

Sistema de Microdissecção CellCut Plus

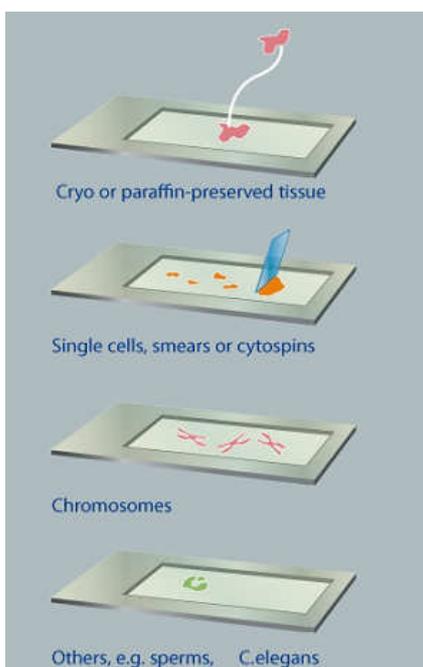


Treinamento para usuários Guia de orientação básico

***Kleber Campos
Especialista de Produtos
Olympus Optical do Brasil***

1. Princípios e funcionamento do mmi CellCut®

O mmi CellCut® é usado para isolar, sob visão microscópica, pequenas áreas ou células isoladas a partir de cortes histológicos para posterior análise microbiológica. DNA, RNA, bem como proteínas a partir de amostras puras podem ser investigadas. Nenhum contato mecânico é necessário para a microdissecção a laser das amostras.



Para preparação de amostras, seja qual for a origem, tecidos congelados, parafinados, esfregaços, cytopins, o mmi CellCut® utiliza a tecnologia

mmi Membrana Slides. Esta lâmina possui um suporte metálico revestido com uma membrana que é completamente inerte e sua autofluorescência é insignificante. Diferentes tipos de amostras podem ser preparadas nesta membrana e depois coberta com uma lâmina de vidro normal para proteção contra contaminações.

Através do software mmiCellCut, as regiões de interesse são selecionadas na tela, usando tanto o mouse para contornos livres ou pode-se utilizar as formas geométricas pré-definidas, como círculos, elipses, quadrados. Qualquer número de áreas em toda a lâmina pode ser identificado como regiões de interesse e os tamanhos das formas geométricas

podem ser alterados, ou copiados e colados.

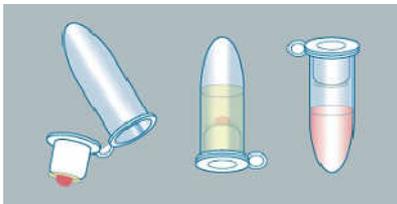


A função de agrupamento permite ao usuário coletar um número ilimitado de diferentes células ou áreas celulares dentro de um único processo de triagem em diferentes tubos de coleta (mmi IsolationCaps).

A espessura (0,3 µm em 100x) fina do feixe permite uma extração precisa das áreas selecionadas com excelente rapidez, sem afetar sua morfologia ou outras áreas de interesse,

negativamente. Como resultado, não há perda de qualidade do material que será usado em etapas subsequentes. Mesmo a viabilidade de células vivas não é afetada e, portanto uma vez selecionadas, células podem ser recultivadas.

Várias áreas de interesse podem ser microdissecadas em uma operação automatizada e coletadas no mmi IsolationCap®. Um único mmi IsolationCap® pode ser usado para coletar várias dissecções, mesmo de lâminas diferentes (até 3 lâminas).

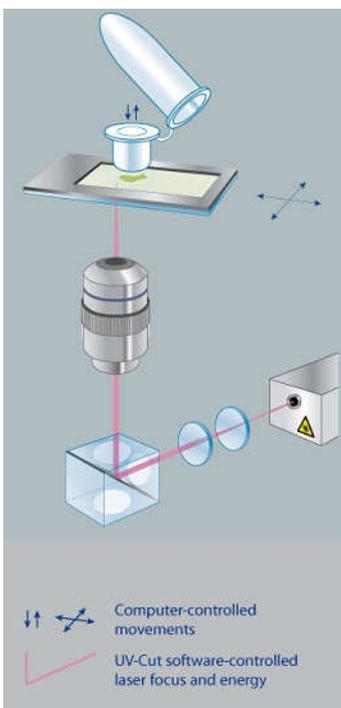


O mmi IsolationCap® usado com a tecnologia mmi Caplift®, permite a coleta de várias áreas de toda a lâmina.

Após a microdissecção, os mmi IsolationCaps® são encaixados em

tubos de microcentrifugação para proceder com a extração de biomoléculas. Após aplicar os reagentes recomendados para extração pelo tempo necessário, os cortes extraídos estão prontos para análises genômicas ou proteômicas.

1.2 Configuração do Sistema



O Sistema mmi CellCut® é composto de um microscópio biológico Olympus de alta performance com platina motorizada, controlada eletronicamente, laser em estado sólido, feixe do laser de acordo com os requisitos. Computador com Sistema Operacional Windows e um sofisticado software de controle mmi CellTools®.

Todas as características comuns do microscópio estão disponíveis. O software mmi CellTools® controla o laser, a captura de imagem e as ações de escaneamento da platina, sem bloquear qualquer outra ação do microscópio.

2. Manuseando as amostras

2.1 Usando o mmi IsolationCap® para uma coleta simples

A microdissecção para isolamento de células só é útil quando você consegue remover as áreas de interesse do tecido e da própria lâmina. A coleta de fase única torna simples o corte de uma ou várias áreas de interesse, além de ser livre de contaminação.

