

**GUÍA BÁSICA PARA EL
CONTEO ESTEROLÓGICO DE
COLOCALIZACIONES
CELULARES 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 2010

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 el “disector óptico”. Sin embargo, es altamente recomendable que el usuario 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 mas precisa que no se incluya en la guía, se podrá solicitar asistencia tanto al técnico, como al Investigador Académico responsable de la Unidad para recibir asesoría individual.

Contactos:

Responsable Técnico: Miguel Tapia Rodríguez

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

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

mtapia@biomedicas.unam.mx

Responsable Académico: Dra. Angélica Zepeda R.

Cubículo C211, 2º piso, Torre C. Sede Circuito Exterior.

Tel. +(52) (55)5622-8222 ext. 46811

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; 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. Es importante recalcar en este punto que el módulo DSU funciona únicamente con el juego de filtros y cámara traseros, por lo que la confocalidad en este microscopio solo es posible si 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 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

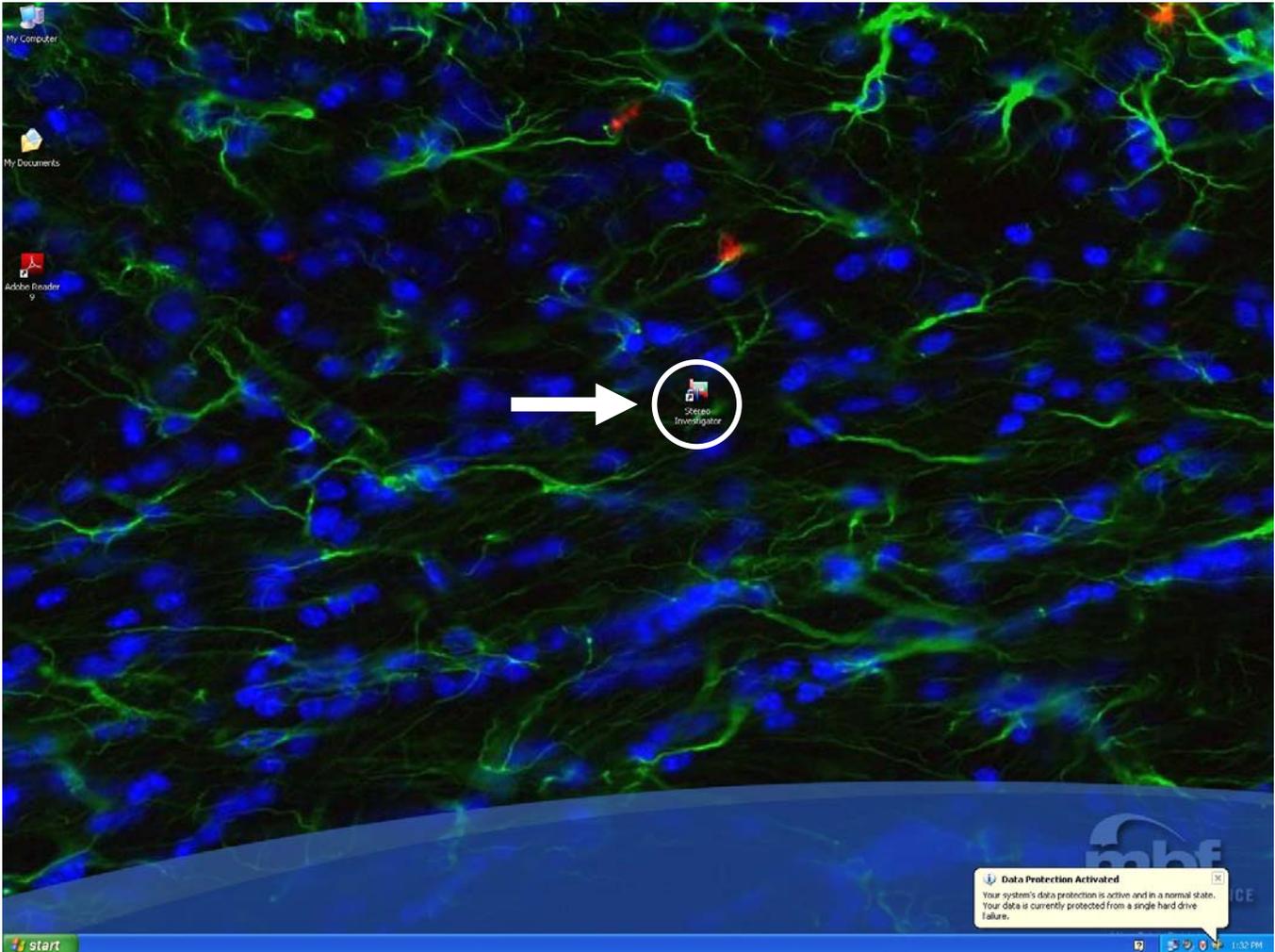
ENCENDIDO DEL EQUIPO

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 los monitores aparecerá la siguiente ventana:

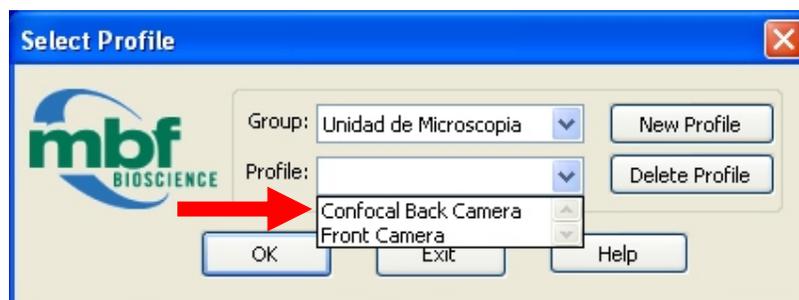


Como “User name” teclear “**U. Microscopia**” sin acento. Como “Password” teclear “**dsu.123**”. Esto permitirá el ingreso al sistema operativo, así como la conexión automática a las unidades de red compartidas del Instituto (X para la Sede de Circuito Escolar; W para la Sede de Circuito Exterior).

