

Uso da Estereologia como Método na Pesquisa Histológica.

The use of Stereology as Method in Histological Research.

* José Miguel Amenábar

** Dalva Maria Pereira Padilha

* Fernando Neves Hugo

*** Anna Christina Medeiros Fossati

RESUMO

Na pesquisa em Biologia Bucal freqüentemente são realizados estudos morfométricos de língua, mucosa, glândulas salivares e zonas de osseointegração. Para a realização de medições de proporções envolvendo área, volume, número de estruturas, etc, o método estereológico é de grande utilidade. O objetivo deste artigo é descrever um método utilizado para determinação de pontos amostrais em uma grade, e sua aplicação na análise de imagens em pesquisa histológica. Para tal, utilizaram-se 3 cortes histológicos de 3 glândulas salivares submandibulares de camundongos como exemplo para explicar o método. A estereologia, quando bem indicada, é uma ferramenta que proporciona excelentes resultados; e sua utilização, quando respeitados os critérios para determinação do número de pontos amostrais para avaliação de estruturas e tecidos, permite a obtenção de dados confiáveis quando da análise quantitativa de material de origem histológica.

Palavras-chave:

Morfologia, Histologia comparada, Métodos, Estatística e dados numéricos.

INTRODUÇÃO

Na pesquisa histológica algumas vezes é necessário determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes histológicos bidimensionais. Como exemplo é possível citar estudos morfométricos de língua, mucosa, glândulas salivares e zonas de osseointegração. Para a realização de medições de proporções envolvendo variáveis como área, volume, número de estruturas, entre outras, o método estereológico é de grande utilidade.

A estereologia é a ciência das relações geométricas entre uma estrutura que existe em três dimensões e as imagens daquela estrutura, que são fundamentalmente bidimensionais (RUSS e DEHOFF, 2000). A aplicação mais comum da estereologia está relacionada a imagens obtidas a partir de diferentes tipos de microscópios, como os de luz e os eletrônicos. Para este fim, é necessário que o órgão ou tecido seja isotrópico, homogêneo, ou seja, que apresente as mesmas características em todas as direções. Este método pode ser aplicado a qualquer estrutura em que seja possível um estudo morfométrico (DEHOFF, 2000).

Uma das variáveis pesquisadas freqüentemente é o volume ocupado por uma estrutura. Podemos conhecer o volume de um corte determinado multiplicando a área do corte pela espessura deste. Em cortes seriados podemos conhecer o volume total

de um tecido ou órgão, sem ter que analisar todos os cortes da série e sem que isto diminua significativamente a acurácia do método. Este princípio é conhecido como Princípio de Cavalieri (HAMILTON e ALLEN, 1995; MANDERIM-DE-LACERDA, 1995).

Porém, geralmente existe pouco interesse em determinar o número total de estruturas presentes em determinado órgão ou tecido, pois sabemos que em diferentes indivíduos, tais órgãos e tecidos devem ter diferentes tamanhos e pesos. Entretanto, às vezes é necessário determinar para cada órgão ou tecido avaliado um certo número de estruturas por unidade de volume ou área, já que esta vai ser válida para qualquer indivíduo, porque é um parâmetro relativo. (MANDERIM-DE-LACERDA, 1995). Quando é necessário obter a densidade de determinadas estruturas em órgãos ou tecidos é preciso criar um sistema que nos permita obter a proporção destas estruturas nestes órgãos ou tecidos. Para este fim a estereologia pode ser utilizada como método.

O objetivo deste artigo é descrever um método utilizado para determinação dos pontos amostrais em uma grade, e sua aplicação na análise de imagens em pesquisa histológica.

MATERIAL E MÉTODO

Levando-se em conta que as glândulas salivares podem ser consideradas

isotrópicas, 9 imagens digitalizadas de cortes histológicos de 3 glândulas salivares submandibulares de camundongo coradas pela técnica da Hematoxilina/Eosina, provenientes de nosso banco de imagens digitalizadas, serão utilizados como exemplo para explicar o método estereológico aqui descrito. As imagens foram capturadas utilizando-se um microscópio óptico (Olympus AX 70, Japão) acoplado a um sistema de captação de imagens digital (Olympus U-PMTVC, Japão), e analisadas com um software para análise de imagens digitalizadas (Image-Pro Plus 3.0.1, EUA).