Esta coleta utiliza uma membrana protetora e um tubo de reação com uma tampa aderente especial.

O propósito da membrana protetora é:

- Evitar contaminação da amostra
- Facilitar a remoção e coleta da área cortada.



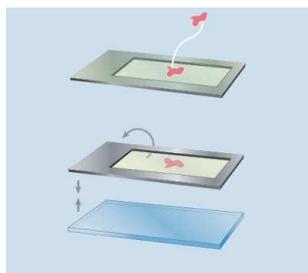
O feixe do laser passa através da objetiva na parte inferior da platina, cortando o tecido e a membrana. O tecido e a membrana são coletados na tampa do tubo de reação. O corte é feito em torno das células selecionadas. Para a etapa de coleta, nenhuma radiação adicional é usada.

Tanto a membrana quanto a tampa adesiva são quimicamente inertes e não tem influência nos processos seguintes de biologia molecular.

A membrana é transparente, constituída de PET (Politereftalato de etileno) e não interfere no feixe de luz.

A tampa do tubo de reação também contém um difusor inserido. O difusor melhora a qualidade da imagem notavelmente e pode ser colocado diretamente no topo do tecido e da membrana durante todas as operações.

2.2 Preparação das lâminas



A coleta de amostras de microdissecção laser requer lâminas especiais. As lâminas são fornecidas com uma membrana transparente PET com espessura de 1.4 µm.

O tecido é montado no lado plano da membrana, da mesma maneira que é feito em lâminas de vidro comuns.

Após o processo rotineiro, a membrana com o tecido é invertida

e colocada contra uma lâmina de vidro e fixada no microscópio para realizar a microdissecção.

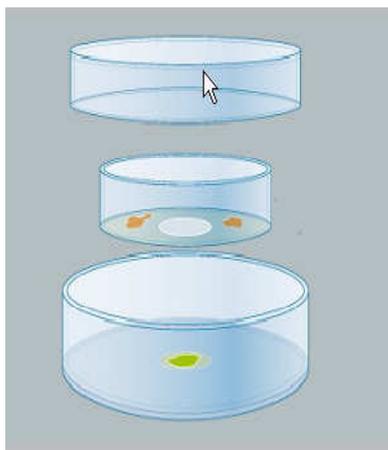
2.3 Preparação de células vivas

O mmi CellCut permite a microdissecção em células vivas padrão, utilizando o CellChamber®, que consiste em um anel de aço inox com uma membrana no fundo, na qual as células vivas podem ser cultivadas.



Antes da microdissecção, o mmi CellChamber é colocado em uma placa de petri, revestida com um adesivo no fundo e levada ao microscópio para realizar a microdissecção.

Áreas de interesse podem ser positivamente ou negativamente selecionadas pelo laser sem qualquer necessidade de abrir a placa de petri ou drenar o meio de crescimento. O laser corta, rápido e precisamente, somente a membrana para permitir fácil separação das células vivas selecionadas.



Depois de dissecado, o CellChamber® é removido da placa de petri, sob condições assépticas totais, deixando as células selecionadas no fundo da placa, as quais podem ser utilizadas para nova cultura.

O CellChamber® pode ser descartado, ou se colocado em uma nova placa de Petri, pode ser usado muitas vezes para isolar diferentes células da mesma cultura, se for necessário.

Durante este processo, as células podem permanecer em seu meio de cultura sem que a energia do laser as afetem. Este fluxo de trabalho minimiza o risco de perda de viabilidade, tanto pelo estresse gerado pela

luz do laser ou pelas condições ambientais.

3. Visão geral das funções do mmi CellCut®

O software CellTools® em conjunto com o mmi CellCut® plug-in fornece todos os controles necessários para:

- Exibir imagens ao vivo da amostra atual no microscópio
- Salvar imagens
- Platina motorizada x-y
- Ajustes do laser: velocidade, potência e foco
- Salvar configurações preferenciais da câmera
- Manipulação automática do caplift
- Manipulação automática dos opcionais Multicap e Multislide
- Manuseio opcional de motorização de microscópios

Isto resulta em um fácil e amigável método para:

- Escanear amostras
- Documentar amostras
- Marcar o caminho do laser para cortar em torno das células
- Marcar várias áreas para serem cortadas em uma única operação
- Marcar e salvar áreas (para cortes posteriores)
- Dissecar automaticamente as áreas marcadas
- Coletar as amostras sem radiação ou risco de contaminação dos materiais isolados.

A operação de todos os módulos é facilmente controlada pelo software mmi CellTools. A aplicação principal é responsável por exibir as imagens no vídeo, salvar a imagem, ajustar os controles da câmera e controlar os movimentos básicos da platina (XY).

3.1 – Guia Rápido

3.1.2 – Ligando o Sistema

Para ligar o sistema mmiCellCut®, siga os passos abaixo:

- ✓ **Ligar o PC e esperar até que apareça a área de trabalho do Windows.**
- ✓ **Ligar a fonte de luz branca do microscópio**
- ✓ **Ligar o controlador do laser com a chave. O LED amarelo acenderá**
- ✓ **Iniciar o software mmi CellTools® e aguardar até que o software realize o processo de inicialização e testes internos.**
- ✓ **Ligar o laser, pressionando o botão da caixa controladora. O LED verde acenderá.**

Laser controller					Status laser
Key switch	Pushbut-ton	Interlock	LED 1	LED 2	
Off	Off / On	unlocked	Off	Off	Off
On	On	locked	Yellow	Green	On
On	Off	locked	Yellow	Off	Stand by
On	On	unlocked	Red	Green	Stand by
On	Off	unlocked	Red	Off	Off

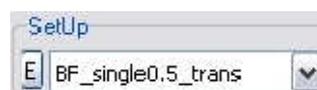


3.2.2 – Preparação do Sistema

Quando iniciar o software pela primeira vez, comece com a definição de um novo ajuste (“New Setup”).

