

## Uso de Fluorescencia en un Método de Disector Modificado para Estimar el Número de Miocitos en el Tejido Cardíaco

Rômulo Dias Novaes<sup>1</sup>, Arlete Rita Penitente<sup>1</sup>, André Talvani<sup>2</sup>, Antônio José Natali<sup>1</sup>, Clóvis Andrade Neves<sup>1</sup>, Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado<sup>1</sup>

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa<sup>1</sup>; Universidade Federal de Ouro Preto e NUPEB, Ouro Preto<sup>2</sup>, MG, Brasil

### Resumen

**Fundamento:** Métodos convencionales de disector actualmente requieren considerables costos financieros, técnicos y operativos para estimar el número de células, incluyendo cardiomiocitos, en un área de 3D.

**Objetivo:** Usar la microscopia de fluorescencia en un método de disector modificado para determinar el número de miocitos en el tejido cardíaco en condiciones normales y patológicas.

**Métodos:** El estudio empleó ratones Wistar machos de cuatro meses de edad y peso de  $366,25 \pm 88,21$  g randomizados en grupos controles (GC, n = 8) e infectados (GI, n = 8). Los animales del GI fueron inoculados con cepa Y de *T. cruzi* (300.000 tripomastigotas/50 g). Después de ocho semanas, los animales fueron pesados y sacrificados. Los Ventrículos Izquierdos (VI) fueron removidos para análisis estereológico de la densidad numérica de cardiomiocitos (Nv [c]) y el número total de esas células en el VI (N [c]). Esos parámetros fueron estimados usando un disector fluorescente (FD) y comparados con los métodos convencionales de disector óptico (OD) y disector físico (PD).

**Resultados:** En ambos métodos de disector, los animales del GI presentaron caída significativa de Nv[c] y N[c] en comparación con los animales del GC (P > 0,05). Una correlación fuerte, igual o superior a 96%, fue obtenida entre FD, OD y PD.

**Conclusión:** El método FD parece ser igualmente confiable para determinar Nv[c] y N[c] en condiciones normales y patológicas, presentando algunas ventajas en relación a los métodos convencionales de disector: reducción de cortes histológicos e imágenes en el análisis estereológico, reducción del tiempo de análisis de las imágenes, la construcción de FD en microscopios simples, utilizando el modo de epifluorescencia, distinción de planos de disector en ampliaciones inferiores. (Arq Bras Cardiol 2012;98(3):252-258)

**Palabras clave:** Cardiomiocitos, corazón, microscopia de fluorescencia, morfología.

### Introducción

En los últimos años, grandes esfuerzos fueron hechos para desarrollar un método confiable y reproducible para estimar el número de partículas en órganos y tejidos, pero hasta 1984, todos esos métodos presentaban sesgos intrínsecos<sup>1-3</sup>. En 1984, Sterio describió diversas modificaciones en los abordajes utilizados para estimar la cantidad de objetos en el espacio tridimensional e introdujo el método de disector<sup>4</sup>. La mayoría de los autores actualmente considera el método de disector imparcial y fundamentos teóricos bien establecidos hacen que el método sea ampliamente aceptado<sup>5-7</sup>.

El disector puede ser obtenido por dos métodos diferentes con base en los mismos principios teóricos y requisitos básicos para estimar el número de partículas. Esos métodos son el disector óptico y el disector físico<sup>4,8-10</sup>. Aunque ambos métodos posean sesgos reducidos en

cuanto a la estimativa de la cantidad de partículas, ellos aun exigían la adquisición de un gran número de imágenes histológicas y mucho tiempo para realizar los recuentos. Particularmente, el disector óptico también requiere un microscopio de luz de alto costo adaptado con fase móvil del eje Z<sup>11</sup>. Además de eso, el disector físico es extremadamente trabajoso, pues requiere cortes e imágenes histológicas con un perfecto alineamiento en diferentes cortes paralelos<sup>3,10</sup>.

