

Análisis de la imagen en microscopía confocal: cuantificación y colocación

*Andrés Esteban Cantos y Covadonga Alonso Martí
Laboratorio de Interacción virus-célula
Departamento de Biotecnología del INIA*



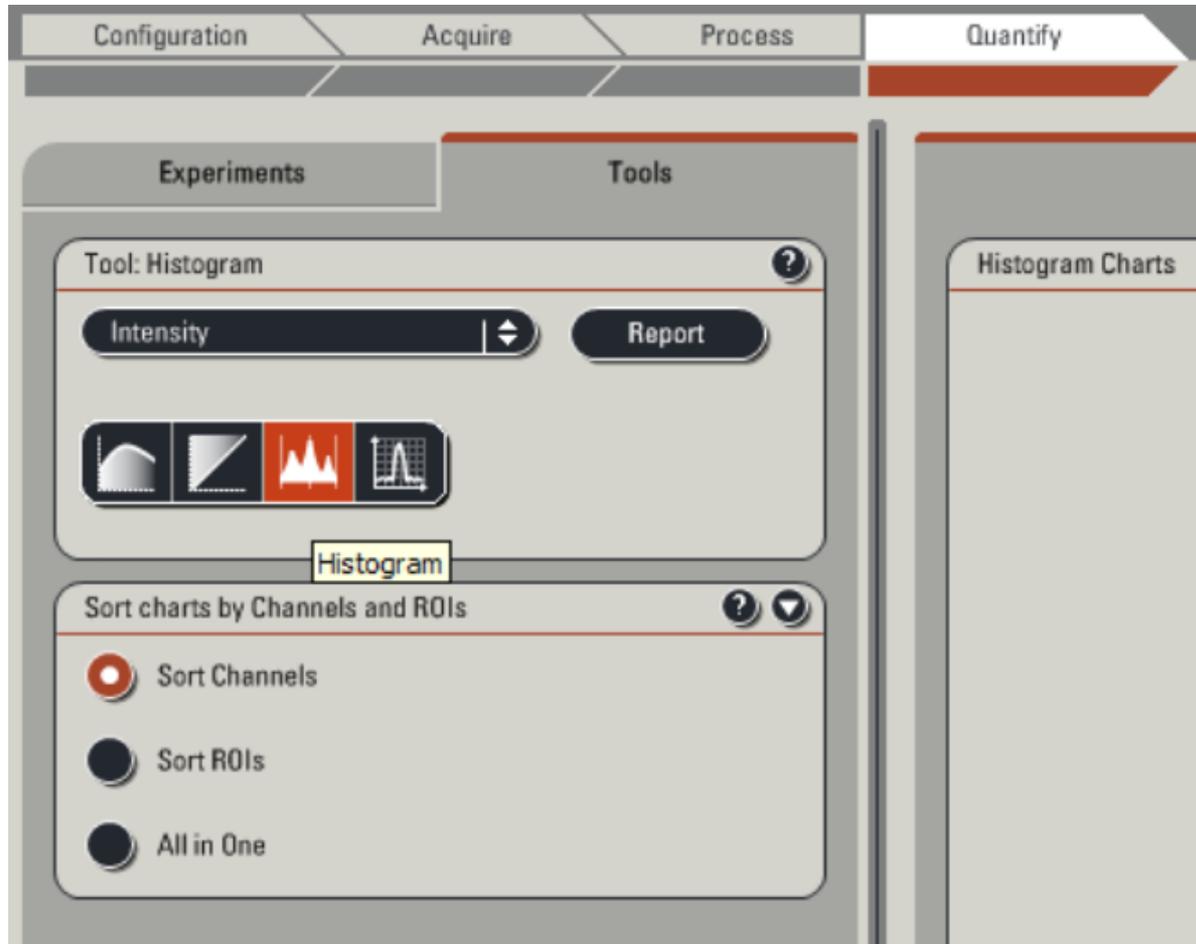