Por ser mais simples, chamaremos o primeiro setup de “Default”. Neste ajuste serão gravados:

- ➔ Potência do laser
- ➔ Foco do laser
- ➔ Posição do laser

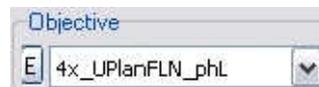


- Calibração da platina XY
- Ajustes de câmera para cada objetiva.

Para acessar o “setup Explorer”, clique em “E” do lado esquerdo da lista de “Setup”.

Para cada objetiva que você definir, siga os procedimentos para:

- Posição do laser
- Foco do laser
- Potência do laser
- Calibração de objetiva
- Configuração da câmera.



3.2.3 – Manuseando uma nova lâmina

Prepare sua amostra de acordo com o que está descrito no Capítulo 7 do manual do usuário.

Defina um “New Slide” usando o item de menu:

File -> New Slide ou clique no botão  localizado do lado esquerdo a lista de lâminas.

O editor de lâminas abrirá e você poderá adicionar uma nova lâmina pressionando to “+”. Toda a documentação será gravada em uma pasta com o mesmo nome que você deu para a nova lâmina.

Defina os limites da área de trabalho da sua lâmina, movendo a mesma para o canto superior esquerdo até que você consiga obter a visão do canto sombreado (“frame”)

com a membrana e pressione o ícone  **Limit1** e depois mova para o canto inferior direito da lâmina até obter a visão do canto sombreado (“frame”) com a membrana e

pressione o ícone  **Limit2**.

Use a objetiva de menor aumento (padrão é 4x). Clique no botão  e o software criará uma imagem panorâmica da lâmina. Para navegar pela lâmina, clique duas vezes na área desejada ou arrastar o retângulo piscante para a posição desejada. Também pode ser usada as setas direcionais do teclado para mover a platina.

Mova o “Caplift” para baixo clicando no botão  ou use a tecla de atalho **F2**. Após abaixar o “Caplift” você deve ajustar o foco fino conforme a necessidade.

Qualquer botão na barra de ferramentas pode ser ativado com um clique do mouse.

Por exemplo, a ferramenta de desenho a mão livre , permite que você desenhe uma linha em torno do objeto a ser cortado.

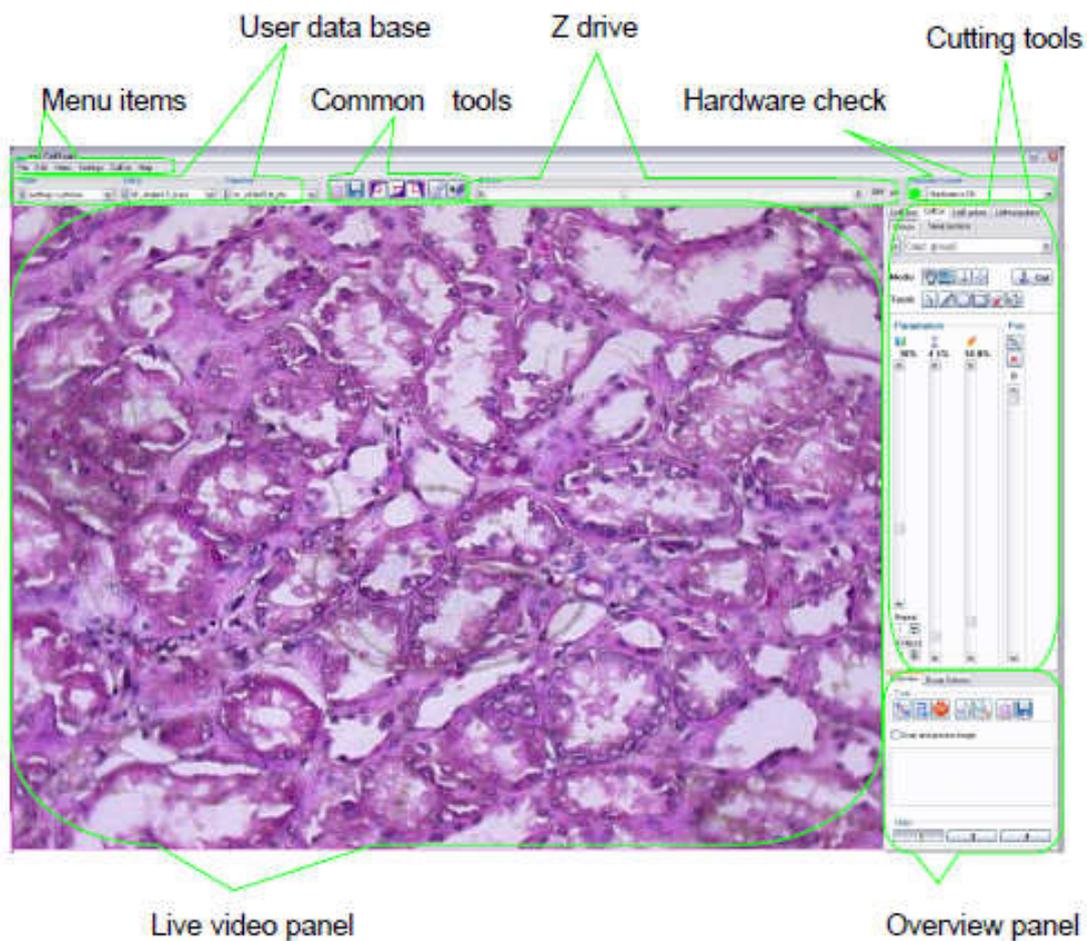
Pressione o botão “Cut”  para cortar o objeto selecionado. Levante o “Capholder”, clicando no botão  para coletar a amostra cortada.

