

AVALIAÇÃO DA HOMOGENEIDADE DA AMOSTRA EM MORFOMETRIA.

EVALUATION OF THE SAMPLE HOMOGENEITY IN MORPHOMETRY

Rumio TAGA

Professor Titular do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.
Pesquisador do CNPq (Proc. 521603/96-0)

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 intuito de divulgação, um método para se verificar a homogeneidade da amostra na avaliação morfométrica do número de células, da densidade de volume e da densidade de superfície. O esquema apresentado permitirá ao pesquisador na fase de planejamento do trabalho, determinar à partir de contagens preliminares, o tamanho mínimo da amostra (número de campos ou de eletromicrografias) necessário para a obtenção de resultados cientificamente consistentes, o que permitirá uma grande economia no consumo de tempo.

Unitermos: Morfometria; Amostragem; Homogeneidade.

INTRODUÇÃO

Todos os métodos estereológicos são baseados em princípios geométricos-estatísticos, derivados da probabilidade em que as imagens dos perfis da estrutura na secção histológica ou na eletromicrografia, coincidam com um sistema-teste apropriado. Deste modo, o ponto central nesses métodos está na casualização das amostras, ou seja, a escolha dos campos histológicos ou citológicos a serem confrontados com o sistema-teste, deve ser realizada por um método que elimine a ocorrência de vício na amostragem.

Por outro lado, devemos salientar que com os procedimentos de casualização, ao invés de quantificarmos o órgão ou a célula inteira, tarefa estafante e que consumiria muito tempo, examinaríamos uma pequena

amostra do órgão ou da célula, que representasse as mesmas características quantitativas do todo.

No entanto, um problema que enfrentamos é saber qual o tamanho mínimo da amostra em cada caso para a obtenção de resultados cientificamente consistentes, ou seja, estabelecer o número mínimo de campos histológicos ou de eletromicrografias a serem utilizados.

Uma das alternativas é estabelecermos esse tamanho por teste estatístico de homogeneidade da amostra.

No atual artigo de divulgação apresentaremos o teste de homogeneidade do X^2 múltiplo para ser utilizado na quantificação morfométrica da densidade de volume, densidade de superfície e densidade de partículas de múltiplas estruturas teciduais ou celulares.

Este método é baseado em indicações de MORONEY³ e foi adaptado para utilização em morfometria por A. Sesso

para a tese de doutorado de ALVARES³

Como ficou faltando uma maior divulgação desse método na área dos que utilizam da morfometria, idealizamos esse artigo à partir de contagens preliminares de células realizadas em glândulas submandibulares de camundongos pelo método morfométrico II de Aherne, que foi utilizado para o planejamento do trabalho posteriormente desenvolvido.

Avaliação do número de células pelo método morfométrico II de Aherne

No experimento que tomamos como exemplo, para ilustração do atual artigo, pretendíamos estabelecer os parâmetros morfométricos das diferentes estruturas das glândulas submandibulares do camundongo albino de laboratório, linhagem Swiss.

Um lote de 10 animais adultos escolhidos por sorteio foram utilizados.

Após sacrifício dos animais por inalação de éter etílico, as glândulas submandibulares foram 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. À seguir, foram processadas até a inclusão em parafina. Cortes semi-seriados de 6 mm de espessura foram obtidos para cada animal e corados pelo método do tricrômico de Masson.

Após contagens preliminares e teste de homogeneidade, que será mostrado adiante, foi estabelecido o número de 50 campos histológicos para a quantificação em cada animal do lote total.