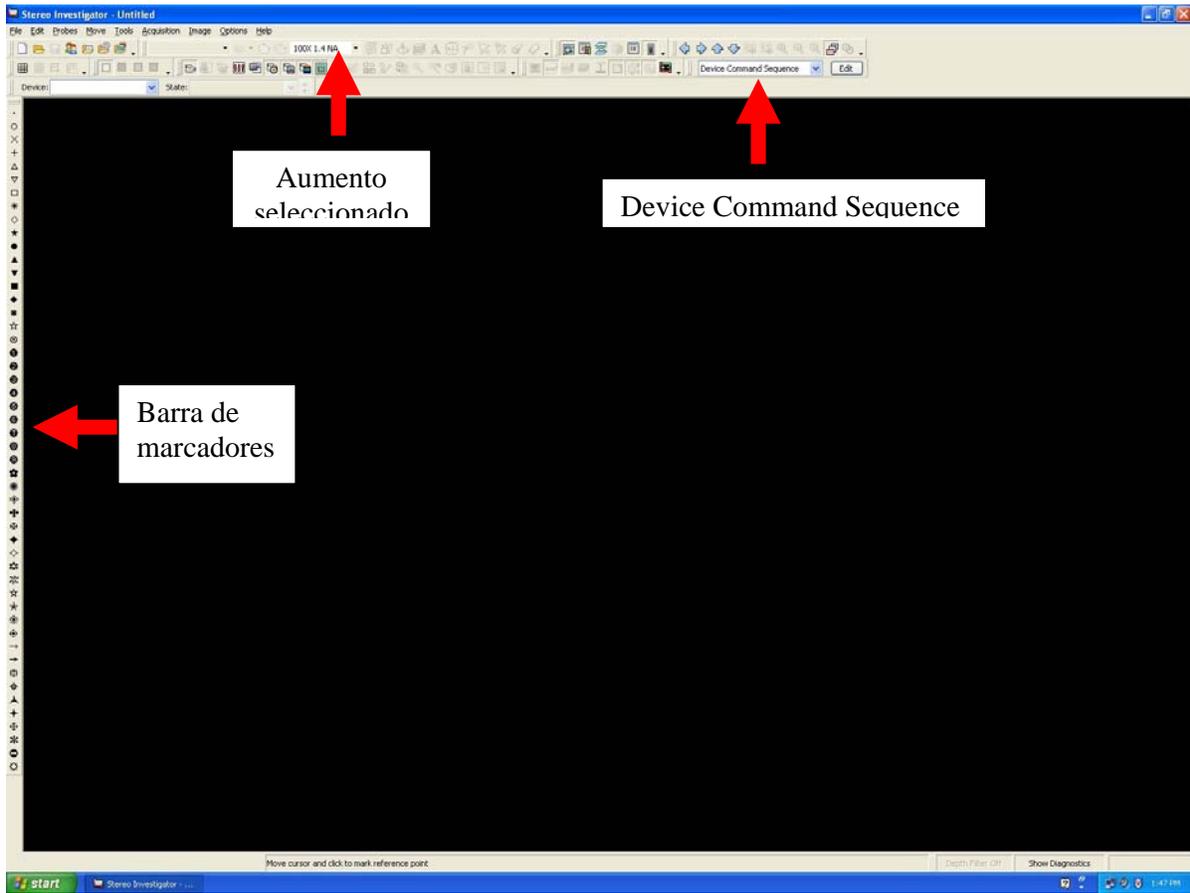


Monitor 1

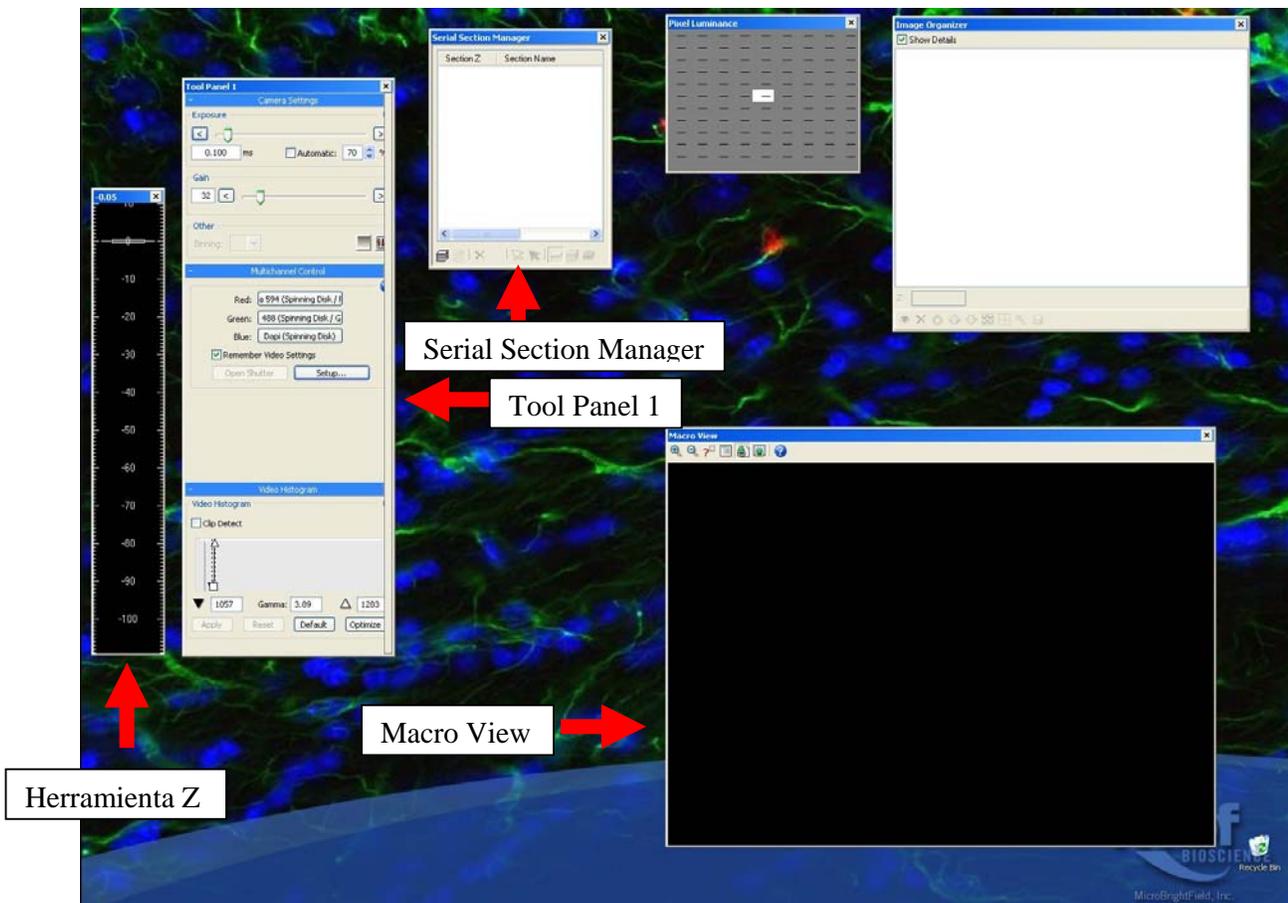
7. Haga doble click en el ícono “Stereo Investigator” para iniciar el software que opera el DSU. Aparecerá la siguiente ventana:



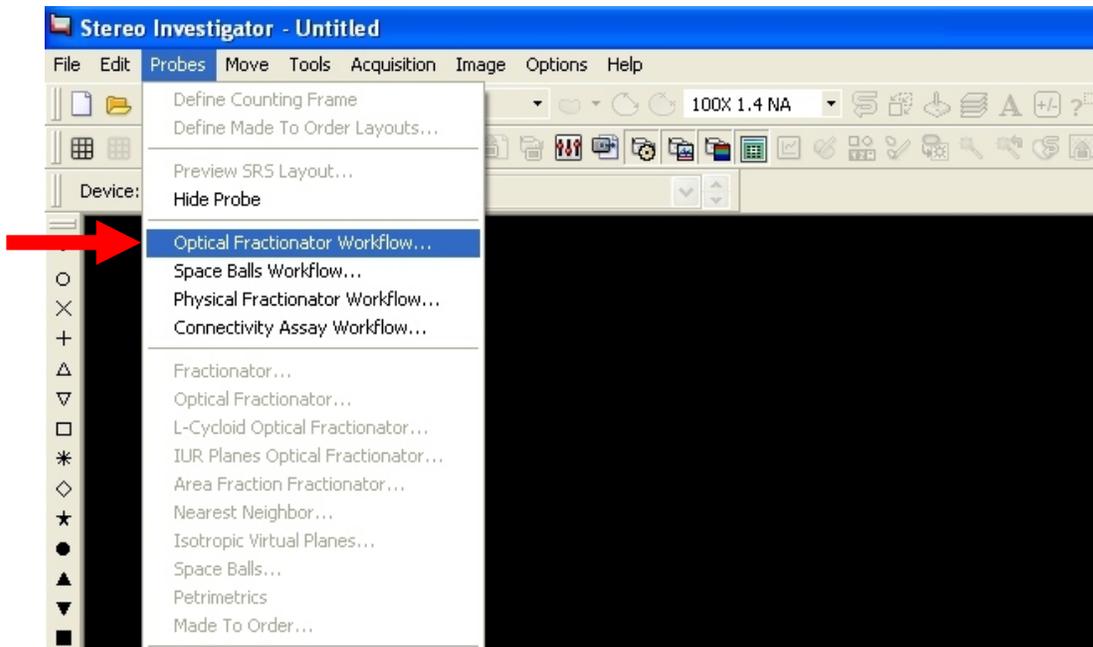
8. Seleccionar como Profile “Confocal Back Camera” y luego dar click en “OK”. Esta acción abrirá la ventana principal del programa.



Monitor 1

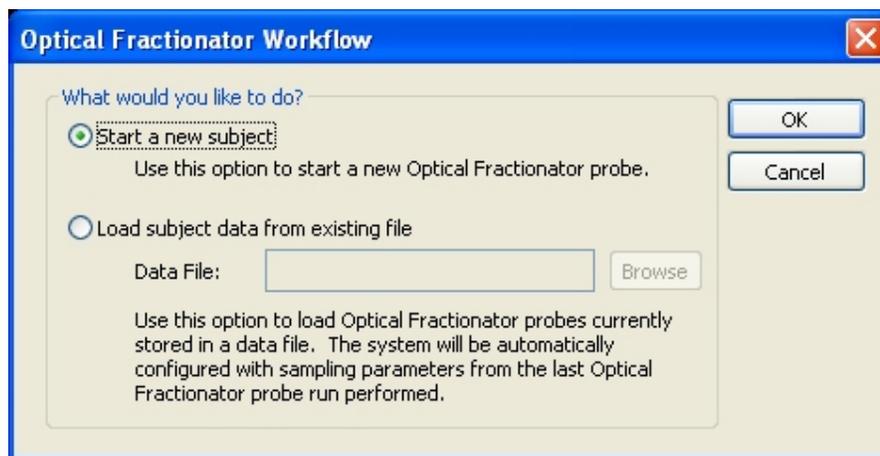


Monitor 2



9. En el 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 como ejemplo el “Optical Fractionator Workflow”.

Enseguida aparecerá esta ventana:



10. 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 siguiente ventana; es el paso 1 del Workflow:

Optical Fractionator Workflow [X]