Remova o tubo e proceda com a aplicação.

3.2.4 Desligando o sistema.

- ✓ Fechar o Software CellTools usando o comando “Exit” no menu <File>
- ✓ Desligue o controle do laser pressionando o botão para desligar o laser e girando a chave para a posição OFF (posição vertical) para desligar os controles eletrônicos.
- ✓ Desligue o PC usando os comandos normais do Windows.

3.3 – mmi CellTools – Tela Principal.



O software fornece uma painel para visualização ao vivo do campo de visão atual do microscópio. Funções de digitalização estão disponíveis no painel “Overview” na parte inferior direita da janela do software.

Na barra superior, o programa permite acessar o banco de dados específico do usuário. Este banco de dados permite administrar e salvar todos os parâmetros definidos pelo usuário.

Todos os itens de menu podem ser acessados por teclas de função.

O item “Hardware check” mostra se o sistema está funcionando corretamente. (“Hardware self monitoring”).

3.3.2 Banco de dados de usuário específico.

Todas as configurações salvas no software mmi CellTools são únicas, isto é, pertencem ao usuário atual, que acessou (“logou”) o Microsoft Windows®. O mmi CellTools suporta totalmente o gerenciamento de usuários do Microsoft Windows®. Durante a inicialização o programa carrega as últimas configurações salvas pelo usuário ativo.

Portanto, cada usuário cadastrado no Windows manipula somente seu próprio banco de dados. Alterações de um determinado usuário não serão visíveis por outros usuários.

O banco de dados “default” sempre estará salvo separadamente. Este banco de dados “default” é específico para o seu sistema e será configurado e gerenciado somente durante a instalação ou serviços de manutenção do sistema

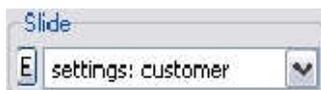
Se um banco de dados de um determinado usuário falhar, o usuário pode recuperar o arquivo “default” com o procedimento seguinte:

- Feche o mmi CellTools®
- Delete a pasta de seu computador conforme segue:
c:\Documents and settings\“Username”\Application Data\MMImCUTDatabase
- Abra o mmi CellTools®

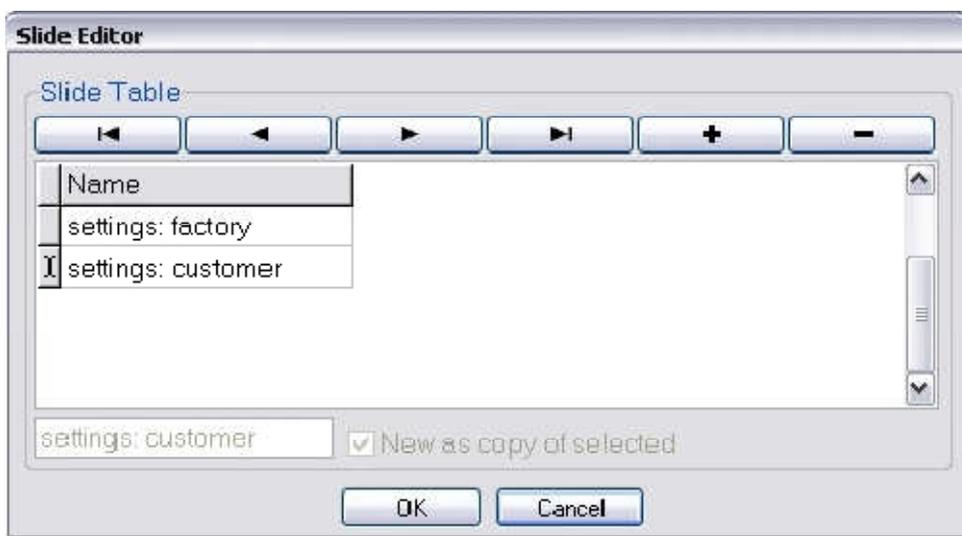
Agora o arquivo “default” será automaticamente restaurado e diretamente visível no software mmi CellTools®.

O usuário pode salvar todos os parâmetros para cada experimento (lâmina), separadamente. Se o usuário alterar as parâmetros para o experimento atual, os parâmetros dos experimentos recentes ainda estarão salvos e acessíveis.

3.3.3 “Slide editor”



Na caixa de seleção “Slide” você encontrará todas as amostras que você definiu no passado. Toda a documentação é salva sob este nome. Para alterar o banco de dados pressione o botão **E** e terá a tela do editor de “Slide”.



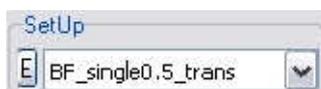
O botão “+” define um novo “slide”, todos os parâmetros do “slide” ativo serão copiados. Renomeie o “slide” clicando sobre o nome.

O botão “-” Remove o “slide” ativo.