MINISTERIO
DE ECONOMÍA, INDUSTRIA
Y COMPETITIVIDAD



***Cuantificación de la
fluorescencia***

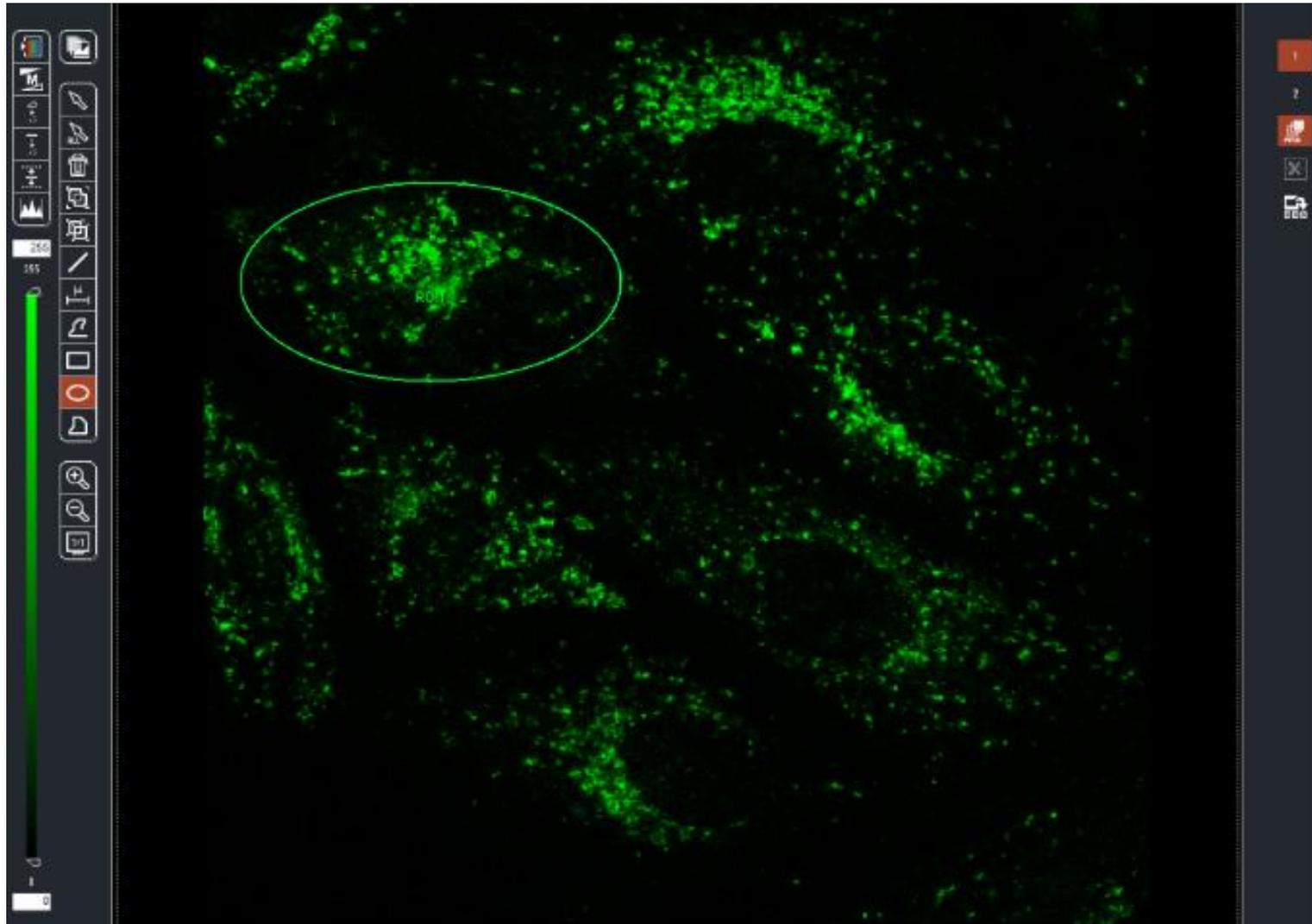
Cuantificación de la fluorescencia

Una vez captadas las imágenes, podemos cuantificar su fluorescencia:

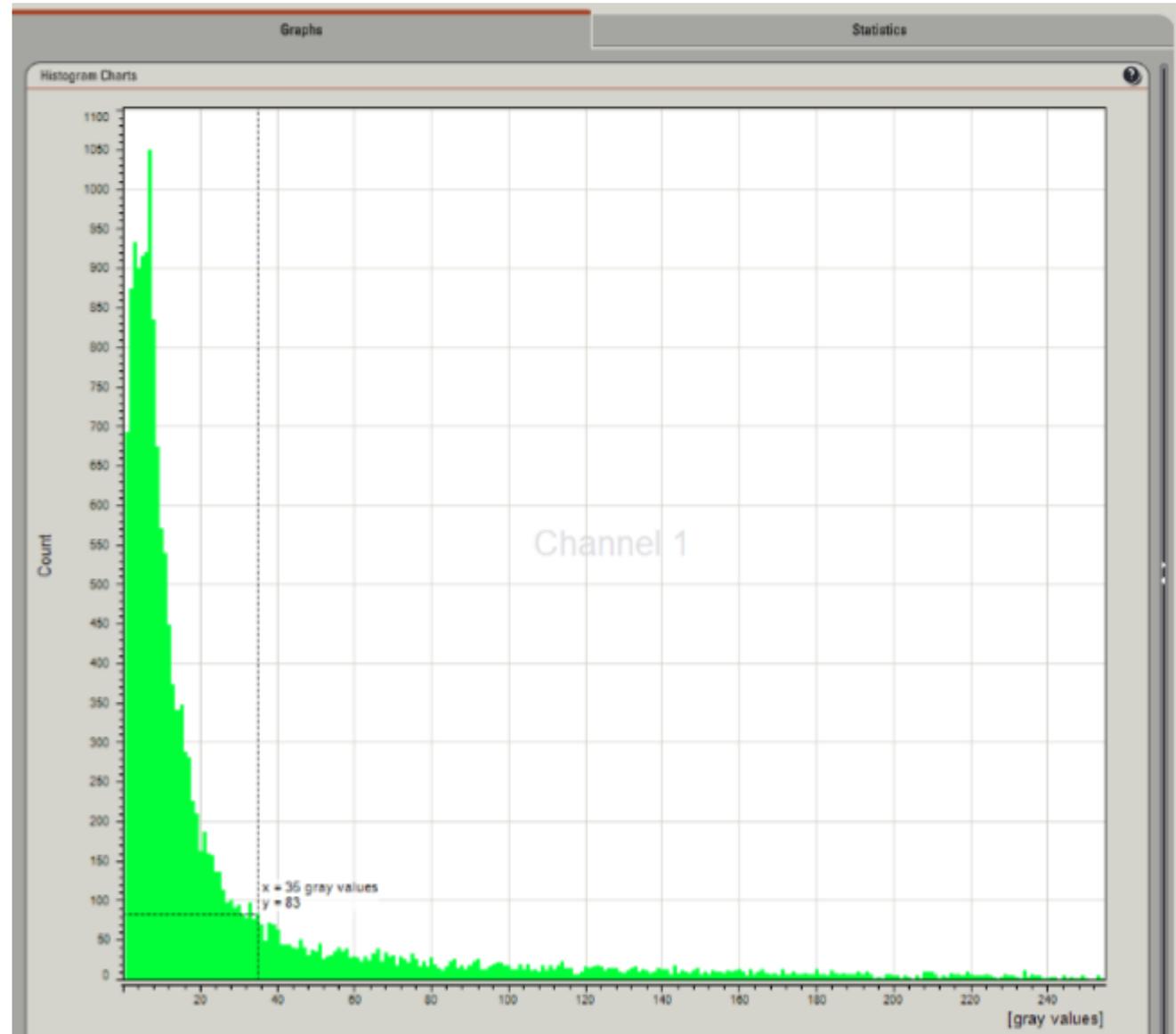
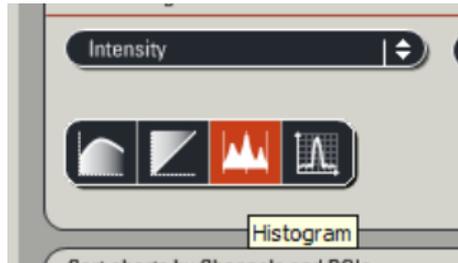