- ▼ **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

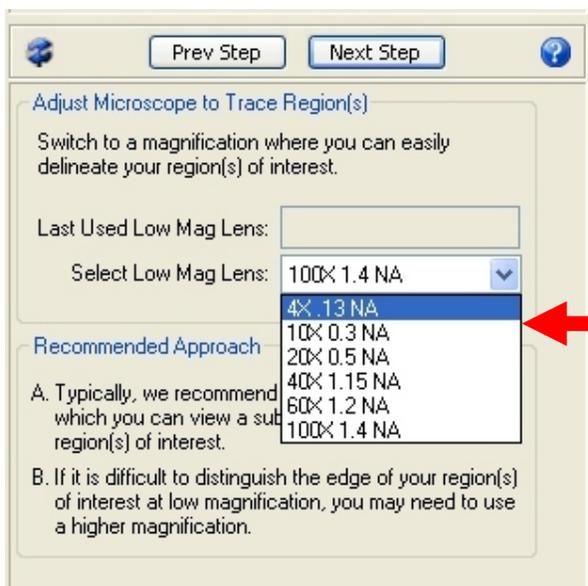
8 Una vez llenados todos los campos, hacer click en "Next Step"

1 Llenar estos campos apropiadamente

2 Escoger "No" si es un estudio completamente nuevo y no se han almacenado configuraciones con anterioridad

3 Número de cortes a contar.
4 Grosor del corte al cual se procesó el tejido.
5 Intervalo al cual será definido el conteo.
6 Escoger "Randomize" de preferencia.
7 Este valor se establece comúnmente de acuerdo con el número de corte en el que se iniciará el conteo

11. 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 a 4X o a 10X, según se seleccionó en el software.



← **2** Dar click en “Next Step”

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

En el monitor se debe comenzar a observar la muestra; para obtener una imagen nítida de la misma, ir al “Device Command Sequence” y escoger algún canal que nos de resolución de la estructura completa, por ejemplo “Dapi” si es que está presente en la muestra o alguna otra tinción fluorescente otro de gran brillantez y que defina claramente los contornos de la región a estudiar:



← Seleccionar Dapi o equivalente (sin Spinning disk)

Si hay que hacer ajuste de imagen, utilizar las herramientas del “Tool Panel 1”



Este panel es útil si se requiere capturar imagen de alguna región de interés; con la opción de realizar una captura sobre el eje Z.

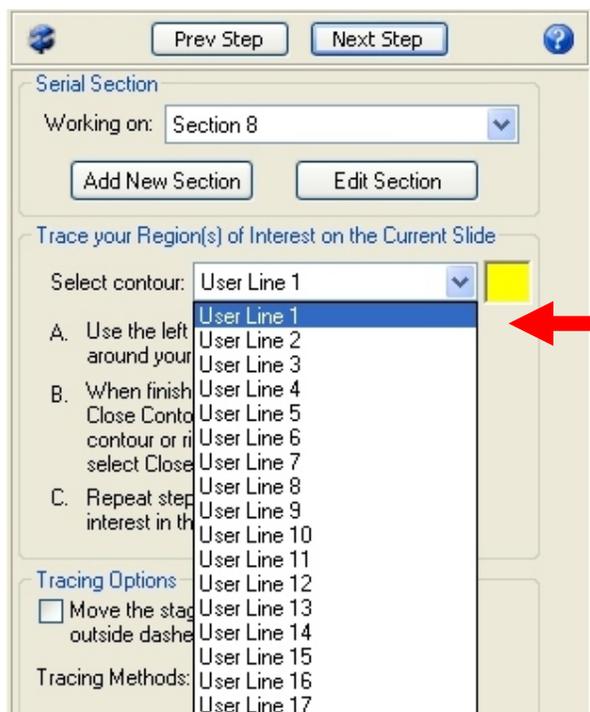
En este panel se pueden ajustar de manera manual los parámetros de exposición y de sensibilidad de la cámara. No se recomienda que se deje que la cámara detecte de manera automática el nivel de exposición.

Esta es como la ventana del “Device Command Sequence, pero exclusiva para el Spinning Disk. 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.



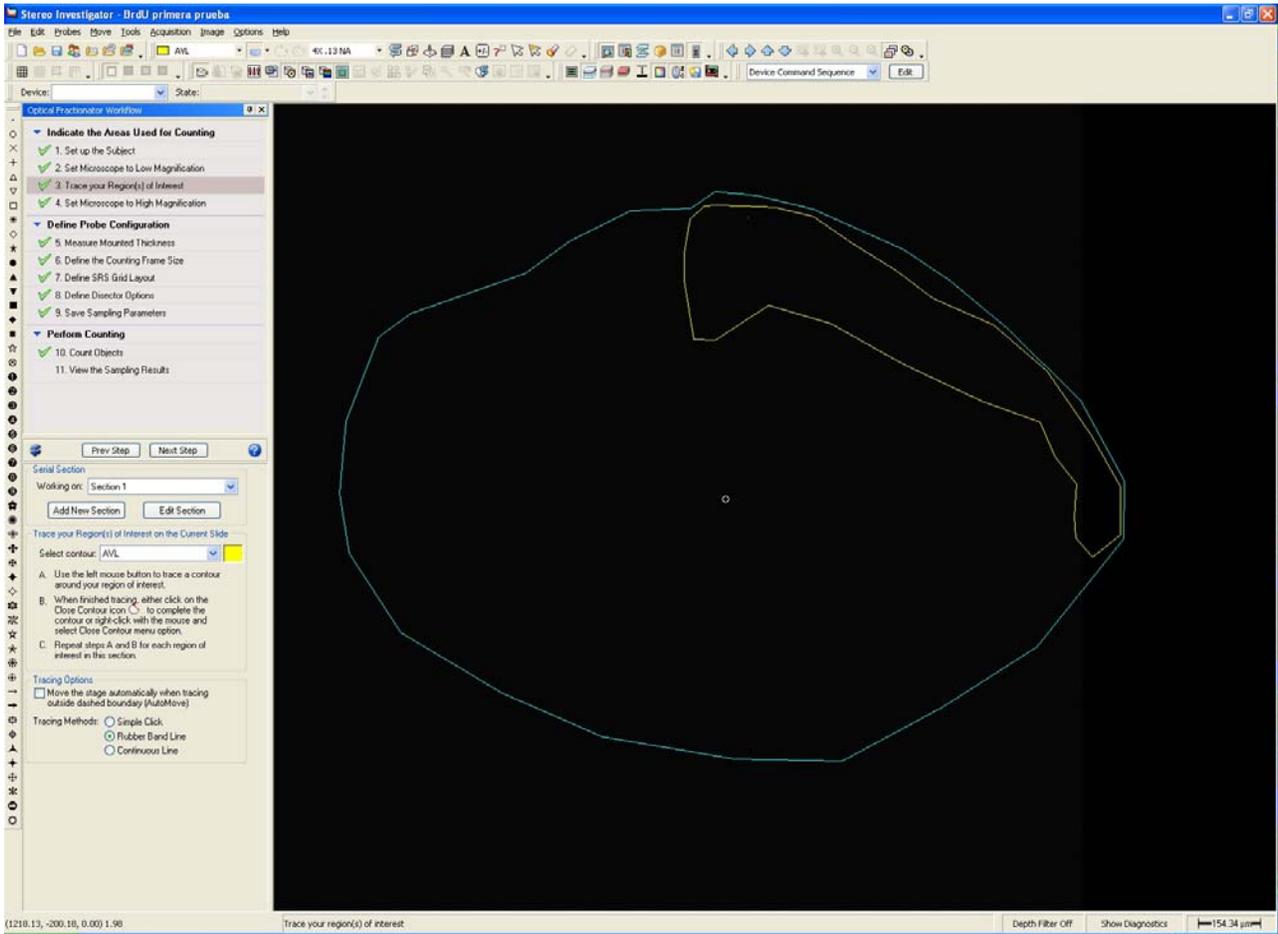
12. El siguiente paso es seleccionar los contornos a utilizar. Diversos contornos pueden ser trazados con líneas de diferente color para delimitar regiones distintas. De manera opcional, en las barras de herramientas del programa se pueden escoger diferentes líneas durante el trazado de los contornos.



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

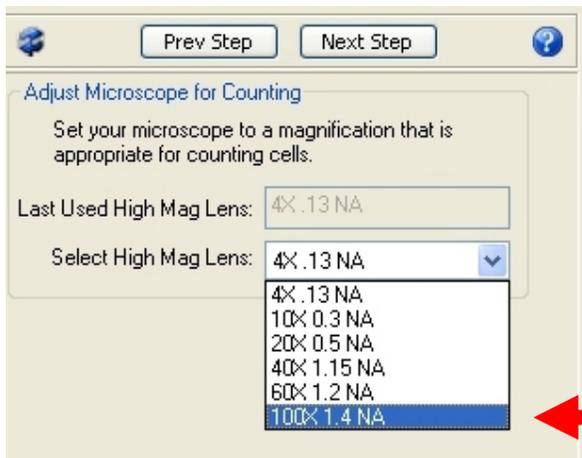
1

Seleccionar 1 línea para comenzar a trazar. 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.