Sistemas testes

Um sistema teste consta de um conjunto de linhas, que podem ser retas ou curvas, e pontos. Estes são superpostos a uma imagem ou corte histológico, como neste exemplo, para a contagem estereológica (RUSS e DEHOFF, 2000). Estes sistemas podem ser construídos com um arranjo regular ou de forma aleatória, e cada um destes arranjos vai determinar as características básicas do sistema teste.

A área teste (A_t) representa o valor obtido ao multiplicar o somatório do número de pontos teste (P_t = número de pontos presentes numa grade) pela área de um ponto teste (a_p = área ocupada por quatro pontos) (RUSS e DEHOFF, 2000).

* Mestre em Gerontologia Biomédica, PUCRS; Pesquisador Associado do Laboratório de Envelhecimento Celular, Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

** Doutora em Odontologia/Estomatologia Clínica, PUCRS; Professora da Disciplina de Odontogeriatrics, Departamento de Odontologia Preventiva e Social, UFRGS; Professora do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica, PUCRS.

*** Doutora em Biologia Celular, USP, Professora das Disciplinas de Histologia Geral e Buco-Dentária, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

$$A_t = \sum P_t \times a_p$$

Este primeiro sistema teste será utilizado para determinar a quantidade de pontos amostrais a serem contados. Posteriormente precisamos criar outro sistema teste para analisar as amostras.

Quantidade de pontos amostrais

Os pontos amostrais são obtidos com a aplicação das várias fórmulas explicadas a seguir. A densidade de área (Aa) é a proporção de área de uma estrutura determinada em relação a área total do sistema teste no qual está inserida; é obtida pela medição da ocupação relativa da área teste (A_t) pela área das imagens da estrutura que está sendo avaliada. Interpretação semelhante é dada à densidade de volume (V_v), pois na estereologia, a quantidade relativa de pontos que atingem ou tocam uma dada estrutura é comparável à quantidade da área desta estrutura contida na área teste, ou também à quantidade de volume desta estrutura no volume teste (CRUZ-ORIVE e WEIBEL, 1990), em outras palavras, na estereologia $Aa = V_v$. Para a obtenção da densidade de volume (V_v) é utilizada a seguinte fórmula estereológica:

$$V_v = \frac{P_p}{P_t}$$

onde "Pp" representa o número de pontos atingidos na glândula, e "Pt" o número de pontos teste (número de pontos total da grade).

Um dos pontos mais importantes é o entendimento de que cada órgão ou tecido avaliado, como neste exemplo as glândulas salivares, são diferentes uns dos outros. Portanto, é necessário calcular a densidade de volume ou "Vv" para cada estrutura (unidade de análise) que vai ser avaliada.

Com uma objetiva planar é possível observar toda a superfície do corte, nesse caso, da glândula. Quando esta objetiva não está disponível cada corte pode ser digitalizado por partes (Figura 1).

Após a determinação do "Vv" em cada corte que vai ser avaliado, o "n" para cada um deles deve ser calculado. Geralmente, o valor para a = 0,05 é escolhido como o

erro padrão relativo (EPR) a ser aplicado na seguinte fórmula (MANDERIM-DE-LACERDA, 1995).

$$n = \frac{1 - V_v}{(EPR)^2}$$

Se a densidade da estrutura (variável) a ser utilizada é muito pequena é possível utilizar uma correção do "n" (calculado) para um novo "n" (corrigido) para cada uma das imagens.

$$n_{cor} = \frac{n_{cal}}{V_v}$$

Posteriormente, a média de "ncor" é realizada para cada glândula, escolhendo o resultado com maior número de pontos entre todas as estruturas avaliadas como a base para assegurar-se que todas as glândulas tenham um intervalo de confiança de pelo menos 95%.

Avaliação das amostras

A escolha dos campos de forma aleatória permite que todos estes tenham a mesma probabilidade de serem selecionados para que se efetue a avaliação das variáveis escolhidas. Esta escolha aleatória pode ser realizada movendo os paraquos do *chariot* do microscópio e selecionando um campo. Entretanto, este método tem duas limitações: 1) caracterização de um erro sistemático ou viés de maneira inconsciente ao selecionar campos específicos com maior ou menor densidade de estruturas, 2) ao mobilizar de forma aleatória a mesa do microscópio, o mesmo campo pode ser escolhido duas vezes (HAMILTON e ALLEN, 1995).