Cuantificación de la fluorescencia

Podemos cuantificar la fluorescencia de toda la imagen, o bien la de una región de interés (ROI) seleccionada



Cuantificación de la fluorescencia



Histograma:

- ✓ Eje X: indica la (intensidad de la fluorescencia en escala de grises)
- ✓ Eje Y: indica el número de píxeles

Cuantificación de la fluorescencia

Statistics



En el apartado “statistics” aparecen datos estadísticos relativos a la cuantificación de la fluorescencia

Histogram Statistics

Channel 1	ROI1
Area	909.33 (μm) ²
Mean Value	27.52 gray values
Pixel Count	17593
Pixel Sum	484154
Maximum	255.00 gray values
Minimum	0.00 gray values
Variance	2.01 Kgray values
Standard Deviation	44.81 gray values
Average Deviation	29.05 gray values
Maximum Peak	227.48 gray values
Maximum Valley	27.52 gray values

Estudios de colocación

¿Qué es la colocalización?

- ✓ Indica que dos moléculas se encuentran en el mismo lugar en un instante del tiempo concreto, pero no que estén interactuando entre sí

La colocalización está ligada a la resolución del microscopio. Aquellas moléculas que estén a una distancia inferior a la resolución del microscopio colocalizarán.

Al realizar estudios de colocalización es importante preparar adecuadamente las muestras y optimizar la imagen para obtener la máxima resolución posible.

A la hora de preparar las muestras hay que:

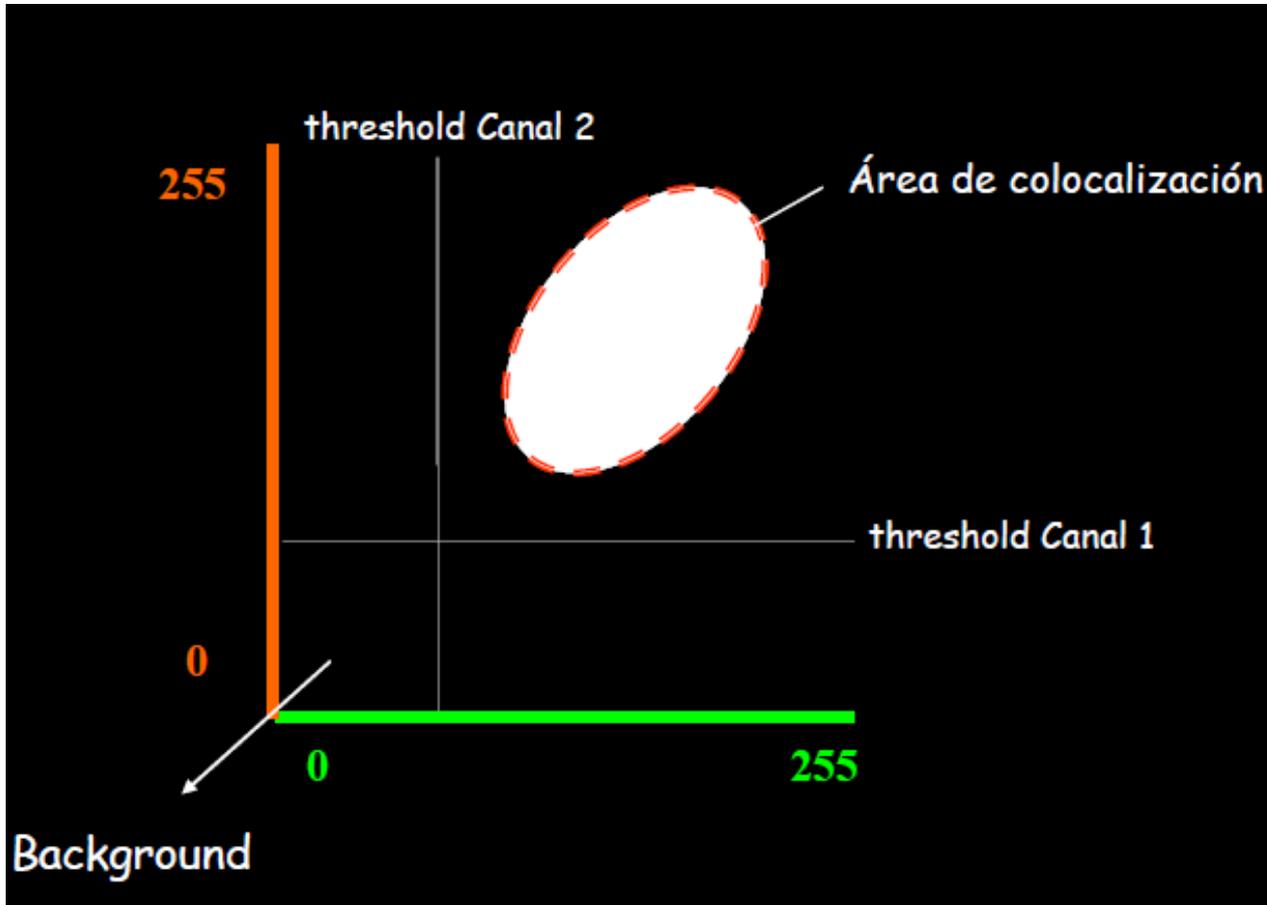
- ✓ Utilizar marcadores fluorescentes estables y que no solapen entre sí
- ✓ Evitar la autofluorescencia
- ✓ Realizar controles (inespecificidad y reacciones cruzadas)
- ✓ Mantener la ultraestructura de la muestra
- ✓ Utilizar medios de montaje y cubreobjetos adecuados (170 micras de grosor)
- ✓ Correcto apareamiento de índices de refracción
- ✓ Realizar controles de cada anticuerpo

Lo más recomendable es utilizar un fluorocromo verde y otro en rojo pero cercano al rojo lejano

En la captación de la imagen hay que:

- ✓ Optimizar la resolución axial y lateral (ajustarse al criterio de Nyquist)
- ✓ Evitar las aberraciones cromáticas
- ✓ Utilizar el mismo valor de average en todas las fotos
- ✓ Rango dinámico de 8 bit
- ✓ Seleccionar bandas espectrales estrechas
- ✓ Verificar que no hay solapamiento entre canales
- ✓ Realizar todas las fotos el mismo día
- ✓ Captación de la imagen secuencial