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

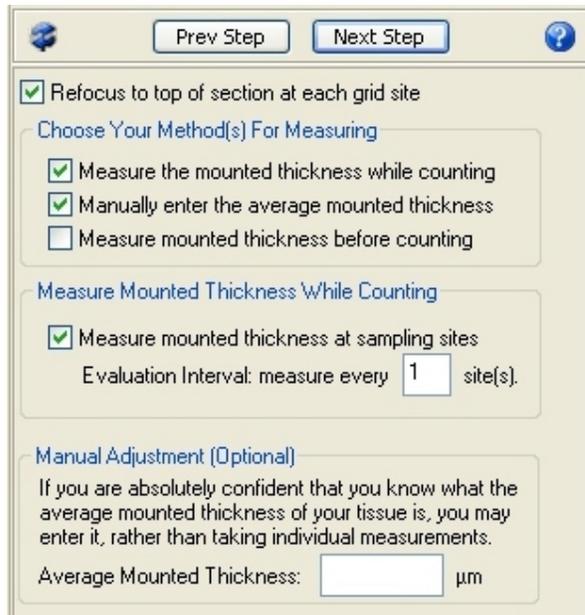
13. El siguiente paso es seleccionar una magnificación conveniente para detectar las células a contar. Normalmente los aumentos de 60X y 100X nos dan la resolución necesaria para detectar los límites precisos de las células a contar. En el microscopio, cambiar manualmente los objetivos a 60X o a 100X, según se seleccionó en el software.



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

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

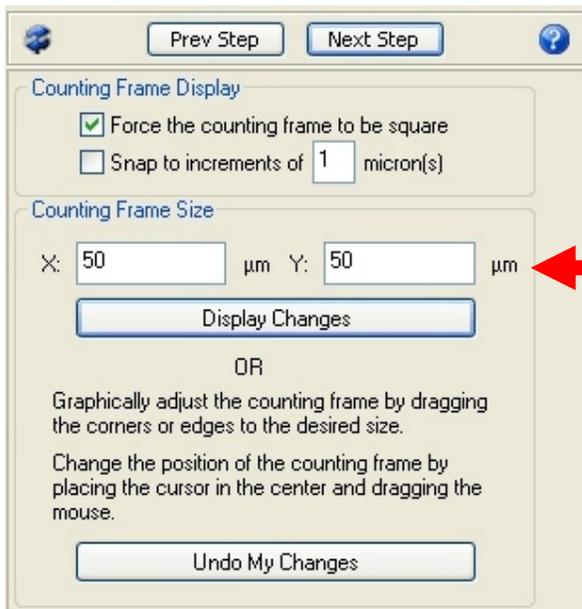
14. El siguiente paso es determinar la forma en que se medirá el grosor del corte. Esta cuestión es importante para la determinación del volumen de la estructura y del conteo del número celular.



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

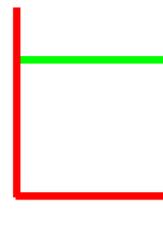
1 Seleccionar las opciones sugeridas.

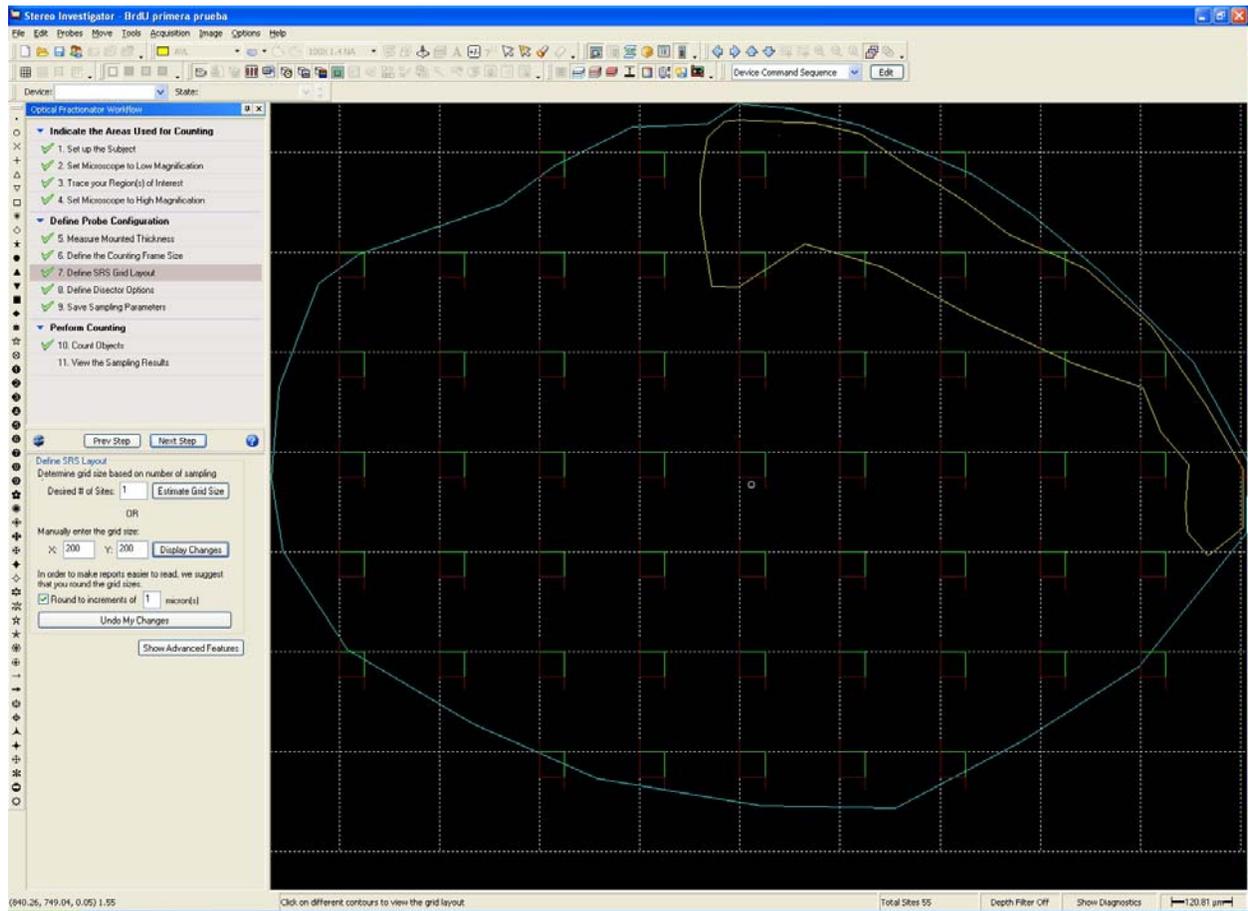
15. El siguiente paso es determinar el tamaño del cuadro de conteo. El tamaño del mismo dependerá de la densidad celular de la muestra (mayor número de células a contar = menor tamaño de cuadro de conteo). El tamaño máximo del cuadro de conteo estará delimitado por la resolución de la cámara.



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

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





16. El siguiente paso es determinar el tamaño de la “malla de conteo”. Como en el paso anterior, el tamaño de la malla también dependerá de la densidad celular de la muestra (mayor número de células de interés en el tejido = mayor espaciamiento de la malla de conteo) pero además dependerá del número de cortes a evaluar (mayor número de cortes a contar = mayor espaciamiento de la malla de conteo). Es importante recalcar que este paso y el anterior son determinantes para alcanzar un coeficiente de confianza (coeficiente de Gundersen) adecuado que valide el conteo realizado en la muestra completa. En este ejemplo se definió la malla en 200x200; nótese el espaciamiento de los cuadros de conteo en el trazo del corte.

17. El siguiente paso es determinar la altura del disector óptico. La altura del mismo dependerá del grosor final que presenten los cortes histológicos. Normalmente, se recomienda que la altura del disector óptico sea de al menos 25 μm , con las zonas de guarda de 5 μm arriba y abajo del mismo.

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

1 Seleccionar las opciones sugeridas.

2 Ingresar los datos de la altura del disector óptico así como del porcentaje de la zona de guarda.

3 Seleccionar "Manual Focus"

18. La siguiente opción se refiere a crear un archivo dentro del programa 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 subsiguientes.