Utilize a barra abaixo para navegar pelos “Slides”



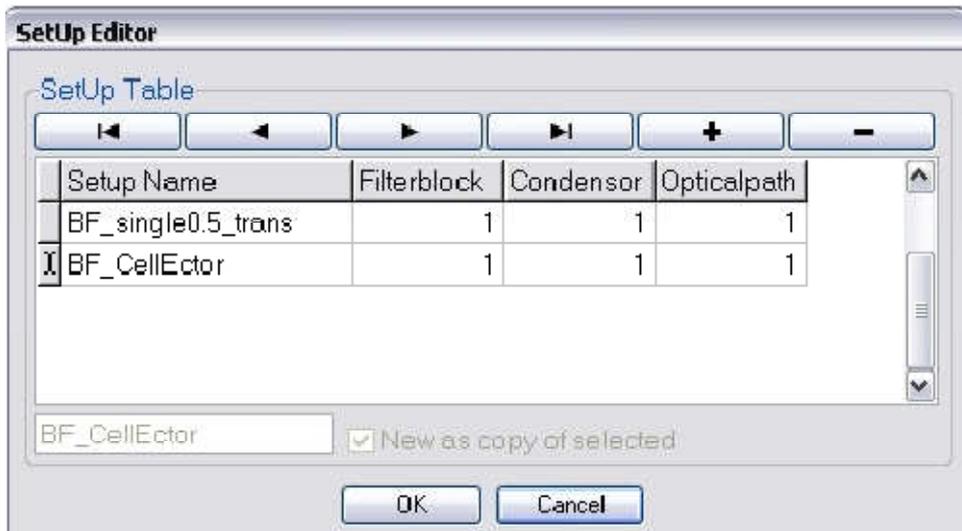
3.3.4 – “Setup Editor”



O “Setup” representa todos os parâmetros necessários para definir o método de iluminação (campo claro, fluorescência, DIC...). Se você alterar um parâmetro em um “Setup”, as alterações somente serão refletidas no “slide” atual.

Na caixa de seleção do setup, você encontrará todos os parâmetros definidos para o “slide” ativo. Para adicionar/remover ou alterar o banco de dados pressione o botão “E”. Para usar este Editor, siga os mesmos passos do “Slide Editor” descrito acima. Se você criar um novo “slide” todas as configurações serão automaticamente copiadas do slide ativo.

Se você executa diferentes tipos de experimentos, por exemplo, microdissecção com campo claro, microdissecção com fluorescência, ou pinças, recomenda-se definir uma configuração para cada um destes experimentos.



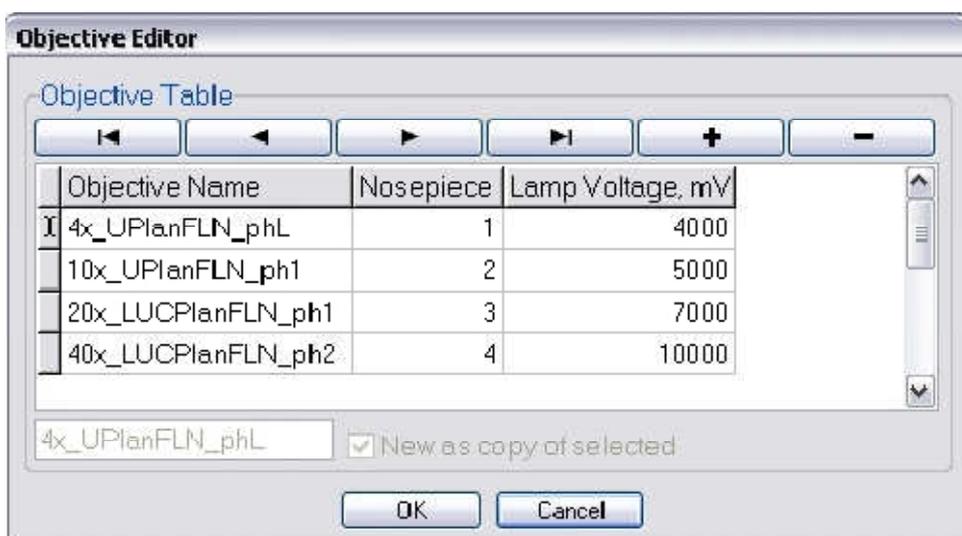
Para renomear as configurações definidas clique no “Setup name” e digite um nome diferente.

As configurações **“Filterblock, Condenser e Opticalpath”** somente são usadas com microscópios motorizados.



3.3.5 – “Objective Editor”

A caixa de seleção “Objective” você encontra todas as objetivas que você definiu para a configuração ativa. Para alterar o banco de dados pressione o botão “E” para abrir o “Objective Editor”. Para usar este editor, siga o método do “Slide Editor” descrito acima. Se você criar uma nova configuração todas as objetivas serão automaticamente copiadas a partir do “slide” ativo.



Para renomear a objetiva definida clique sobre “Objective Name” e digite um nome diferente.

As opções **Nosepiece** e **Lamp Voltage** somente são utilizadas em microscópios motorizadas.

Além dos parâmetros mostrados na tela “Objective Editor”, as seguintes informações são armazenadas separadamente para cada objetiva:

- Configuração de câmera
- Calibração da Objetiva em relação ao platina
- “Lens Offset Calibration”
- Foco-Z somente para microscópio motorizado
- Parâmetros de corte
- Posição do laser

Se algum destes parâmetros não estiver correto, consulte o capítulo relacionado.

“Objectives” representa todas as configurações e calibrações relacionadas às objetivas. Se você alterar a calibração ou parâmetros relacionados à objetiva, essa alteração somente serão refletidas nas configurações do “setup” e “slide” atual.

3.3.6 Configurações da câmera

Use o botão  CameraRC ou o item de menu

Settings->Camera->Remote Control

para abrir a janela de configuração da câmera. Os valores máximos e mínimos são específicos para cada tipo de câmera. Os controles deslizantes serão automaticamente ajustados para as faixas suportadas por sua câmera.