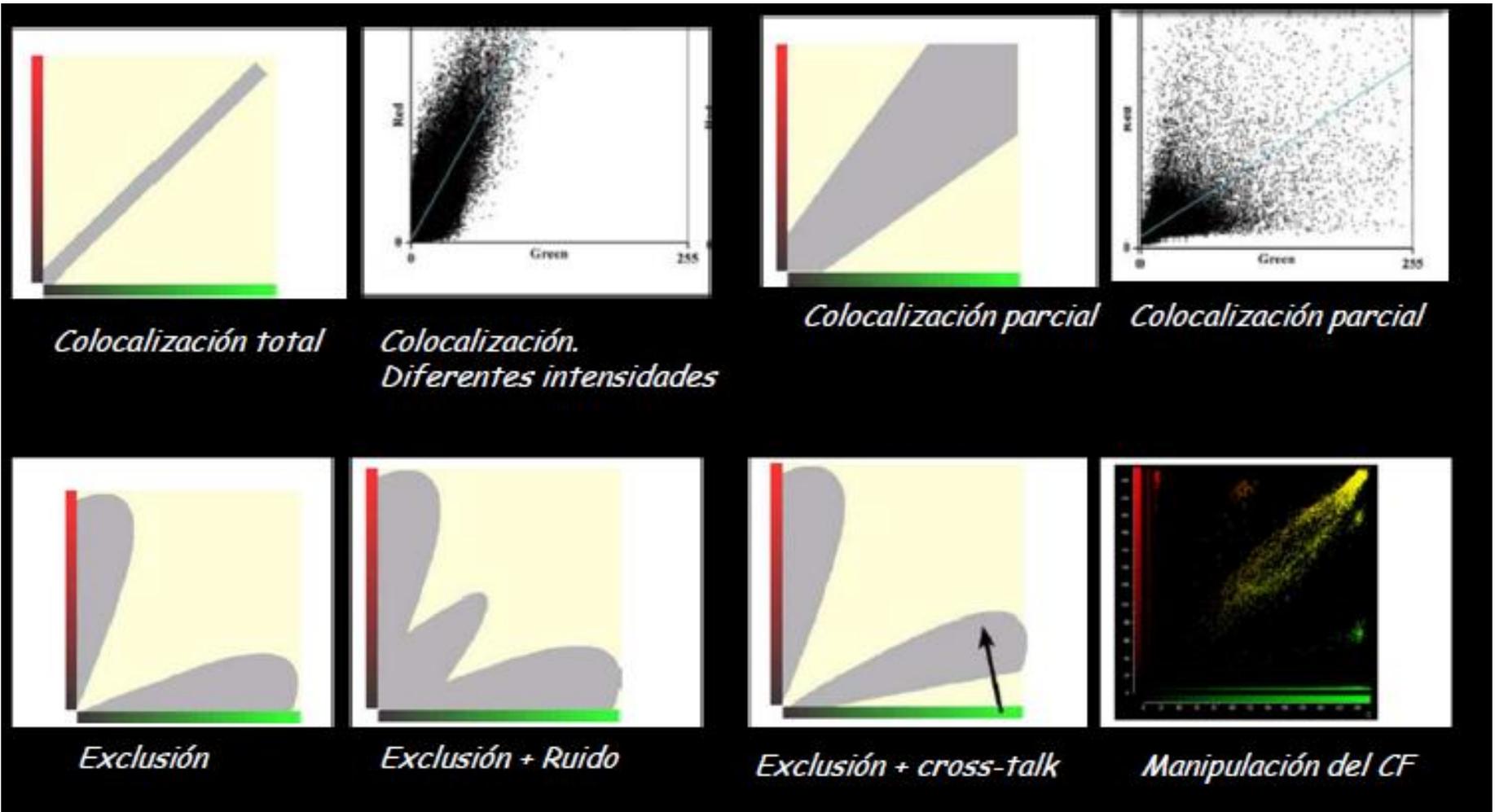
La colocación se representa gráficamente en un **citofluorograma**:



Los umbrales de los canales (thresholds) se determinan en función de los controles de cada anticuerpo