3 Una vez completados, hacer click en "Next Step"

1 Llenar estos campos apropiadamente

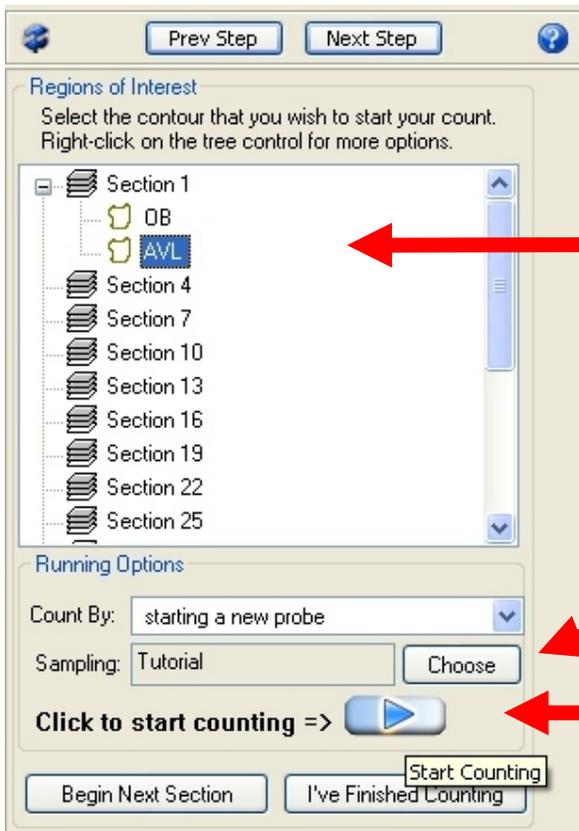
2 Dar click para que se guarde el archivo

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

18. 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 contar una región y las demás de manera subsecuente.



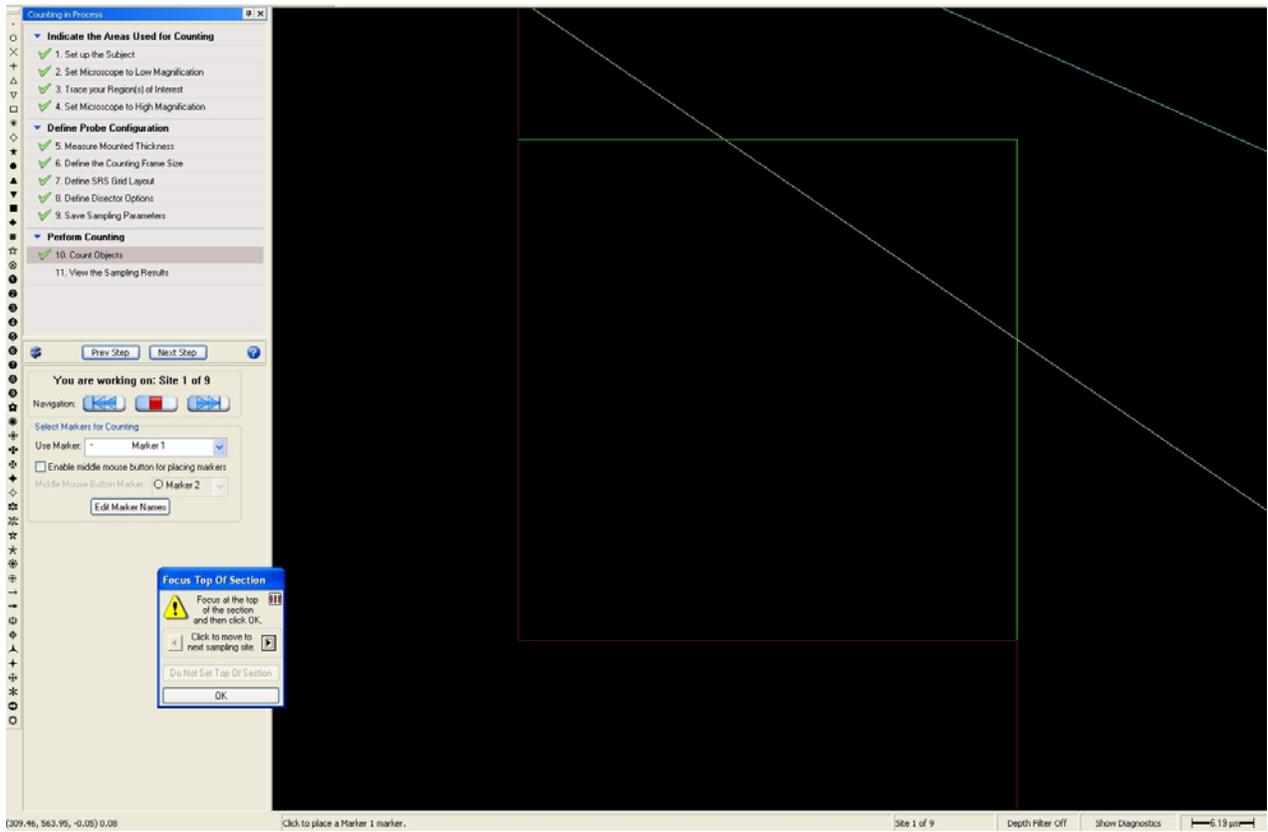
En “Device Command Sequence” o en el “Tool Panel 1”, seleccionar uno de los dos canales a contar; si es para colocalización SIEMPRE usar las opciones marcadas con “Spinning Disk”. En este ejemplo se utilizan los fluoróforos Alexa 488 y Alexa 594. En la pantalla se mostrará la región seleccionada en el canal seleccionado.



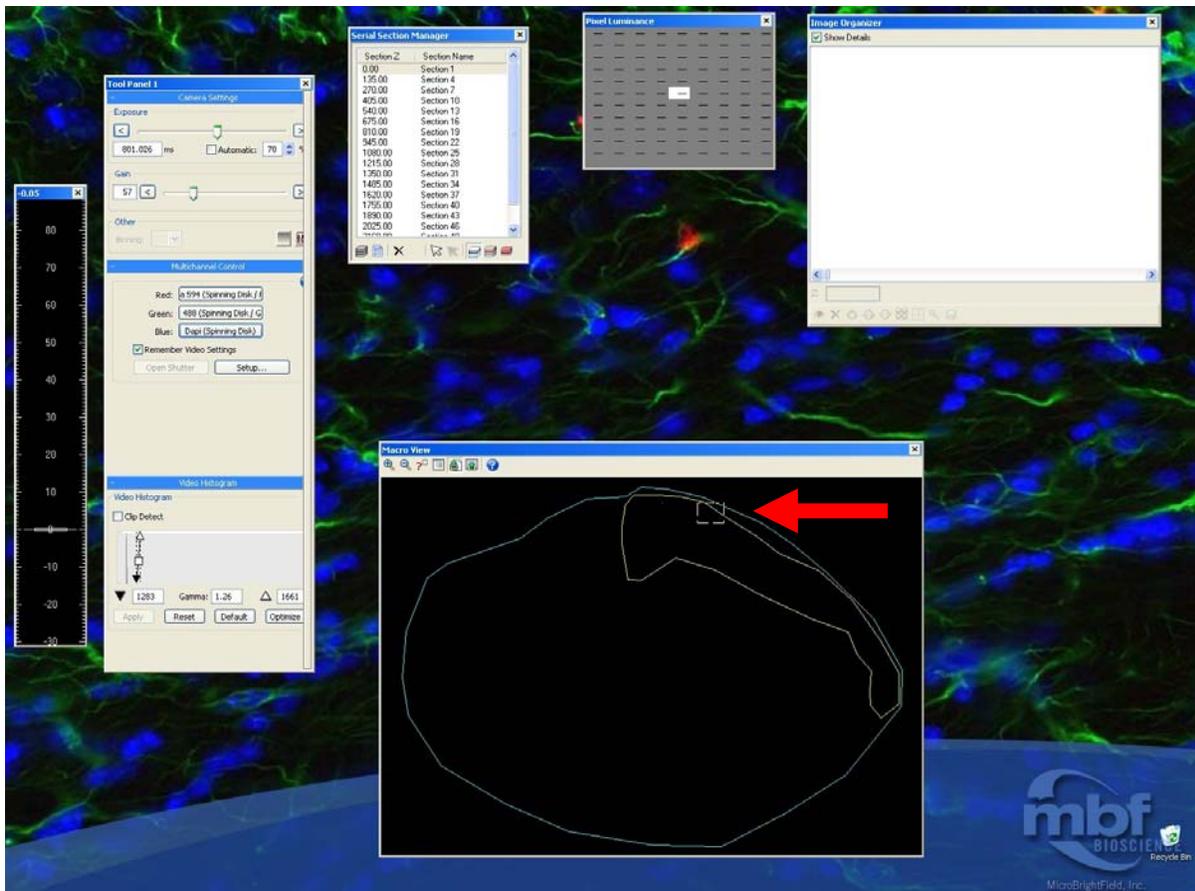
2 Seleccionar la región de interés que será sometida a conteo

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

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



Monitor 1



Monitor 2. En la ventana "MacroView" se muestra en un recuadro blanco la región que se está contando.