“Auto Brightness” – o brilho pode ser ajustado automaticamente pressionando o botão “Auto”. O controle deslizante “Auto” permite definir o brilho necessário. Quando a imagem muda o modo “Auto” irá ajustar automaticamente o brilho.

O ajuste de brilho também pode ser feito manualmente clicando no botão “Manual”. Neste caso o usuário seleciona o tempo de exposição e o “gain” através dos controles correspondentes. Primeiro ajusta-se o brilho alterando o tempo de exposição. O ajuste de “gain” só é necessário para imagens escuras, quando tempos de exposição longos não são aceitáveis. O “Gain” sempre causa ruídos na imagem.

Para tempos de exposição de mais de 20ms será reduzido o número de quadros por segundo. (FPS).

O valor padrão de Gamma é de 0.75 e deve ser ajustado sobre uma faixa de 0.2 a 2.0 para modificar a escala de cinza da imagem.

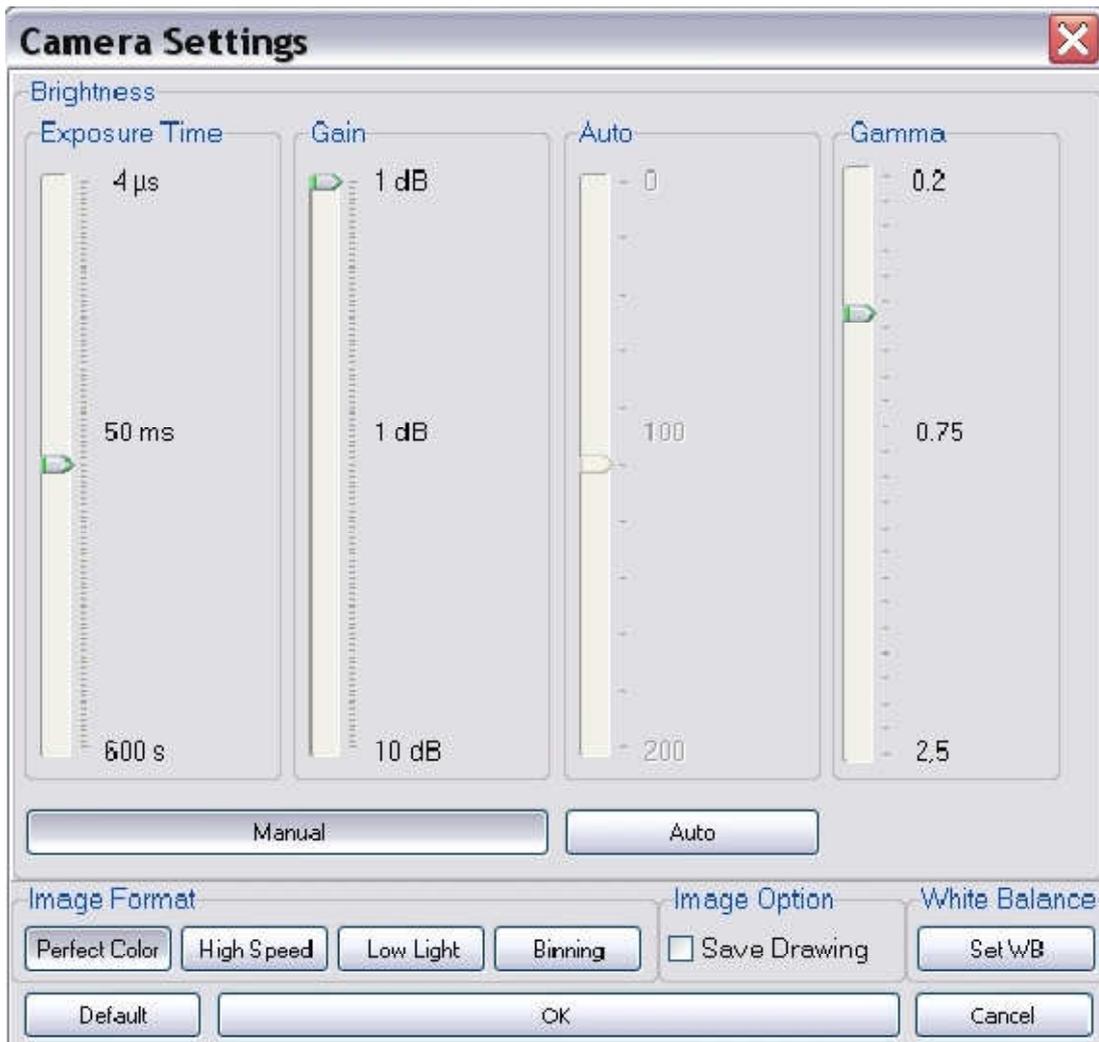
Marque “Saving drawings” para salvar a imagem da tela. Essa imagem conterá todos os desenhos e marcadores. Salve esta imagem com extensão .BMP ou .TIF para obter melhor qualidade.

“**White Balance**” – **WB** – Clique em set WB para obter um melhor Branco de branco . Para melhores resultados, selecione uma are vazia da lâmina. A imagem deve aparecer com brilho razoável. Se estiver muito ou pouco brilhante o White balance falhou. Não use o “Set WB” em imagens fluorescentes.

Para microscópios manuais, somente uma configuração de White Balance será salva. Quando você altera o White balance, o efeito é visível para todas as objetivas.

Em configurações de microscópios automáticos os ajustes de White balance são salvos separadamente para cada objetiva.

O botão “Default” redefinirá os controles deslizantes para a posição padrão.



Perfect Color: para aplicações de campo claro, otimiza a qualidade das cores.