Estudios de colocalización

Posibles resultados obtenidos en un citofluorograma



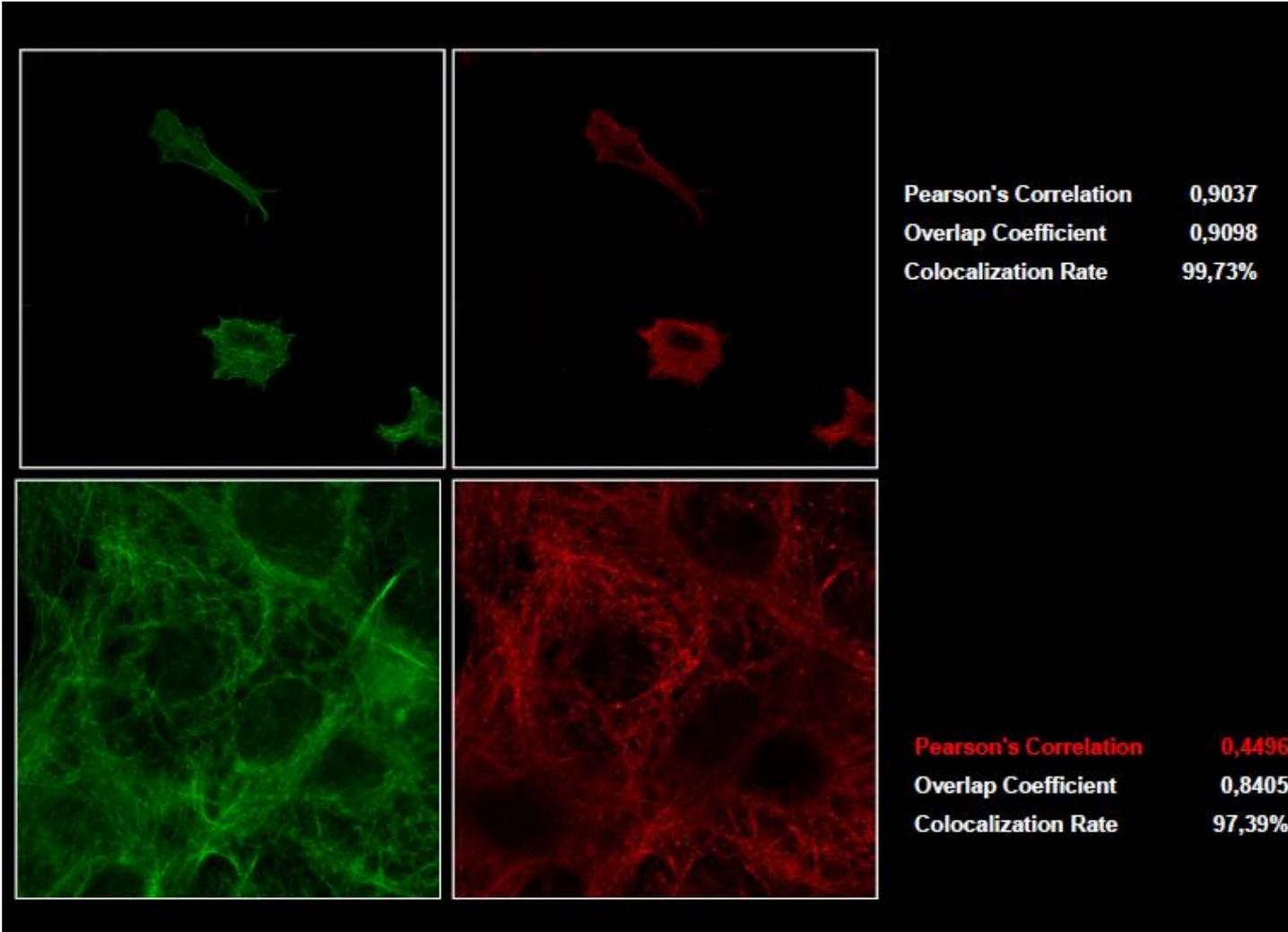
Cuantificación de la colocalización:

Se realiza en secciones individuales, no en la proyección máxima

Principales coeficientes de cuantificación de la colocalización:

- ✓ **Coeficiente de colocalización:** nº de píxeles que colocalizan/píxeles totales
- ✓ **Coeficiente de Pearson:** describe la correlación de las distribuciones de intensidad entre los canales. Se ve afectado por el ruido y la densidad de la imagen
 - Entre -1 y 0: -1 (exclusión), 0 (distribución al azar) y +1 (colocalización)
- ✓ **Coeficiente d'overlap (Manders):** es una transformación del coeficiente de Pearson que no incluye las intensidades medias. Se ve afectado por el background, el ruido y la desigual distribución de píxeles de colores diferentes.