O outro método, mais apropriado, é o de amostragem aleatória estratificada, que consiste em sobrepor uma série de linhas paralelas sobre o corte a ser analisado, escolhendo aleatoriamente uma quantidade específica de campos entre as linhas, deste modo evitando a inclusão de vieses (RUSS e DEHOFF, 2000). Um exemplo de amostragem aleatória estratificada para todos os cortes seria escolher quatro zonas de cada imagem (Figura 2).

O número de pontos (intercessão entre duas linhas, por exemplo) que atinge cada variável é contado. Uma vez analisadas todas as zonas, a soma dos valores das imagens de cada glândula é realizada. Os valo-

res obtidos nesta soma podem ser convertidos em porcentagens utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem} = \frac{\sum P_{av}}{P_t} \times 100$$

sendo "Pav" o número de pontos atingidos em uma determinada variável e "Pt" o número de pontos totais do sistema teste. Esta fórmula é aplicada para cada variável. No final, tabelas são construídas com todas as porcentagens das variáveis e as análises estatísticas adequadas são realizadas.

RESULTADOS

Sistemas testes

No exemplo apresentado foi utilizada, para determinação de "Vv", uma grade de 130 pontos de intercessão entre duas linhas, escolhida aleatoriamente pelo sistema de análise de imagens digitais utilizado, totalizando uma área teste de 325000mm², resultado da aplicação da fórmula 1.

Quantidade de pontos amostrais

Na tabela 1 são mostrados os pontos da grade que atingem, em cada imagem, a estrutura da glândula submandibular; os valores "Vv", obtido pela aplicação da fórmula 2; e o n (Fórmula 3) para cada uma das imagens avaliadas, para um erro padrão de 5%.

O número final de pontos amostrais é obtido após a estimativa do ncor (Fórmula 4) para cada uma das imagens (Tabela 2), e da média do ncor, que representa o n corrigido para a glândula que está sendo avaliada. Escolhe-se então o número de pontos que será utilizado para avaliação das amostras. Neste exemplo foi escolhida a média do ncor da glândula 2 (Tabela 2), pois foi a maior média (140 pontos) e, portanto as demais glândulas também estarão dentro de um intervalo de confiança de 95%.

Avaliação das amostras

Com base no nosso exemplo, 140 foi o número de pontos necessários na grade para analisar cada imagem. Dividiu-se então o número total de pontos amostrais (140) pelo número de zonas por imagem (4), criando-se assim, um segundo sistema teste composto por 35 pontos (intercessão entre linhas). Esta nova grade de 35 pontos foi colocada sobre cada uma das zonas a serem analisadas (Figura 3).

No caso das glândulas salivares, em cada imagem podem ser avaliados a proporção de ácinos, túbulos, ductos, tecido conjuntivo

propriamente dito, vasos sanguíneos, tecido adiposo, infiltrado linfocitário, entre outras, e a partir da contagem dos pontos que atingem cada variável, podem ser calculadas as porcentagens para cada variável, em proporção ao volume total da amostra, e por conseguinte realizadas as análises estatísticas.

DISCUSSÃO

Na pesquisa em Biologia Bucal frequentemente são realizados experimentos que utilizam como método a análise de imagens histológicas. Entre os quais estão os estudos morfométricos de língua, mucosa, glândulas salivares e zonas de osseointegração em que a estereologia foi utilizada como ferramenta para análise de cortes histológicos.

Diversos experimentos realizados com glândulas salivares utilizaram como método análise estereológica, e por tal motivo imagens histológicas de glândulas submandibulares foram escolhidas como material a ser utilizado para montar os exemplos descritos neste artigo. Entretanto, nestes experimentos prévios, foram utilizadas grades de tamanhos pré-determinados, sem que fosse estimada a quantidade de pontos mínimos necessários para a realização da análise estereológica (SCOTT et al, 1986; KOMESU et al, 1989; DAYAN et al, 2000; VERED et al, 2000).

Um dos problemas decorrentes da não determinação adequada do número de pontos necessários na grade de análise é a utilização de uma grade com um intervalo de confiança baixo, o que aumenta consideravelmente a chance de o número de pontos a serem contados não ser suficiente para que se tenha um tamanho amostral adequado (MANDERIM-DE-LACERDA, 1995), prejudicando os resultados do experimento.

É necessário então determinar a quantidade adequada de pontos amostrais para fazer a análise estereológica, pois isto, além de reduzir o tempo de trabalho e a quantidade de imagens, proporcionará também uma boa confiabilidade aos resultados, pelo fato de se estar trabalhando dentro de um intervalo de confiança adequado.

