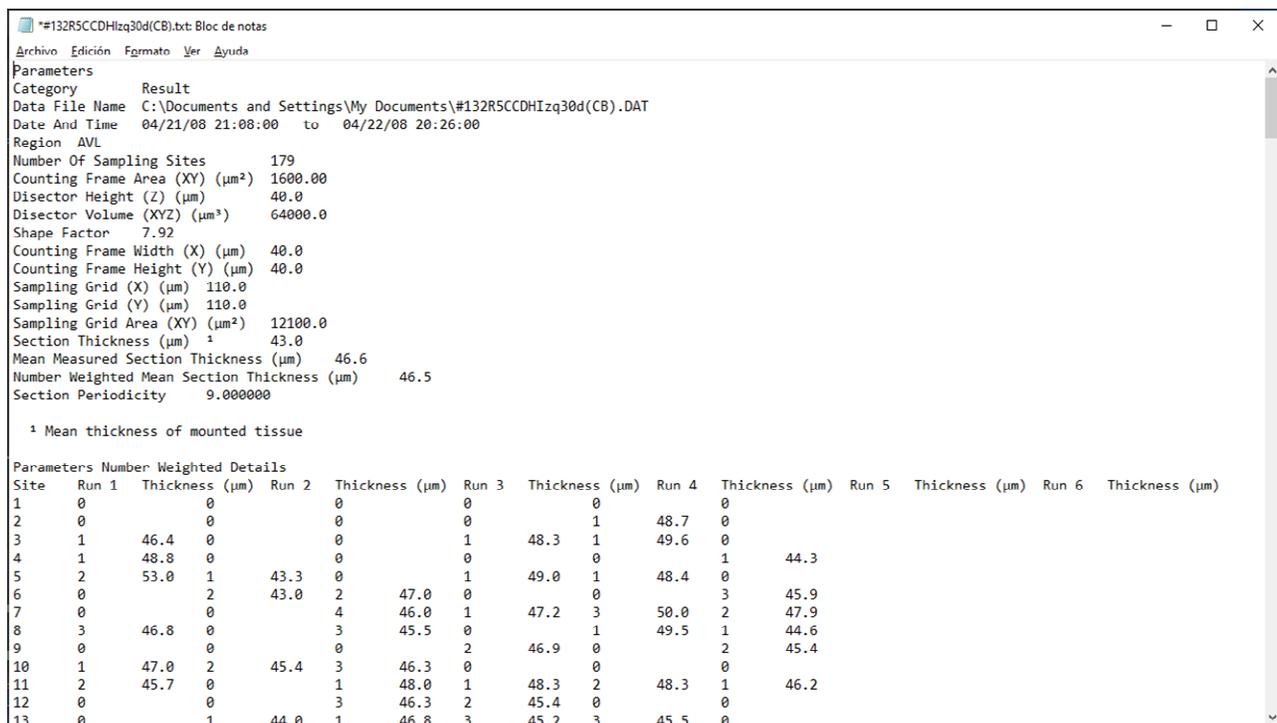
36. Finalmente, en la pestaña de “**Planimetry**” se despliegan estimados de área y volumen de la estructura completa y del área de cada corte de manera individual. También despliega las áreas de los cortes individuales, así como el coeficiente estimado de error, el cual si es menor a 0.10 valida la precisión de estos resultados.



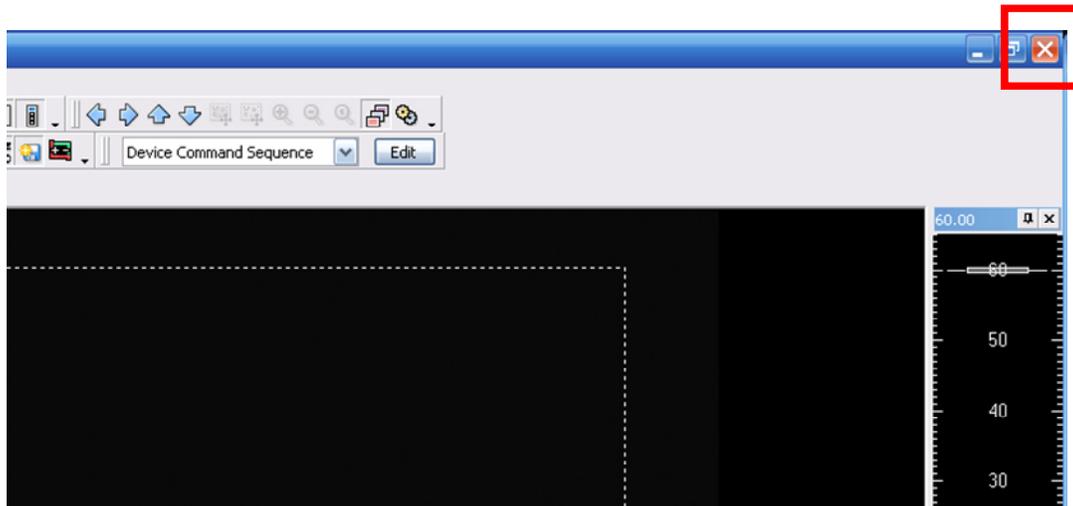
37. Para exportar los datos a programas de procesadores de texto u hojas de cálculo, dar click en el botón “Copy All Results To Clipboard”.



38. Abrir el programa al cual se van a pegar los datos. Al ser exportados como “valores separados por comas”, pueden ser pegados en el programa “Bloc de notas” y guardados como un archivo “.txt” para pegarlos posteriormente en programas especializados en estadística:



39. Al finalizar la sesión, cerrar el programa y todos sus módulos únicamente dando click sobre el X sobre fondo rojo situado en la parte superior derecha de la ventana principal del programa, no es necesario cerrar todos los módulos de manera individual.



40. Guardar los archivos “.txt” en los servicios de almacenamiento en la nube a través del navegador “Mozilla Firefox” o mediante el uso de una memoria “USB” nueva o reformateada. **Queda estrictamente prohibido el uso de memorias fuera de estas condiciones.**

41 Mover el revolver de objetivos hasta que quede el objetivo 4X al frente. Utilizando una hoja de papel seda humedecida con 70% EtOH, limpiar cuidadosamente la lente frontal del objetivo de 60X o 100X, dependiendo de cuál haya sido utilizado.

42. Remover la preparación de la platina, cuidando de no lastimar las lentes frontales de los objetivos del revólver.

43. Revisar que el carrusel de filtros de fluorescencia delanteros del microscopio quede situado en la posición 1 hacia al frente, cuidando que se observe la luz blanca de mayor intensidad a través del objetivo 4X; para esto utilizar los botones MU+, MU-, FW+ o FW- del controlador del carrusel de filtros ND (situado en el lado derecho de la mesa antivibratoria del microscopio) hasta obtener tanto el color de luz como la intensidad mayor. Una vez obtenido dicha luz, colocar manualmente el shutter frontal en posición de bloqueo.

44. Apagar la fuente de poder de la lámpara de fluorescencia (caja vertical blanca ubicada encima del módulo IX2-UCB).

45. Apagar la cámara trasera (Hamamatsu, caja horizontal gris con crema).

46. Apagar la caja de control de la platina motorizada Lep (caja vertical gris claro).

47. Apagar el módulo IX2-UCB del microscopio (caja vertical blanca, rotulada).

48. Apagar la estación de trabajo (conformada por el CPU y los dos monitores).