

GRAU DE PRECISÃO NA AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO NÚMERO DE CÉLULAS

PRECISION DEGREE IN THE MORPHOMETRIC CELL NUMBER EVALUATION

Rumio TAGA

Professor Associado do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP.

Antonio SESSO

Professor Associado do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de São Paulo - USP.

Luiz Carlos PARDINI

Professor Associado do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP.

Os autores apresentam com o intuito de divulgação, um método para se estimar o grau de precisão na avaliação morfométrica do número absoluto de células em um órgão. Este método permitirá ao pesquisador durante a fase de planejamento do projeto de pesquisa, calcular à partir de contagens iniciais, o tamanho da amostra (número total de campos histológicos) necessário para se trabalhar com um nível pré-estabelecido de erro nas avaliações. Este fato é muito importante porque, às vezes, dependendo do objetivo do trabalho, um grau muito alto de precisão pode não ser necessário, nesse caso, estabelecendo-se um coeficiente de variação aceitável, ocorrerá um enorme ganho no consumo de tempo.

*Recebido para publicação
em 27/03/98*

Unitermos: Morfometria; Avaliação de número de partículas; Amostragem; Erro.

INTRODUÇÃO

A maioria dos métodos de medição ou de contagens em nível de microscópio de luz ou de eletrão-micrografias, se baseiam em princípios geométrico-estatísticos. Deste modo, para a obtenção de resultados cientificamente consistentes é necessário um grande número de determinações, com consumo muito grande de tempo.

Um dos métodos estereológicos mais utilizados, tanto na histologia como na citologia, é o método de volumetria relativa de contagem de pontos ("point - counting volumetry"), que permite a obtenção da densidade de volume (V_{vi}) de um tipo de estrutura (i) em um continente,

ou seja, a fração de volume do continente ocupado por esse tipo de estrutura. Neste método, uma grade de pontos retangularmente dispersos em uma área quadrangular é colocada sucessivamente sobre as imagens de campos histológicos ou de eletrão-micrografias, e os pontos coincidentes (P_i) com os perfis das secções da estrutura (i) são anotados. Deste modo, tendo-se esse valor e o número total de pontos (P), a densidade de volume (V_{vi}) é facilmente calculada pela relação: $V_{vi} = P_i/P$ (consultar WEIBEL¹ e AHERNE; DUNHILL²). Este método está sujeito a erros, tanto sistemáticos como casuais, mas que podem ser diminuídos utilizando-se procedimentos adequados durante a realização das quantificações

(HILLIARD; CAHN⁴; WILLIAMS⁵). O coeficiente de variação, ou grau de precisão, ou "erro"(e) associado a densidade de volume avaliada, pode ser facilmente

calculado pela fórmula $e = \sqrt{\frac{1 - V_{vi}}{P \cdot V_{vi}}}$ (Schaefer,

GANDER e TRACHSLER⁶).

A importância da existência dessa fórmula, é que durante a fase de planejamento da pesquisa, à partir de uma quantificação inicial, é possível se calcular o número total de pontos (P) (que representa na prática o número total de campos ou de eletrão-micrografias a serem utilizados) para trabalharmos com um "erro"(e) ou grau de precisão pré-estabelecido, pela fórmula deduzida da

anterior, $P = 1 - \frac{V_{vi}}{e \cdot V_{vi}}$.

Nos casos dos métodos de avaliação do número de partículas(núcleos em um órgão ou organelas em uma célula) ainda não existe um método para se calcular o grau de precisão das contagens ou para se estabelecer o tamanho da amostra necessário.

Em 1983, DE LUCA³ em sua tese de doutorado (orientada por A. Sesso) utilizou-se do método de KISH⁷ idealizado para estimativa populacional, adaptando-o para caracterização do tamanho da amostra na avaliação do número de células na glândula parótida do hamster durante o desenvolvimento pós-natal.

Como ficou faltando uma divulgação maior desse método no meio científico que se utiliza da morfometria em suas pesquisas, montamos esse pequeno artigo de divulgação, onde à partir de contagens de células realizadas em glândulas submandibulares de camundongo pelo método morfométrico II de AHERNE¹, apresentamos como é calculado o coeficiente de confiança associada a avaliação e também como pode-se, por cálculo inverso, determinarmos o tamanho da amostra (número de campos histológicos) para se trabalhar com um nível pré-estabelecido de erro.

Avaliação do número de células pelo método morfométrico II de Aherne

No nosso experimento desejávamos avaliar as dimensões morfométricas das várias estruturas das glândulas submandibulares do camundongo macho (*Mus musculus*), linhagem Swiss. Um lote de 10 animais adultos foram utilizados nas avaliações morfométricas.