High Speed: Maximiza a faixa de quadros por segundo. Neste modo, até 15 fps com resolução total de pixels serão mostradas.

Low Light: Para aplicações fluorescentes, o contraste pode ser otimizado com esta opção. É utilizado em combinação com ajustes de Gamma e Gain.

“**Binning**” - 2x2 pixels serão usados para obter imagens mais claras mas com menor resolução. Usado em combinação com Gamma entre 1 e 2.

3.3.7 – “Freeze vídeo / live vídeo”

Em aplicações fluorescentes faz sentido “congelar” o vídeo quando você adquiriu uma boa imagem. Após congelar o vídeo você pode fechar o “shutter” da fluorescência e desenhar e cortar sobre a imagem congelada sem que submeta sua amostra fluorescência a um “photo bleaching”.

Para congelar o vídeo use o item de menu

Video-> Video freeze

Para retornar ao modo “live vídeo”

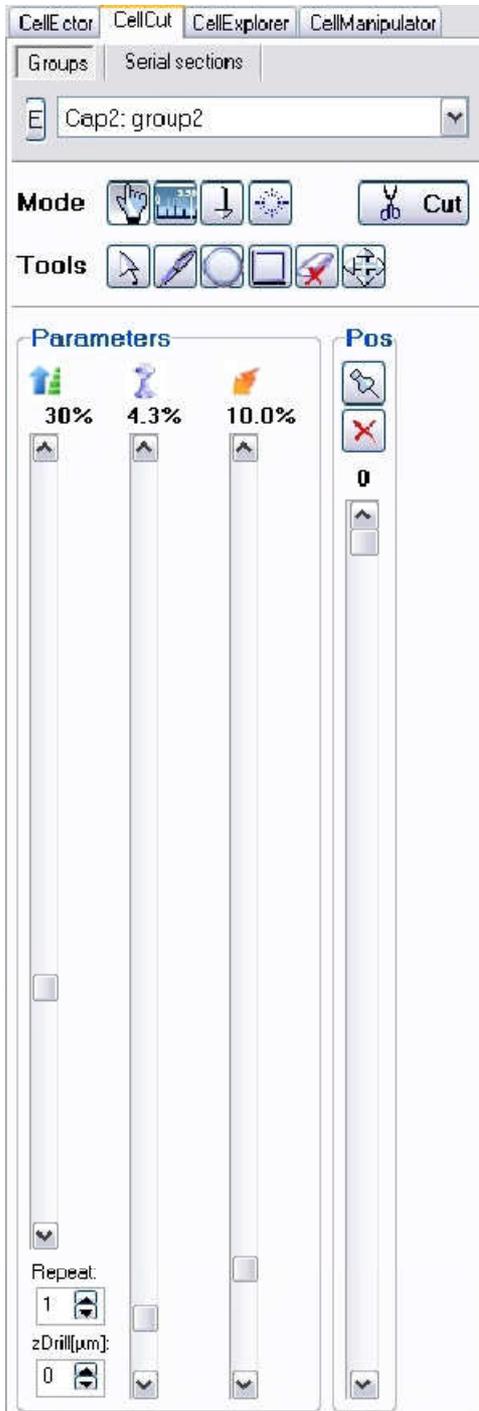
Video->Video live

Estas opções podem ser acionadas pressionando o botão direito do mouse sobre o painel do vídeo.

Outras opções de vídeo como gravar vídeo, estão disponíveis. Consulte o manual do usuário.

4. mmi CellTools® - Plug-in CellCut®

O software mmi CellTools® possui vários plug-ins, instalados de acordo com o produto ou módulo adquirido (CellCut; CellEctor; CellExplorer; CellManipulator.). Para utilizar as funções de microdissecção, clique na aba “CellCut”.



Para utilizar os plug-ins instalados, clique nas respectivas abas.

4.1 Desenhando o contorno dos cortes

4.1.1 – Princípios



Você pode desenhar usando o mouse do seu computador. Ou usar a caneta digital para desenhar diretamente no monitor, caso seu sistema possua este recurso.

O laser corta ao longo do contorno desenhado em torno da área de interesse.

As seguintes calibrações devem ser feitas corretamente antes de iniciar os cortes:

1. Alinhamento da câmera (Manual, seção 8.3.11)
2. Calibração da objetiva (Manual, seção 8.3.11.2)
3. Velocidade do corte (Manual, seção 8.4.2.3)
4. Foco do laser (Manual, seção 8.4.2.4)
5. Potência do laser (Manual, seção 8.4.2.5)
6. Posição do laser (Manual, seção 8.4.8.1)

Após desenhar os contornos das formas, você só precisa clicar no botão “**CUT**” e o sistema cortará todos os contornos definidos.

4.1.2 – Modos de desenho

Para cada modo de desenho existe um botão no painel de ferramentas.



Escolha uma das opções de desenho, conforme segue:

- Ferramenta de seleção 
- Desenho a mão-livre 
- Círculo ou elipse 
- Retângulo ou linhas 
- Ferramenta para apagar o desenho 
- Ferramenta para mover o desenho 

Estas ferramentas podem ser ativadas clicando sobre os respectivos botões ou através do menu de contexto, colocando o ponteiro do mouse sobre a imagem e clicando no botão direito.