Nestes 50 campos histológicos, selecionados por amostragem sistemática (veja na Figura 1 o esquema utilizado, segundo indicações de Weibel⁴), contamos com uma ocular Kpl 8X Zeiss contendo um graticulo de integração II Zeiss com 10 linhas paralelas em uma área quadrangular e objetiva 100X, o número de imagens de transsecções e núcleos inteiros (n) dos vários tipos celulares-células acinosas, dos ductos intercalares, dos ductos granulados, dos ductos estriados, dos ductos excretorios e do estroma- e o número de cruzamentos (c) que os núcleos de cada tipo celular faziam com as linhas do graticulo. De posse desses dados e conhecendo-se a área examinada (A), a distância entre as linhas (d), a espessura do corte (e) e o volume da glândula (Vp), o número de células (Ni) de cada tipo (i) na glândula foi calculado pela fórmula do método II de Aherne¹:

$$Ni = \frac{2n \cdot Vp}{A \cdot \left(\frac{c}{n} \cdot d + 2l\right)}$$

À seguir, apresentaremos como foi estabelecido o

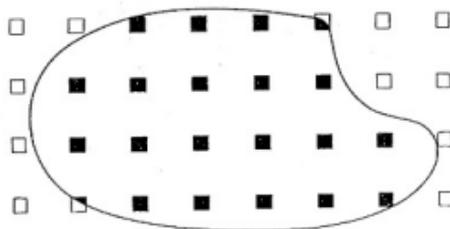


Figura 1 – Esquema de amostragem sistemática. Representa um perfil do corte da glândula onde os quadrados em negritos são os campos histológicos selecionados para as quantificações

tamanho da amostra, ou seja, o número de 50 campos histológicos utilizado por animal.

Determinação do tamanho da amostra. Teste estatístico de homogeneidade do X^2 múltiplo

Antes das contagens definitivas, escolhemos por sorteio um dos animais da amostra. Em cortes histológicos de glândulas desse animal, realizamos somente a contagem do número de transsecções e núcleos inteiros (n) dos vários tipos celulares em campos histológicos na ordem em que foram selecionados na amostragem sistemática em conjuntos de 10-10 campos, 20-20 campos e 50-50 campos. Para cada conjunto de campos quantificados, antes da contagem do conjunto seguinte, foi realizado o confronto dos resultados obtidos na 1ª. série de campos (10 primeiros campos) contra os da 2ª. série (10 segundos campos) por teste estatístico de homogeneidade da amostra. Como este teste indicou a não homogeneidade da amostra constituída por 10 campos, ou seja, os resultados obtidos nos 10 primeiros campos foram estatisticamente diferentes em nível de probabilidade de 5%, aos obtidos nos 10 segundos, partimos para a contagem do conjunto seguinte de 20-20 campos, que também mostrou não ser estatisticamente homogêneo.

Obtivemos homogeneidade com uma amostra de 50 campos histológicos, ou seja, o teste estatístico de homogeneidade não mostrou diferença estatística significativa em nível de probabilidade de 5%, entre os resultados obtidos nos primeiros 50 campos e os obtidos nos segundos 50 campos.

No sentido de exemplificarmos como os cálculos foram realizados, tomaremos os resultados obtidos no conjunto

de 50-50 campos histológicos.

Os resultados obtidos nos 50 primeiros campos (linha A), assim como os conseguidos nos 50 campos seguintes (linha B) estão apresentados na Tabela 1.

À partir dos valores observados na Tabela 1, calculamos os valores esperados, segundo as indicações

$$\frac{F \cdot i}{T}$$

No nosso caso com 2 séries de contagens, os cálculos foram realizados, como esquematizado na Tabela 3.

TABELA 1 – Resultados de duas séries de contagens do número de transecções e núcleos inteiros dos diferentes compartimentos da glândula submandibular de um camundongo adulto

Campos Microscópicos	Tipos Celulares						Total
	AC*	DI	DG	DE	DEX	E	
Série A	2227	463	2471	108	98	422	5789
Série B	2179	422	2380	91	83	458	5613
Total	4406	885	4851	199	181	880	11402

TABELA 3 – Cálculo dos valores esperados segundo esquema do Tabela 2.