Após o sacrifício dos animais por inalação de éter etílico, as suas glândulas submandibulares foram

dissecadas, retiradas e pesadas em balança analítica Mettler H-20. As glândulas foram fixadas em líquido de Helly por 3 horas e lavadas em água corrente durante uma noite. No dia seguinte, as peças foram submetidas a desidratação em álcool etílico, clarificação em xilol e inclusão em parafina.

Cortes semi-seriados de 6µm de espessura foram obtidos para cada animal e foram corados pela técnica do tricrômico de Masson.

Em 50 campos histológicos por animal, escolhidos por amostragem sistemática, contamos com uma ocular Kpl 8X Zeiss contendo um graticulo de integração II Zeiss com 100 pontos e 10 linhas paralelas em uma área quadrangular e uma objetiva 100X, o número de imagens de núcleos (n) dos vários tipos celulares(células acinosas, dos ductos intercalares, dos ductos granuloso, dos ductos estriados e do estroma) e o número de cruzamentos(c) que os núcleos de cada categoria celular faziam com as linhas paralelas. De posse desses dados e conhecendo-se a área total examinada (A), a distância entre as linhas (d), a espessura do corte (t) e o volume processado (Vp), o número total de núcleos (Ni) de cada estrutura (i) na glândula foi calculada pela fórmula: $Ni = 2n \cdot Vp/A \cdot (c/n + d + 2t)$ (Aherne¹).

Para o cálculo do grau de precisão dessas contagens escolhemos por sorteio um dos animais da amostra. Em cortes histológicos de glândulas desse animal, realizamos a contagem do número de células em dois lotes de 50 campos microscópicos(campo a campo), na ordem em que foram obtidos na amostragem sistemática. Com os dados obtidos em cada campo, calculamos com a fórmula morfométrica de AHERNE¹, o número de células de cada tipo de estrutura glandular.

À partir do número de células obtidas da contagem de cada campo, calculamos para cada estrutura glandular, a média e a respectiva variância da população nos 100 campos e a média nos primeiros 50 campos microscópicos. Esses valores calculados encontram-se na Tabela 1.

Estimativa do grau de precisão das contagens

Para a avaliação do grau de precisão nas contagens do número de células de cada categoria de estrutura, obtido em 50 campos(número utilizado para cada animal), estimamos os coeficientes de confiança associados às contagens, quando consideramos a hipótese de que o valor médio obtido e a verdadeira média da população difiram

TABELA 1 - Médias($\times 10^5$) e as respectivas variância do número de células($\times 10^6$) obtidas pela contagem realizada em 100 campos microscópicos(calculado campo a campo), das diferentes categorias celulares da glândula submandibular de um camundongo

Categoria Celular	Média($\times 10^5$) dos 100 campos	Variância($\times 10^6$) dos 100 campos	Médias($\times 10^5$) dos 50 primeiros campos
Ácino	1.485,18	287.857,75	1.481,56
Ducto Intercalar	534,98	121.848,02	536,02
Ducto Granuloso	1.247,17	219.781,90	1.240,98
Ducto Estriado	870,99	247.381,16	823,82
Estroma	509,87	55.778,87	503,78

confiança para os diferentes tipos celulares, estão apresentados na Tabela 2.

Estimativa do tamanho da amostra

No nosso experimento, ao invés de termos estabelecido o tamanho da amostra, em 50 campos microscópicos, por teste de homogeneidade, poderíamos à partir de uma contagem inicial em um dos animais

(como já apresentado), ter estimado o número necessário de campos para se obter o número de células de cada tipo de estrutura glandular, com um coeficiente de confiança, por exemplo, de 0,99 ou 99% ou uma probabilidade de erro de 1% de que a média estimada e a média verdadeira difiram no máximo de 10%. Esse valor pode ser obtido pela fórmula (deduzida da anteriormente

no máximo de 10%, pela relação: $k = \sqrt{\frac{n \cdot d^2}{\sigma^2}}$, (KISH²), onde, k = valor na tabela de distribuição t de Student, para procurar o coeficiente de confiança, n = número de campos utilizados (no nosso caso, 50); d = percentual de variação aceito entre a verdadeira média (utilizamos a melhor estimativa da média, ou seja, a média obtida em 100 campos) e a média estimada, que foi de 10%; e s^2 = variância da população (utilizamos como melhor estimativa da verdadeira variância, aquela obtida nos 100 campos).

