



BINARIZAÇÃO X CONTAGEM DE PONTOS EM MICROSCOPIA CONFOCAL

Rafaela Barboza da Silva¹, Léder Leal Xavier² (orientador)

Escola de Ciências, PUCRS

Resumo

O microscópio confocal é um microscópio de varredura com lasers que excitam a amostra em um comprimento de luz, a amostra por sua vez emite outro comprimento de luz que é observado. A microscopia confocal tem algumas vantagens em relação a microscopia óptica convencional, como: a possibilidade de análise de mais de um marcador biológico, uma melhor distinção de dois pontos, além da possibilidade de escaneamento em 3 dimensões.

Contudo, uma das grandes dificuldades na microscopia confocal é a quantificação, uma vez que esse processo de excitação/emissão faz com que os fluoróforos deixem de emitir luz em um período relativamente curto de tempo, e esse tempo é influenciado diretamente pela intensidade da excitação. Deste modo a amostra analisada em microscopia confocal tem um tempo limitado para obtenção de imagens e essas devem ter um padrão similar de tempos e intensidades de excitação.

Nosso objetivo foi implementar a técnica de binarização de imagens para análise de área coberta por técnica imunohistoquímica, comparando essa com o padrão ouro para avaliação de área coberta, a técnica de contagem de pontos, que vem substituindo ao longo dos anos a técnica de delineamento.

Desse modo, desenvolvemos 10 diferentes protocolos de binarização, aplicamos estes juntamente com um protocolo de contagem de pontos em um grupo de 20 imagens integradas de imunofluorescência, obtidas em microscopia confocal.

Para tanto, as imagens de cortes histológicos com astrócitos imunorreativos para GFAP foram capturadas no microscópio confocal (LEICA TCS SP8), foi utilizado o software ImageJ 1.50i - NIH, USA para análise binária das imagens obtidas e para a realização da técnica de contagem de pontos foi utilizado o software IPP 6.0. Foram realizados testes de correlação de Pearson no software GraphPad Prism.

Nesse teste, encontramos protocolos de binarização que obtiveram uma correlação superior a 0.9 com os resultados obtidos no método de contagem de pontos, sendo que o protocolo de binarização com maior coeficiente de correlação foi escolhido para análise do material biológico.

O mesmo princípio de análise está sendo utilizado no LabCEMM para avaliação de imunohistoquímicas similares. O protocolo de binarização escolhido apresentou um coeficiente de correlação adequado, com a vantagem de que a tarefa pode ser executada em um período significativamente menor de tempo, podendo substituir de modo seguro protocolos como o de contagem de pontos e delineamento.

Palavras-chave

Microscopia confocal; binarização, contagem de pontos