Outro fator de importante é a determinação da amostra mínima passível de ser estatisticamente significativa. Neste exemplo foram utilizadas 3 glândulas unicamente para fins ilustrativos. Cruz-Orive e Weibel (1990) explicam que na estereologia geralmente há interesse pelo aumento ou diminuição de uma determinada variável, implicando que teremos uma probabilidade de 50% que isto aconteça. Se nós temos cinco animais, cinco glândulas ou cinco estruturas por grupo, por exemplo, nossa probabilidade será de $P = (0,5)^{\# \text{de eventos}}$, ou seja, $P = (0,5)^5$. Este

valor dará como resultado um P de aproximadamente 0,03; portanto $P < 0,05$, por este motivo 5 será, na maioria dos casos, o menor número de estruturas a analisar.

Também é importante definir o número de cortes mínimos necessários para avaliação estereológica. O número de cortes dependerá da quantidade de pontos amostrais necessários na grade (ncor). Quanto maior o número de pontos testes na grade, menor será o número de cortes necessários.

A estereologia, quando bem indicada, é uma ferramenta que proporciona excelentes resultados. Sua utilização, quando respeitados os critérios para determinação do número de pontos amostrais para avaliação de estruturas e tecidos, permite a obtenção de dados passíveis de análise estatística segura, quando se planeja uma abordagem quantitativa de material de origem histológica.

ABSTRACT

Morphometrical studies of tongue, oral

mucosa, osteointegration zones and salivary glands are frequently performed in histological research. The stereological method is often used when measuring proportions related to area, volume, number of structures, etc. The objective of this article is to describe a stereological method used to determine the number of sample points in a grid, and its application in the analysis of images in histological research. For such we used three histological slides from mice submandibular salivary glands as example to explain the method. Stereology is a tool that allows excellent results when properly applied. Its use, when the criteria to determine the number of sample points are respected, allows the attainment of reliable data if quantitative analysis of histological material is planned.

Keywords

Morphology, Comparative Histology, Methods, Statistics & numerical data.

Tabela 1. Valores de pontos atingidos, V_v e n por corte, em cada uma das glândulas do exemplo, pela aplicação de uma grade com 130 pontos, com um erro padrão de 5%.

GLÂNDULA	IMAGEM	PONTOS ATINGIDOS	V_v	n
1	A	100	0,77	92
	B	110	0,85	60
	C	90	0,69	124
2	A	96	0,74	104
	B	95	0,73	108
	C	100	0,77	92
3	A	125	0,96	16
	B	120	0,92	32
	C	122	0,94	24

Tabela 2. Valores de V_v , n , ncor por corte e Média do ncor em cada uma das glândulas do exemplo, com um erro padrão de 5%.

GLÂNDULA	IMAGEM	V_v	n	ncor	Média do ncor
1	A	0,77	92	119	123
	B	0,85	60	71	
	C	0,69	124	180	
2	A	0,74	104	153	140
	B	0,73	108	148	
	C	0,77	92	119	
3	A	0,96	16	17	26
	B	0,92	32	35	
	C	0,94	24	25	

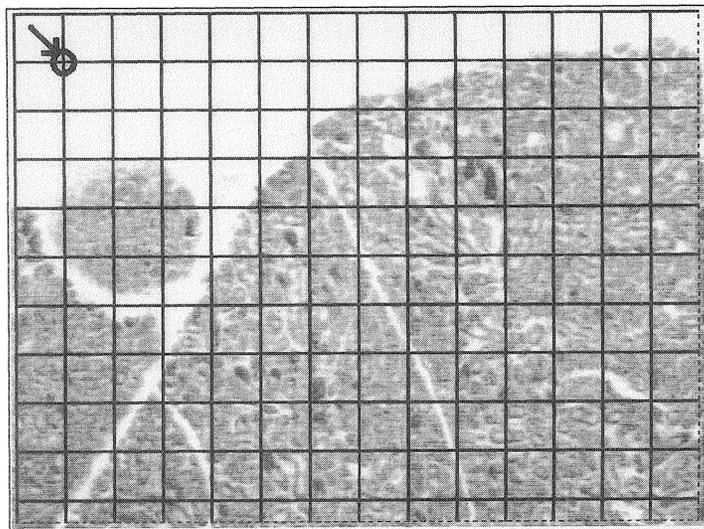


Figura 1. Imagem digital de uma glândula salivar submandibular de camundongo (aumento original 25X) com uma grade de 130 pontos sobreposta. A seta indica o ponto de interseção entre as duas linhas.