Considerando que el objetivo del proyecto de muestreo para la estereología es obtener la cantidad máxima de informaciones estructurales cuantitativas a un determinado costo o esfuerzo, el objetivo de este estudio fue la utilización de microscopia de fluorescencia en un método de disector modificado para determinar el número de miocitos en el tejido cardíaco en condiciones normales y patológicas. Así, un modelo murino de infección por *T. cruzi*, que reconocidamente lleva a la ruptura de miocitos cardíacos y modifica el número de esas células en el miocardio, fue utilizado<sup>12</sup>. Nuestra hipótesis es la de que el método propuesto reduciría el costo operativo observado en métodos convencionales, manteniendo la precisión de las mediciones de cantidad de células.

**Correspondencia:** Rômulo Dias Novaes •

Av. PH Rolfs, S/N - Campus Universitário - Centro - 36570-000 - Viçosa, MG, Brasil

E-mail: romuonovaes@yahoo.com.br

Artículo recibido el 08/07/11, revisado recibido el 18/08/11; aceptado el 26/08/11.

## Métodos

### Animales y los grupos experimentales

Ratones Wistar machos con cuatro meses de edad con peso inicial de  $366,25 \pm 88,21$  g recibieron ración para roedores y agua *ad libitum*, y fueron mantenidos en instalaciones animales en un ambiente controlado (temperatura a  $22 \pm 3$  °C, humedad a 60% - 70% y ciclos invertidos de luz/oscuridad de 12 horas). Los tamaños de las muestras fueron determinados considerando la probabilidad  $p = 1/2$  de que ocurriese aumento o disminución de las variables de interés. Así, considerando el nivel de significación  $\alpha = 0,05$ , el número mínimo significativo de animales utilizados en el análisis estadístico fue:  $p = (02/01)^{\text{eventos}}$ , por tanto, si  $n = 5$ ,  $p = (1/2)^5$  o  $p = 0,03$ ; entonces,  $p < 0,05^{10}$ . Debido a la variabilidad intrínseca del parasitismo en órganos-blancos y a la mortalidad asociada a la infección por *T. cruzi*, un factor de corrección de 50% fue incorporado al cálculo inicial, determinando muestras de ocho animales, aleatoriamente ubicados en los grupos control (GC,  $n = 8$ ) e infectados (GI,  $n = 8$ ).

### Infección

Animales del GI fueron inoculados intraperitonealmente con cepa Y de *T. cruzi* (300.000 tripomastigotas/peso corporal de 50 g en 1 ml de sangre de ratones infectados<sup>13</sup>. La infección fue confirmada cuatro días post inoculación por la presencia de tripomastigotas en la sangre periférica recolectada de la cola del ratón, como fue descrito por Brener<sup>14</sup>. Todos los procedimientos experimentales fueron conducidos de acuerdo con el Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, y aprobados por la Comisión de Ética en Investigación de Animales del Departamento de Veterinaria de la Universidad Federal de Viçosa, Brasil (protocolo número 30/2009).

### Análisis biométrico

Ocho semanas después de la inoculación, los animales fueron sacrificados bajo anestesia y los corazones fueron removidos. Los Ventriculos Izquierdos (VI) fueron disecados y pesados separadamente. Volumen del VI fue obtenido por el método de inmersión, donde el desplazamiento líquido del volumen del órgano fue pesado. Como la gravedad específica ( $\sigma$ ) de la solución salina isotónica es 1,0048, el volumen es obtenido por: volumen = peso/ $\sigma$ , o simplemente volumen ( $10^3$  mm<sup>3</sup>)  $\approx$  peso (g)<sup>15</sup>. El peso y volumen del VI fueron determinados incluyendo el septo interventricular.