A seguir exemplificaremos como foi calculado o coeficiente de confiança, para as células acinosas:

$$\begin{aligned} n &= 50 \\ d &= 10\% \text{ de } 1.485,18 = 148,52 \\ s^2 &= 287.857,75 \end{aligned}$$

$$k = \sqrt{\frac{50 \cdot (148,52)^2}{287.857,75}} = 1,96$$

Este valor calculado de k corresponde na tabela de distribuição de Student (com 8 graus de liberdade) a um coeficiente de confiança de 0,95 ou 95%.

Os valores de k e os respectivos coeficientes de

$$\text{apresentada): } n = \frac{\sigma^2}{\left(\frac{d}{k}\right)^2}$$

Tomando como exemplo a população de células acinosas, o cálculo é realizado da seguinte maneira:

k = 2,6 (valor obtido da tabela de distribuição de Student para um coeficiente de confiança de 99%, com ∞ graus de liberdade).

$$\begin{aligned} d &= 10\% \text{ de } 1.485,18 = 148,52 \\ s^2 &= 287.857,75 \end{aligned}$$

$$n = \frac{287.857,75}{\left(\frac{148,52}{2,6}\right)^2} = 88$$

Para se estimar o número de células acinosas com um coeficiente de confiança de 99%, devemos utilizar uma amostra de 88 campos microscópicos.

O tamanho da amostra para se estimar o número dos diferentes tipos celulares com o mesmo coeficiente de confiança de 99%, está apresentado na Tabela 3.

Pelo exposto fica claro a importância do conhe-

TABELA 2 - Valores de k calculados pela fórmula de kish e os respectivos coeficientes de confiança obtidos na tabela de distribuição de Student (com 8 grau de liberdade)

Tipo Celular	Valor de k	Coefficiente de confiança
Célula acinosa	1,96	0,95
Célula do ducto intercalar	1,08	0,72
Célula do ducto granuloso	1,88	0,94
Célula do ducto estriado	1,24	0,79
Célula do estroma	1,53	0,87

TABELA 3- Tamanho da amostra necessário para a avaliação do número de cada tipo celular com coeficiente de confiança de 99%

Tipo Celular	Valor de k para um coeficiente de confiança de 99%	Número de campos
Célula acinosa	2,6	88
Célula do ducto intercalar	2,6	289
Célula do ducto granuloso	2,6	95
Célula do ducto estriado	2,6	220
Célula do estroma	2,6	145

cimento desse método pelos pesquisadores que se utilizam dos métodos estereológicos de contagem de partículas em seus trabalhos.

Nós sugerimos para o planejamento da pesquisa que se façam as contagens iniciais, como apresentada nesse artigo, e se calcule o tamanho da amostra com um aceitável coeficiente de confiança, sempre lembrando que um alto grau de precisão ($P=0,01$, $P=0,001$, etc...) requer, às vezes, enorme consumo de tempo e esse nível de precisão pode não ser necessário na pesquisa.

ABSTRACT

The authors present in this divulgation article a method for to estimate the precision degree in the morphometric absolute cell number evaluation. This method will make possible to investigator during research project planning, to calculate from initials countings, the sample size (total number of microscopical fields) necessary to work with pre-established error level in the evaluations. This fact is very important because, sometimes depending of research objective, we don't need a very high precision degree, in this case, with the establishment of an acceptable coefficient of variation will occur a significant decrease in time consumption.

UNITERMS: Morphometry; Particle number estimation; Sampling; Error.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AHERNE, W. *Methods of counting discrete tissue components in microscopical sections*. J. Roy. Micro. Soc., v.87, p.493-508, 1967.
- 2- AHERNE, W.; DUNNILL, M.S. *Morphometry*. London, Edward Arnold, 1982.

- 3- DE LUCA, I.M.S. *Evolução das populações celulares da glândula parótida do hamster: estudo morfo-métrico, radiautográfico e microestrutural*. São Paulo, 1983. Tese (Doutorado-Ciências/Histologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

- 4- HILLIARD, J.E.; CAHN, J.W. *An evaluation of procedures in quantitative metallography for volume analysis*. Trans. Metall. Soc. Aime, p.221-344, 1961.

- 5- KISH, L. *Survey sampling*. New York, John Wiley & Sons Inc., 1965.
- 6- SCHAEFER, A.; GANDER, R.; TRACHSLER, H. *The mathematical basis of stereology*. s. e., 1970.
- 7- WEIBEL, E.R. *Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology*. Int. Rev. Cytol., v. 26, p. 235-302, 1969.
- 8- WILLIAMS, M.A. *Quantitative methods in biology*. In: Glauret A.M., ed. *Practical methods in electron microscopy*. Amsterdam, North-Holland, 1977. v. 6.