19. Para cada uno de los sitios de conteo, aparecerá una ventana como la que se muestra abajo. Esta herramienta le sirve al programa para determinar el grosor real del sitio que se pretende evaluar. Utilizando la perilla derecha del joystick (que controla al micrométrico de la platina motorizada) colocarse en el borde superior 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.



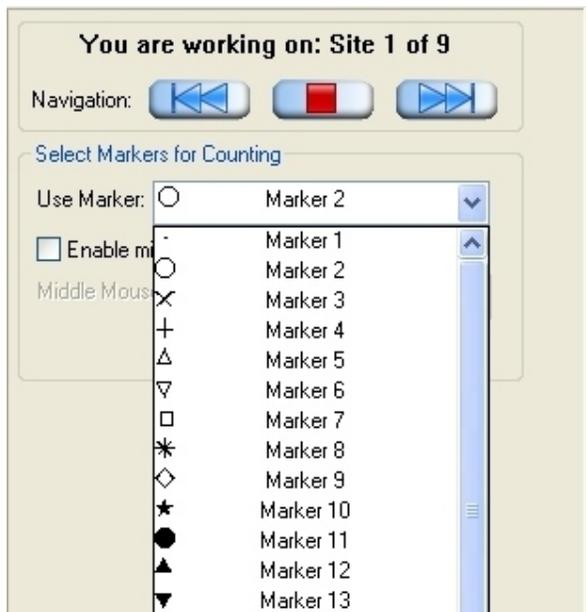
Una vez localizado el inicio del corte, dar click en “OK”

20. 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 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”. El microscopio volverá automáticamente al valor dado de inicio del corte.
Nota: Si el movimiento en Z excede el tamaño dado del disector óptico, los colores verde y rojo del cuadro de conteo se tornarán de color amarillo.



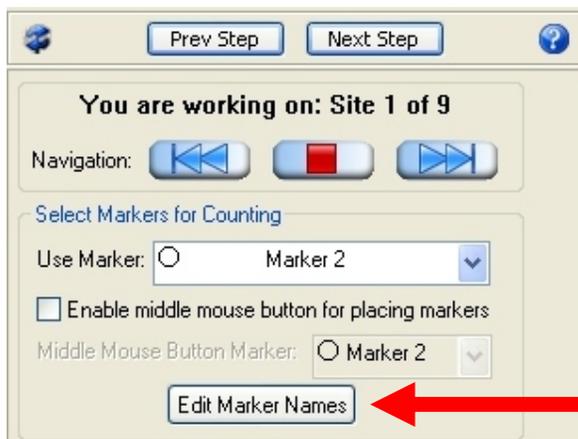
Una vez localizado el final del corte, dar click en “OK”

21. 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”.



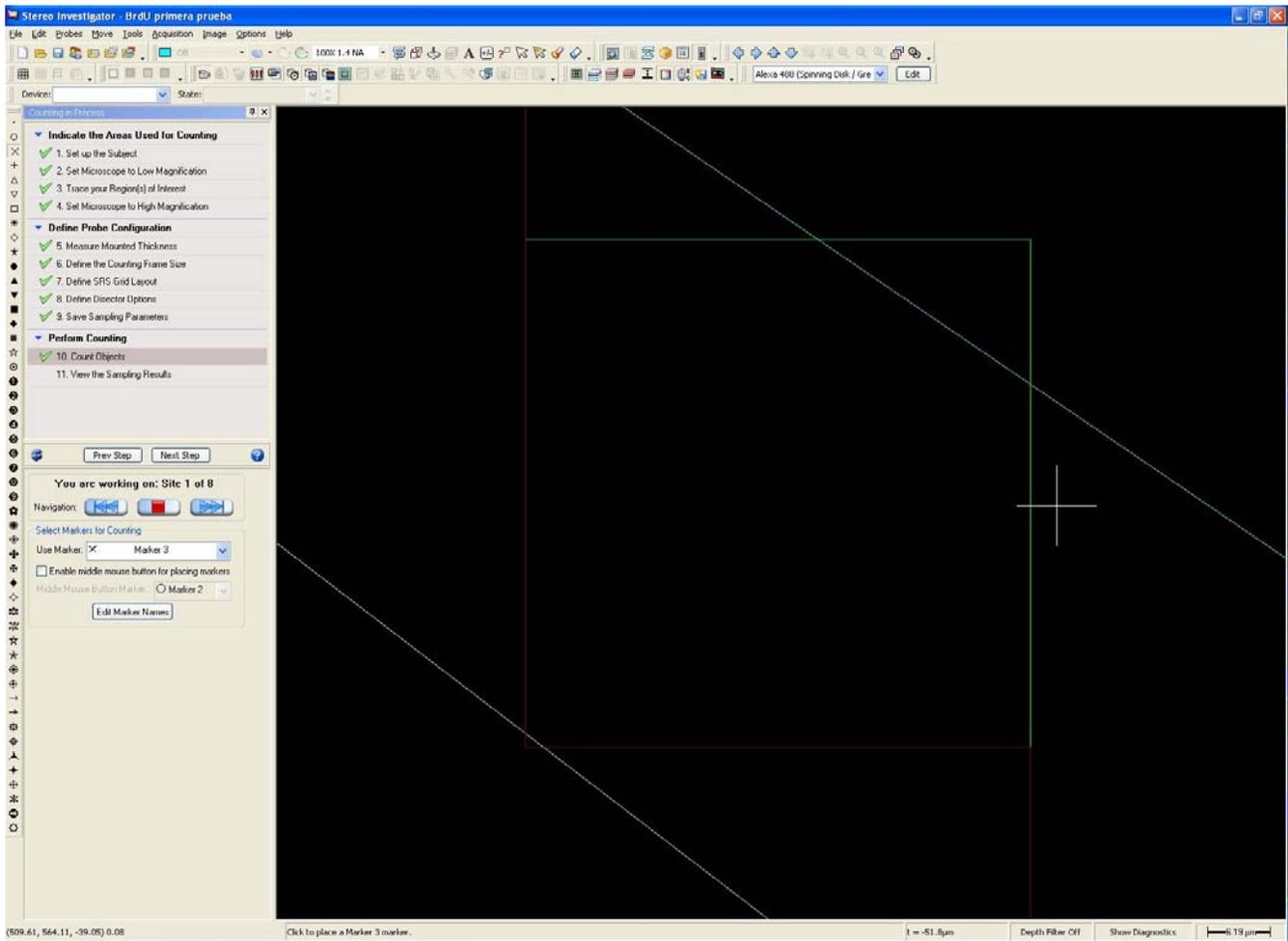
Seleccionar un marcador para cada uno de los tipos celulares de interés o colocaciones