### Procesamiento de tejidos y determinación de áreas histológicas

Los atrios y ventrículos fueron colocados en fijador histológico por 48 horas (preparado en la hora con 10% w/v de formaldehído en 0,1 M de tapón fosfato pH 7.2)<sup>16,17</sup>. Fragmentos del VI fueron obtenidos a través del método orientador para definir cortes aleatorios isotrópicos y uniformes (IUR) exigidos en el estudio estereológico<sup>3</sup>. Esos fragmentos fueron deshidratados en etanol, diafanizados en

xilol y fijados en parafina. Los bloques fueron cortados en cortes de  $3 \mu\text{m}$  y coloreados por hematoxilina-eosina (H & E) o 4',6-diamidino-2-fenilindol en 0,2% (DAPI)<sup>18</sup>.

El número representativo de disectores utilizados en el análisis estereológico para cada animal fue determinado considerando la estabilización del coeficiente de variación (CV) del número de núcleos de miocitos muestras aleatorias crecientes de disectores (5, 10, 15, 20 y 25). Entonces, la media aritmética y los respectivos CV para cada tamaño de muestra fueron calculados. Cuando el aumento de números de disectores no resultó en ninguna diferencia significativa de CV entre tres muestras consecutivas, el menor tamaño de muestra fue considerado como el tamaño mínimo representativo<sup>19</sup>. Usando ese método, la variación del número de núcleos de miocitos se estabilizó a partir de la muestra de 10 disectores.

### Métodos de disector ópticos y físicos

Cortes coloreados con H&E fueron montados en láminas histológicas utilizando el medio de montaje Entelan® (Merk, Darmstadt, Alemania) y las imágenes fueron capturadas usando un microscopio de luz (Olympus BX-60®, Tokio, Japón) conectado a una cámara digital (Olympus QColor-3®, Tokio, Japón). La observación fue hecha con un objetivo planacromático de  $100\times$  de inmersión a aceite (NA= 1,25) para identificar claramente las fronteras de los núcleos de cardiomiocitos (*cmyn*)<sup>16,17</sup>.

El número de núcleos de cardiomiocitos (*cmyn*) en una sonda tridimensional fue estimado utilizando los métodos de disector óptico (DO) y físico (PD)<sup>3</sup>. El disector consiste de dos planos paralelos destinados a hacer el muestreo de los "puntos superiores" de las partículas presentes entre los dos. El volumen de muestreo fue creado con dos cortes paralelos separados por  $3 \mu\text{m}$  (*h*) y 2 planos de referencia ambos conteniendo un soporte de ensayo ( $A_p$ ). En ambos métodos de disector, un par de fotomicrografías separados por la distancia *h* es usado para formar los dos planos de referencia. En el OD, las fotomicrografías paralelas son obtenidas en la misma área histológica ajustando el plano focal ( $h = 3 \mu\text{m}$ ), utilizando el tornillo micrométrico. En el PD, dos cortes seriales son obtenidos en el micrótopo ( $h = 3 \mu\text{m}$ ) y la misma área histológica es fotografiada en ambos cortes, proveyendo dos fotomicrografías físicamente separadas.

### Método de disector fluorescente

En el método de disector fluorescente (FD), los cortes coloreados con DAPI fueron montados en láminas histológicas utilizando solución de sacarosa de 50% en agua destilada (w/v). Las imágenes fueron capturadas en un modo de epifluorescencia del mismo microscopio usando una lámpara de mercurio HBO 100 y un filtro para excitación del pigmento a 365 nm y emisión de luz a 460 nm. La observación fue hecha con las mismas lentes planacromáticas de  $100\times$  descritos anteriormente. En ese método, usando los cortes  $3 \mu\text{m}$  (*h*), los dos planos de referencia necesarios para delimitar el disector son obtenidos en una imagen única y pares de fotomicrografías no son necesarios como en el método convencional. Además de eso, el *cmyn* presente sobre el espesor del corte puede

ser observado dentro o fuera del plano focal. Para evitar el recuento repetido de células, los cortes fueron obtenidos en semiserías utilizando 1 en cada 20 cortes. El FD fue adicionalmente obtenido con una lente objetiva de 40× apenas para demostrar la posibilidad de aplicar el método usando ampliaciones menores.