Campos Microscópicos	Tipos Celulares					
	AC	DI	DG	DE	DEX	E
Série A	5789x4406 11402	5789x885 11402	5789x4851 11402	5789x199 11402	5789x181 11402	5789x880 11402
Série B	5613x4406 11402	5613x885 11402	5613x4851 11402	5613x199 11402	5613x181 11402	5613x880 11402

Os resultados calculados dos valores esperados, estão apresentados na Tabela 4.

de Moroney (1962) apresentadas no Quadro I.

Nesta tabela temos 3 linhas (A, B e C) que no nosso caso, seriam 3 séries de contagens (p. ex. 20-20-20

TABELA 2 – Esquema de cálculo dos valores esperados (Moroney, 1962)

	a	b	c	d	Total
Série A					E
Série B		$\frac{E \cdot i}{T}$			F
Série C					G
Total	h	i	j	l	T

campos) e 4 colunas (a, b, c e d) que representariam os vários tipos celulares. Os totais das linhas seriam, respectivamente, E, F e G e das colunas, h, i, j e l. O total geral seria T.

O valor esperado da casela Bb é calculado pelo produto do total da linha B (=F) pelo total da coluna b (=i), dividido pelo total geral T, ou seja:

TABELA 4 – Valores esperados

Campos Microscópicos	Tipos Celulares					
	AC	DI	DG	DE	DEX	E
Série A	2237	449	2463	101	92	447
Série B	2169	436	2388	98	89	433

De posse dos valores observados (a) e esperados (b), o X^2 para cada casela da tabela foi calculado pela relação:

$$X^2 = \frac{(\alpha - \beta)^2}{\beta}$$

Os resultados dos valores de X^2 encontram-se na Tabela 5

A soma de todos os valores de X^2 foi igual a 5,64. Este é inferior ao X^2 crítico ao nível de 5%, com 5 graus de liberdade que é igual a 11,07. Isto indica que não existe diferença entre as duas séries de medidas, ou seja, a amostra constituída de 50 campos histológicos é homogênea.

TABELA 5 – Resultados dos X^2 obtidos

Campos Microscópicos	Tipos Celulares					
	AC	DI	DG	DE	DEK	E
Série A	0,04	0,44	0,02	0,48	0,39	1,40
Série B	0,05	0,45	0,03	0,50	0,40	1,44

Na prática, principalmente quando trabalhamos com um número muito grande de indivíduos em cada grupo experimental, sugerimos que se façam as contagens preliminares como apresentada no atual artigo, e se trabalhe com a menor amostra homogênea indicada pelo teste estatístico de homogeneidade, com isso vai haver uma enorme economia no tempo gasto para as quantificações.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Tânia Mary Cestari pelo auxílio nos procedimentos laboratoriais e a Beonildes Teresinha Ruiz Correia pela digitação do manuscrito.

ABSTRACT

This divulgation article presents a method for to verify the sample homogeneity in the morphometric evaluation of volume density, surface density and cell number density. The scheme presented will make possible to researcher during work planning to establish from preliminary countings, the minimal sample size (number of microscopical fields or electronmicrographs) necessary for obtaining scientifically consistent results, that will take to a large economy in the consumed time.

UNITERMS: Morphometry; Sampling; Sample homogeneity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AHERNE, W. Methods of counting discrete tissue components in microscopical sections. *J. Roy. Micr. Soc.*, v.87, p. 493-508, 1967
- 2- ALVARES, E.P. Observações morfológicas e radioautográficas sobre citodiferenciação e proliferação celular na glândula submandibular do rato. São Paulo, 1972. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

3- MORONEY, M.J. *Facts from figures*. Baltimore, Penguin Books, 1962.

4- WEIBEL, E.R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.*, v.26, p. 235-302, 1969.

Prof. Dr. Rumio Taga

Departamento de Ciências Biológicas
Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
Al. Octávio Pinheiro Brisola, 9-75
CEP: 17043-101, Bauru, SP Brasil