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

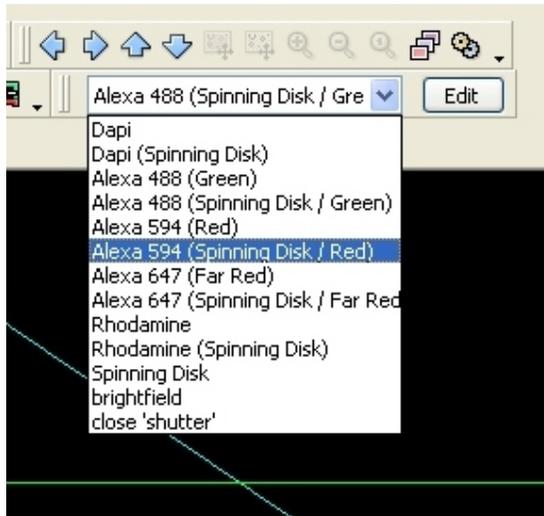


Click para cambiar nombre de marcador

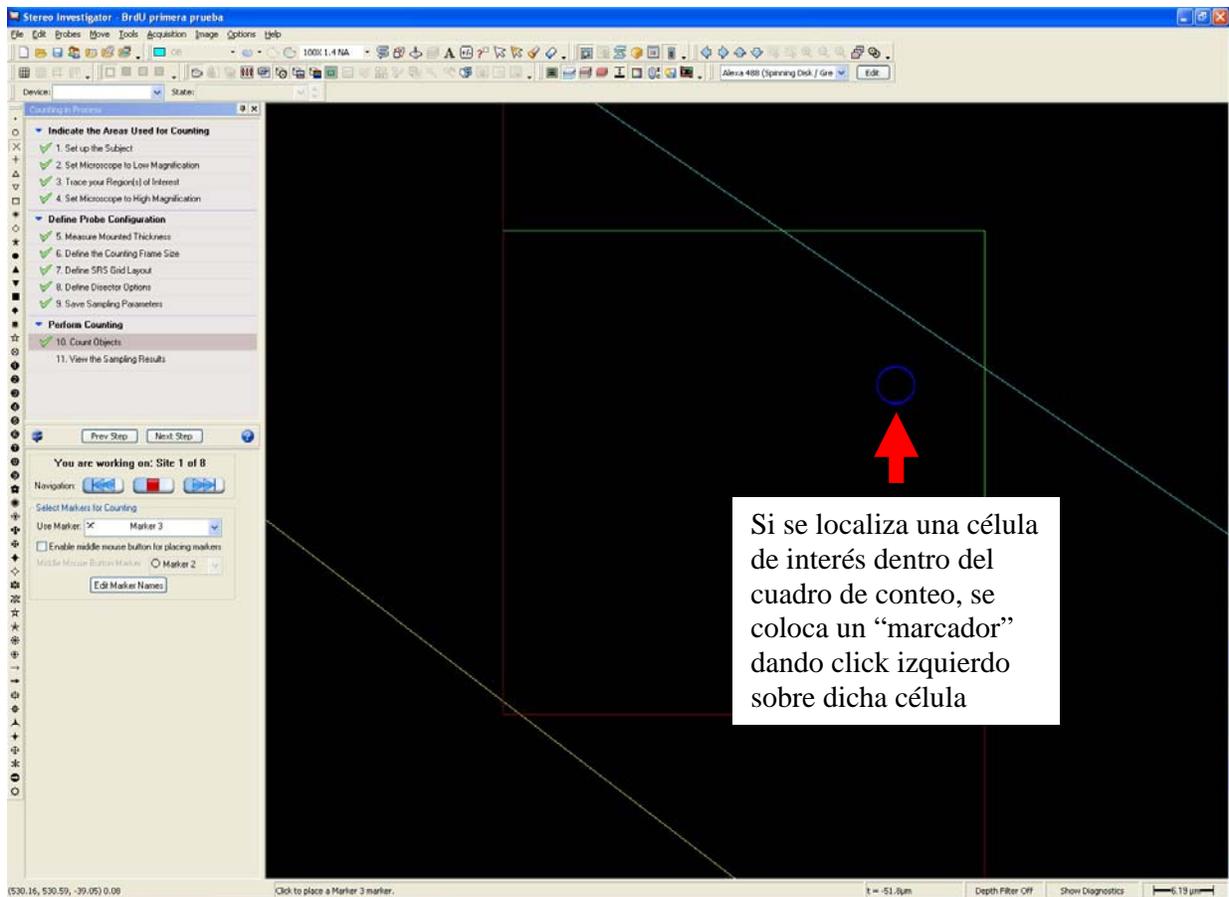
22. A continuación, comenzar a buscar por las células de interés dentro del cuadro de conteo:



Comenzar a buscar por las células de interés desde el inicio del corte hasta el final del mismo, utilizando el control del micrométrico 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 colocalización 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 “Device Command Sequence” como se muestra en la siguiente figura:



Los filtros pueden ser cambiados desde el “Device Command Manager” 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”.



Una vez escaneado completamente el sitio se procede con el siguiente:

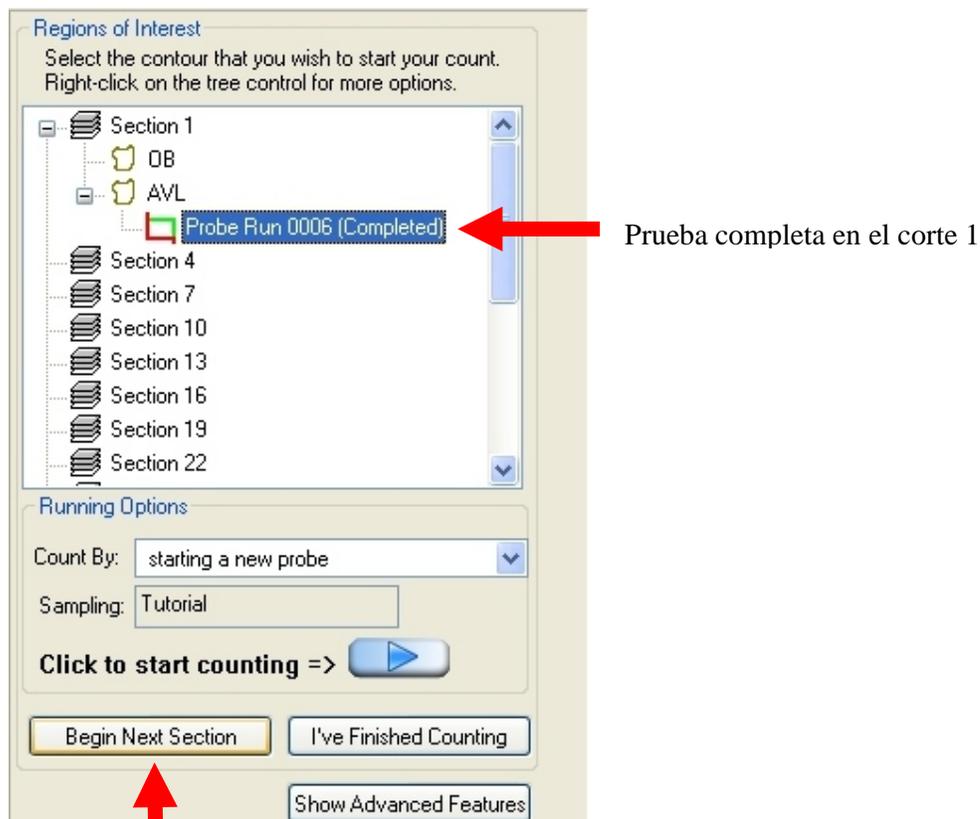


Se desplegará el siguiente sitio para realizar el conteo. Repetir el paso 22 hasta culminar todos los sitios para el corte en cuestión.

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



Cuando se dé 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 del conteo estereológico.

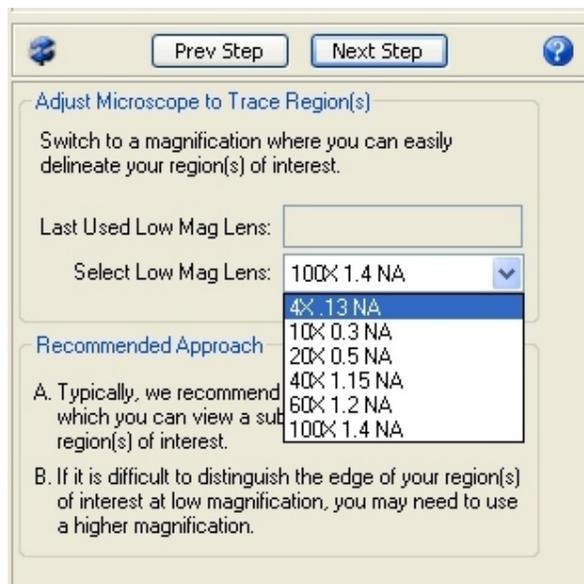


Dar click aquí para proceder al trazado del siguiente corte

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



Automáticamente el programa redirigirá al usuario al paso 2 del Workflow (paso 11 de la presente guía):

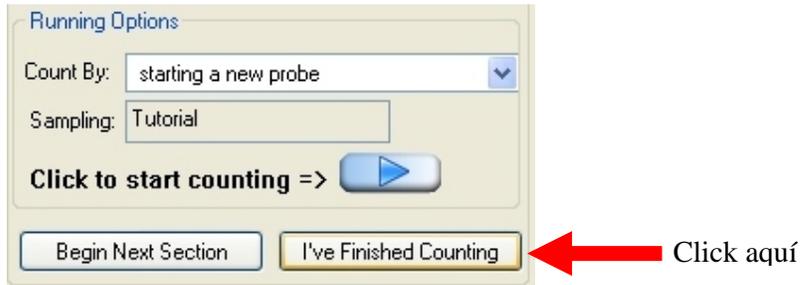


Repetir los pasos hasta completar los trazos y los conteos en todos los cortes seleccionados. Afortunadamente, los pasos 5, 6, 7, 8 y 9 del Workflow (pasos 14 al 18 de la presente guía) son omitidos en los cortes subsecuentes. Solo hay que tener cuidado de estar posicionados en la región de interés correcta y de seleccionar el archivo con los parámetros de muestreo correctos.