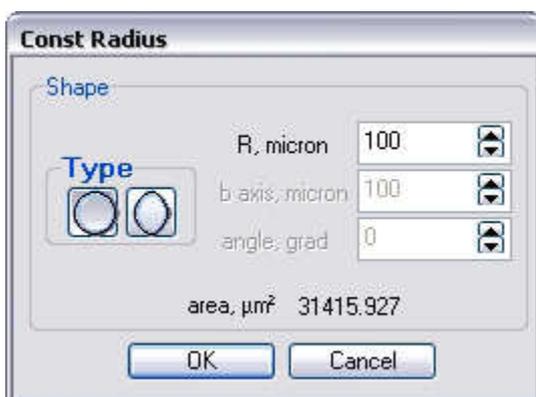
Para trocar rapidamente entre a ferramenta selecionada e o movimento da platina utilize a barra de espaço do teclado.

Após desenhar um contorno com a ferramenta “Mão-livre”  , por padrão, o software fecha o contorno. Para desligar esta opção selecione o item de menu:

CellCut -> Draw and Cut ->AutoEnclose Shape

4.1.2.1 Círculos e Elípses

Clique com o botão direito sobre o botão Círculo ou elipse para acionar a janela de configuração destas formas.



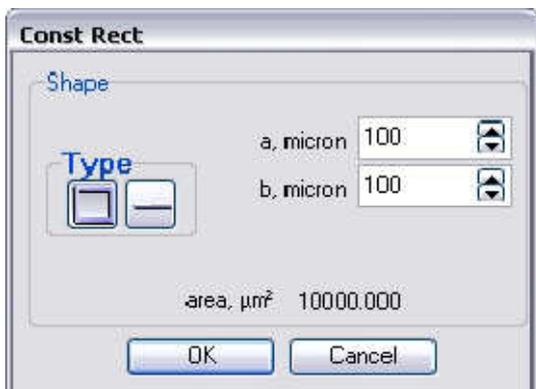
Você pode desenhar um círculo ou uma elipse e também pode definir as dimensões das formas, digitando o valor nos campos correspondentes.

Após desenhar as formas, pressione ESC ou clique com o botão direito sobre o botão

Círculo/Elipse 

4.1.2.2 – Retângulos e linhas

Clique com o botão direito sobre o botão Retângulo ou Linha para acionar a janela de configuração destas formas.



Você pode desenhar um retângulo ou uma linha e também pode definir as dimensões das formas, digitando o valor nos campos correspondentes.

Após desenhar as formas, pressione ESC ou clique com o botão direito sobre o botão

Retângulo/Linha

4.1.2.3 – Deletando contornos

Com a ferramenta de deleção você pode clicar sobre uma forma, que ela será apagada automaticamente.

Também é possível utilizar o menu de contexto, clicando com o botão direito sobre o painel de vídeo, onde aparecerão as opções abaixo:



4.1.2.4 – Mover os contornos

Utilize a ferramenta para mover os contornos e as formas para a posição correta. É muito útil quando desenhamos uma elipse, um quadrado, etc e precisamos ajustar sua posição.

4.1.2.5 – Copiar e colar contornos

Para copiar e colar contornos, marque a forma ou contorno desejado e pressione **CTRL + C** para copiar e **CTRL+ V** para colar em outra região.

4.2 – Cortes

4.2.1 – Laser – tiro simples

Utilizando o botão , você pode executar tiros simples com laser por tempo determinado. Clique com o botão direito do mouse sobre o botão  para alterar as configurações do tempo do pulso do laser conforme desejar.

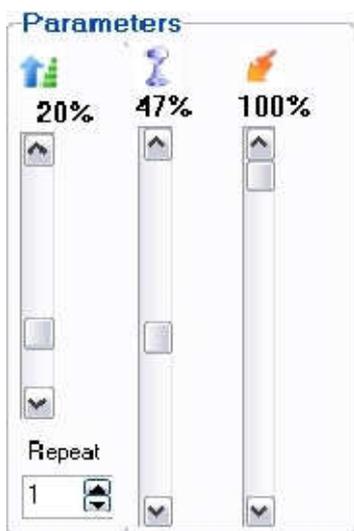
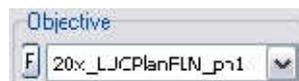


A faixa típica é de 50 – 100 mseg.

4.2.2 – Princípios

O corte automático ao longo dos contornos torna seu trabalho mais fácil e rápido. Você pode escolher se quer cortar uma área ou um grupo de áreas.

Para a maioria das aplicações os melhores resultados são observados com as objetivas de 20x e 40x. O usuário deve selecionar a objetiva apropriada na caixa de seleção de objetivas.



As configurações do laser incluem os seguintes parâmetros:

- **Speed** (Velocidade de movimento da platina)
- **Focus** (Foco do laser)
- **Power** (Potência do laser)

É essencial configurar estes parâmetros para cada objetiva e tipo de tecido.

Veja os detalhes de configuração no manual do usuário, seção 8.4.2.6

Após ajustar as configurações proceda com os cortes desejados. Os cortes somente serão iniciados quando

clique no botão  **Cut**. O campo "Repeat"  indica quantas vezes consecutivas o laser deve passar sobre o contorno.

O “zDrill” indica o movimento do feixe do laser na direção do eixo Z a cada repetição.

Esta opção só está disponível em microscópios motorizados.  zDrill[μm]: 0 

4.2.3 – Segurança do laser

Quando o laser é ligado uma pequena janela com um símbolo laser aparece no canto



superior direito. .e desaparece quando o laser é desligado.

O laser não pode ser ligado por mais de 3 minutos por vez

4.2.4 – Ícone Posição do laser



Selecione os itens de menu conforme segue abaixo, para visualizar ou esconder a posição do laser:

CellCut->Laser ->Laser Target

Este guia tem a finalidade de orientá-lo nas funções básicas do sistema mmiCellCut Plus. Detalhes e operações mais avançadas devem ser consultadas no manual do usuário.