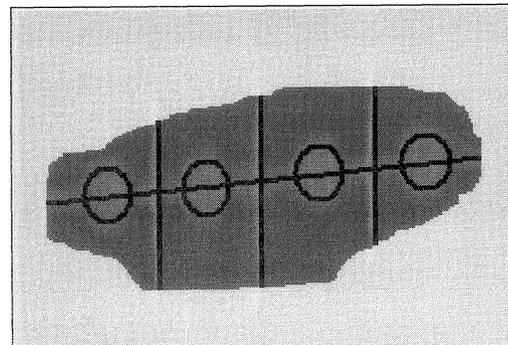


Figura 2. Desenho esquemático. Determinação dos campos a serem capturados para a análise estereológica.

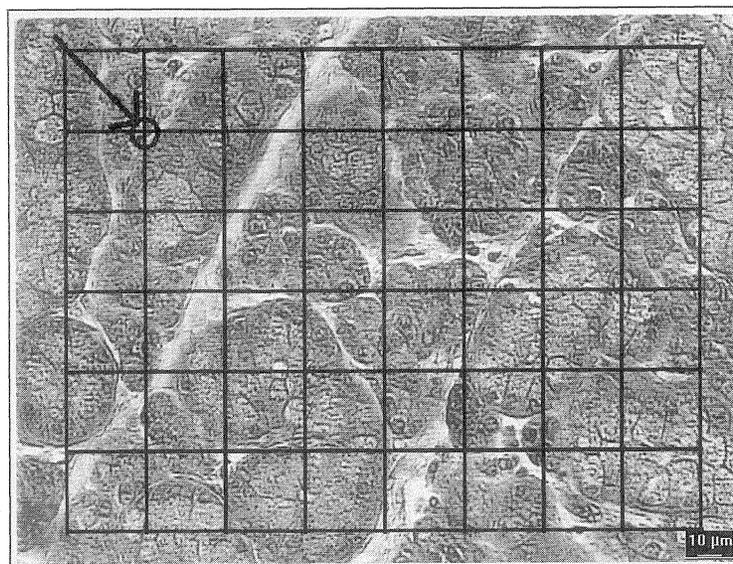


Figura 3. Imagem digital de uma glândula salivar submandibular de camundongo (aumento original 200X) com uma grade de 35 pontos sobreposta. A seta indica o ponto de interseção entre as duas linhas.

REFERÊNCIAS

CRUZ-ORIVE LM; WEIBEL ER. Recent Stereological Methods for Cell Biology: A Brief Survey. *Am. J. Physiol.*, Washington, v.258, p.L148-L156, 1990.

DEHOFF RT. Probes, Populations, Samples, Measurements and Relations in Stereology. *Image Anal. Stereol.*, v.19, p.1-8, 2000.

HAMILTON PW; ALLEN CD Quantitative Clinical Pathology. Missouri: Mosby, 1995. 434p.

MANDERIM-DE-LACERDA C. **Métodos Quantitativos em Morfologia.** Rio de Janeiro: EURJ, 1995. 131p.

RUSS JC; DEHOFF RT. Practical Stereology. 2nd.ed. New York: Plenum Press, 2000. 312p.

SCOTT J; BODNER L; BAUM BJ. Assessment of Age-Related Changes in the Submandibular and Sublingual

Salivary Glands of the Rat Using Stereological Analysis. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v.31, p.69-71, 1986.

KOMESU MC et al. Morphometric Study of Changes in the Submandibular Gland of Aging Rats. 2. Ducts. *Rev. Fac. Odontol. Lins.*, São Paulo, v.2 p.11-20. 1989

DAYAN D; VERED M; PAZ T; BUCHNER A. Aging of Human Palatal Salivary Glands: A Histomorphometric Study. *Exp. Gerontol.*, Tarrytown, v.35, p.85-93, 2000.

VERED M; BUCHNER B; DAYAN D. Age-Related Histomorphometric Changes in Labial Salivary Glands with Special Reference to the Acinar Component. *Exp. Gerontol.*, Tarrytown, v.35, p.1075-1084, 2000.

Endereço para correspondência:
José M. Amenábor
Laboratório de Envelhecimento Celular
Instituto de Pesquisas Biomédicas
Hospital São Lucas - PUCRS
Av. Ipiranga, 6690 - Jd. Botânico
CEP 90610-000 - Porto Alegre/RS
iamenaba@terra.com