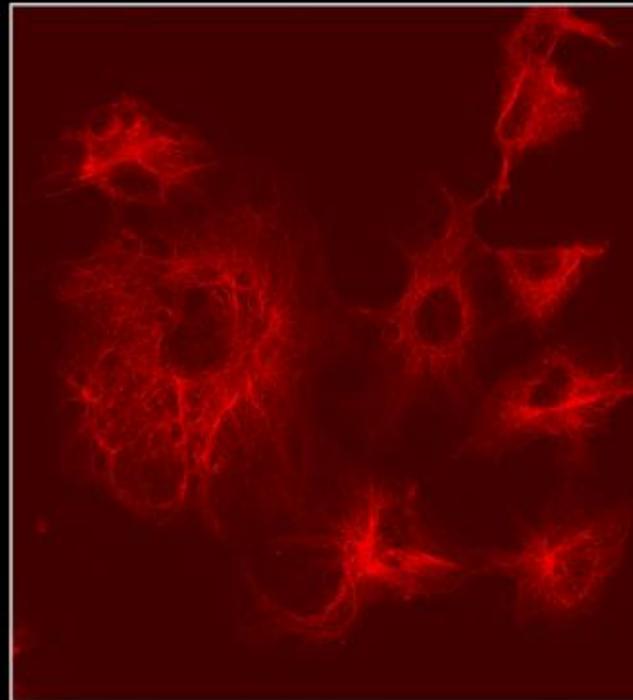
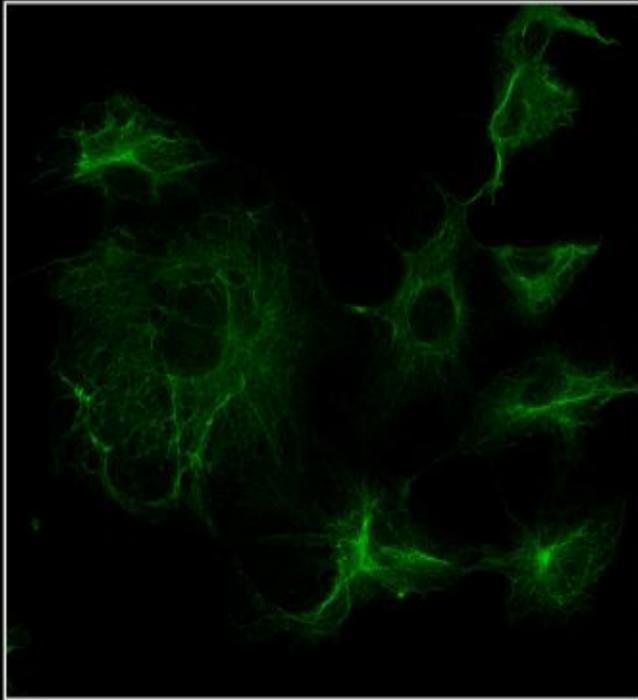
Ejemplos de cuantificación de la colocalización



El coeficiente de Pearson se ve afectado por la alta densidad de fluorescencia en la imagen



Ejemplos de cuantificación de la colocalización



Pearson's Correlation: 0.8010

Overlap Coefficient: 0.6884

Colocalization Rate: 51.65 %

El coeficiente de Overlap se ve afectado por el alto ruido de la imagen