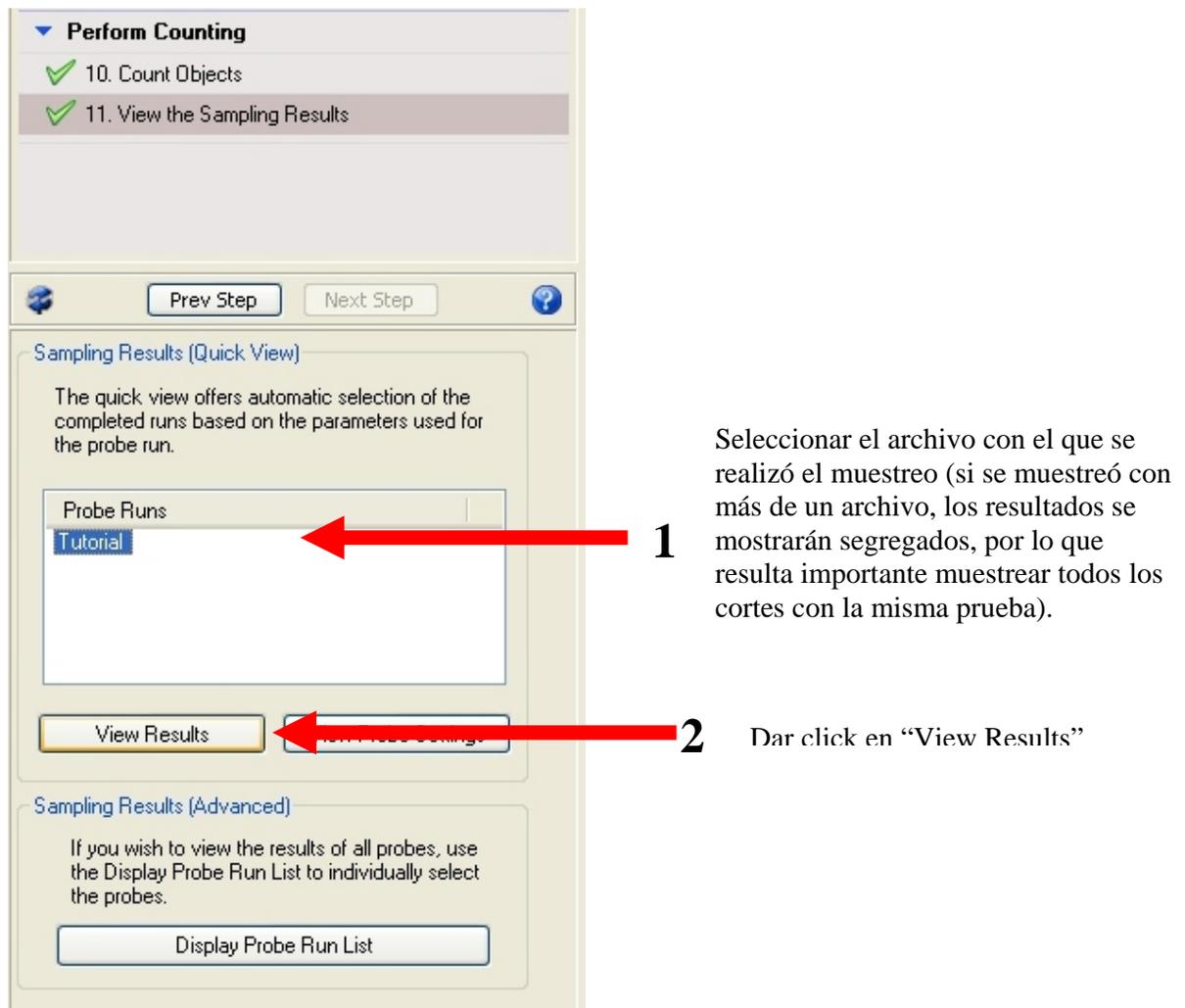


- 1 Revisar que el archivo que posee los parámetros de conteo previamente guardados sea el correcto.
- 2 Hacer click en el botón de "Play" para comenzar a contar

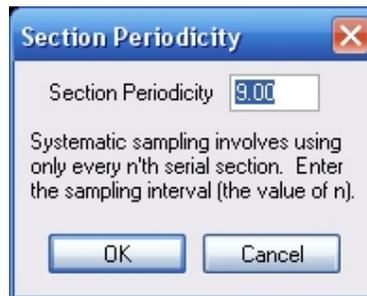
25. una vez concluidos los conteos de todos los cortes seleccionados de la muestra biológica de interés, dar click en “I’ve Finished Counting”



Aparecerá la ventana siguiente:

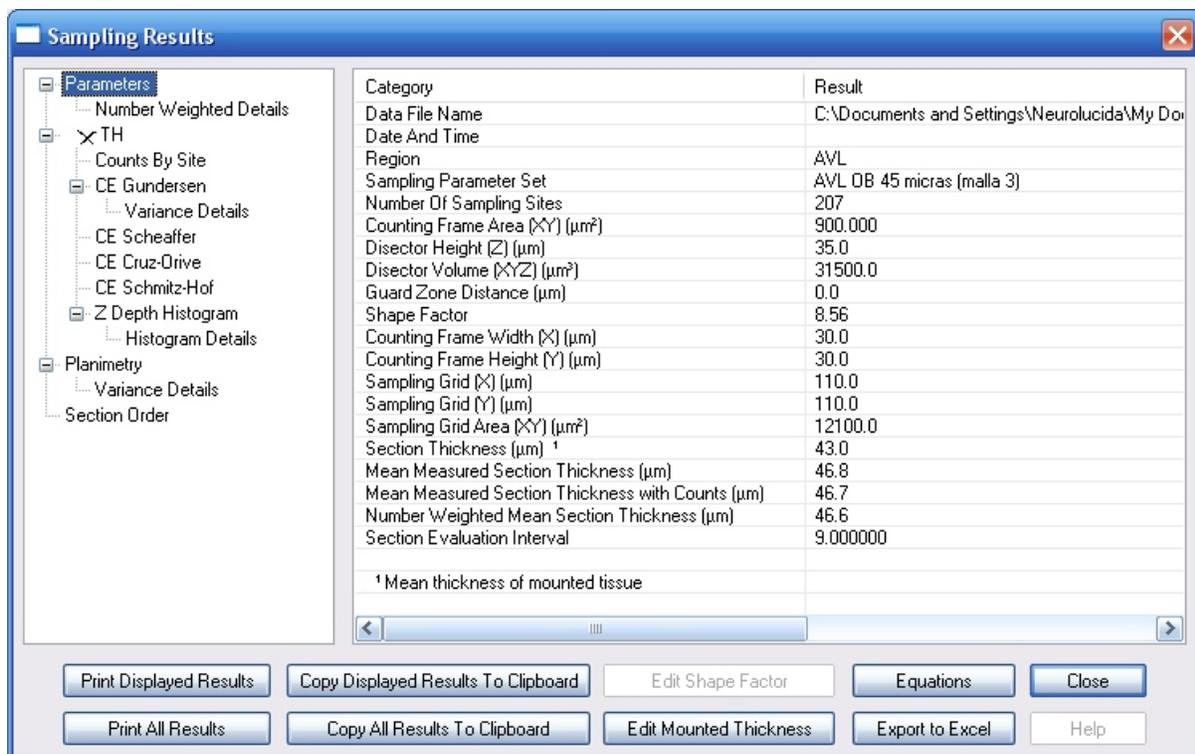


26. Aparecerá la ventana siguiente:



Dar click en “OK” si la periodicidad permaneció sin cambios a lo largo de todo el conteo (que es lo más usual).

27. Se desplegará una ventana de resultados como la siguiente:



En la pestaña “Parameters” se despliegan los parámetros generales con los cuales fue realizado el conteo estereológico.

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

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. Sin embargo, se requiere de un coeficiente de confianza para las estimaciones de número, el cual es desplegado en la pestaña de CE Gundersen:

Gundersen Category	Result
Variance Due To Noise	234.00
Variance of Systematic Random Sampling, m=0	506.75
Variance of Systematic Random Sampling, m=1	25.34
Total Variance, m=0	740.75
Total Variance, m=1	259.34
Coefficient of Error (Gundersen), m=0	0.12
Coefficient of Error (Gundersen), m=1	0.07

De acuerdo con la literatura, un coeficiente de Error (Gundersen) menor a 0.10 es indicativo de un conteo confiable. El software despliega dos coeficientes, uno de $m=0$ y otro de $m=1$. El coeficiente de confianza que normalmente se utiliza para estructuras biológicas es el de $m=1$.

Category	Result
Measured Volume (μm^3) ¹	781234000.
Total Area (μm^2)	1928970.
Section Cut Thickness (μm)	45.0
Height Per Section (μm) ¹	405.0
Area Section 4 (μm^2)	217766.
Area Section 13 (μm^2)	270171.
Area Section 22 (μm^2)	301210.
Area Section 31 (μm^2)	365280.
Area Section 40 (μm^2)	384486.
Area Section 49 (μm^2)	390059.
Variance of Systematic Random Sampling	16132669440.00
A	644546953216.0
B	540655452160.0
C	422572982272.0
Estimated Coefficient of Error	0.07
¹ Section cut thickness is also known as the block advance	

Finalmente, en la pestaña de “Planimetry” se despliegan estimados de área y volumen de la estructura completa. 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 medición de estos parámetros.