### Estimativa de la densidad numérica y número total de cardiomiocitos

La densidad numérica del *cmyn* ( $Nv[c]$ , *cmyn* por  $mm^3$ ) fue determinada a partir de 10 pares aleatorios de disectores para cada animal, definidos como  $Nv[c] = Q[cmyn] / h \times AT$ , donde  $Q$  representa el número de perfiles de *cmyn* contados en el área de test en la sección de referencia del disector (plano *look-up*)<sup>3,17</sup>. En el FD, el valor  $Q$  en la fórmula  $Nv[c]$  fue multiplicado por un factor de corrección de 0,5 para evitar la superestimación de las medidas. El número total de *cmyn* en el VI ( $N[c]$ ) fue estimado como el producto del volumen  $Nv[c] / VI$ . Los recuentos fueron realizados en  $A_T = 2.670 \mu m^2$ . Todos los análisis estereológicos fueron realizados utilizando el software Image Pro-Plus 4.5® (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

### Análisis estadístico

Todos los análisis fueron realizados utilizando la plataforma estadística GraphPad Prism (versión 5.01, GraphPad Software, San Diego, CA). Los datos son expresados como media y desvío estándar (media  $\pm$  DE). La normalidad de la distribución de los datos fue verificada por el test de Kolmogorov-Smirnov. Con base en ese test, los datos de peso y volumen fueron comparados con el test *t*. El test U de Mann-Whitney fue usado para comparar los datos estereológicos entre los grupos. Los métodos de disector fueron comparados por el test de Kruskal-Wallis y correlacionados utilizando el método de Spearman. La significación estadística fue establecida en  $\alpha = 0,05$ .

### Resultados

No hubo diferencia estadística en la masa corporal (GC,  $502,17 \pm 57,76$  g vs. GI,  $494,69 \pm 87,90$  g;  $p > 0,05$ ) y volumen del ventrículo izquierdo (GC,  $456,47 \pm 26,18$   $mm^3$  versus GI,  $487,69 \pm 34,89$   $mm^3$ ;  $p > 0,05$ ) entre los grupos.

El análisis histopatológico del VI mostró un infiltrado inflamatorio difuso acentuado en el GI. Además de eso, ese grupo tenía una desorganización de la estructura histológica con un aumento del área intersticial y mayor distancia entre los miocitos ventriculares. Esas células también mostraron un área transversal aumentada y algunas presentaron estrechamiento de la región citoplasmática inducida por una gran cantidad de formas amastigotas de *T. cruzi* (fig. 1).

El OD convencional es representado en la figura 2. En ese método, el disector fue obtenido en la misma imagen microscópica ajustándose el eje Z del microscopio para crear una separación óptica de 3  $\mu m$  entre las imágenes. En el método físico (imagen no mostrada), el disector fue obtenido usando las imágenes microscópicas de dos cortes histológicos seriales diferentes físicamente separados en la misma distancia como en el OD (3  $\mu m$ ).

El método de disector propuesto, denominado disector fluorescente (FD), es representado en la figura 3. En ese método, el disector fue obtenido en la misma imagen microscópica a través de la emisión de fluorescencia diferencial por el *cmyn*. En cuanto en el OD y PD fueron necesarias 160 fotomicrografías (80 pares de disector) en el análisis estereológico, en el FD, la mitad de las imágenes microscópicas (80 disectores individuales) fueron utilizadas.

En el FD, un factor de corrección de 50% fue incorporado a la fórmula utilizada para determinar  $Nv[c]$  en OD y PD. Así, la fórmula usada para estimar  $Nv[c]$  en el FD fue  $Nv[c] = Q[cmyn] \times 0,5 / h \times A_T$ ; donde la constante 0,5 fue creada para evitar la superestimación del recuento de *cmyn* en el FD.

Los resultados de  $Nv[c]$  y  $N[c]$  obtenidos usando los diferentes métodos de disector son presentados en la tabla 1. En ambos métodos de disector, los animales infectados presentaron caída significativa de ambas variables en relación a los animales control. No hubo diferencia significativa en los valores de esas variables, a pesar de los métodos de disector usados.

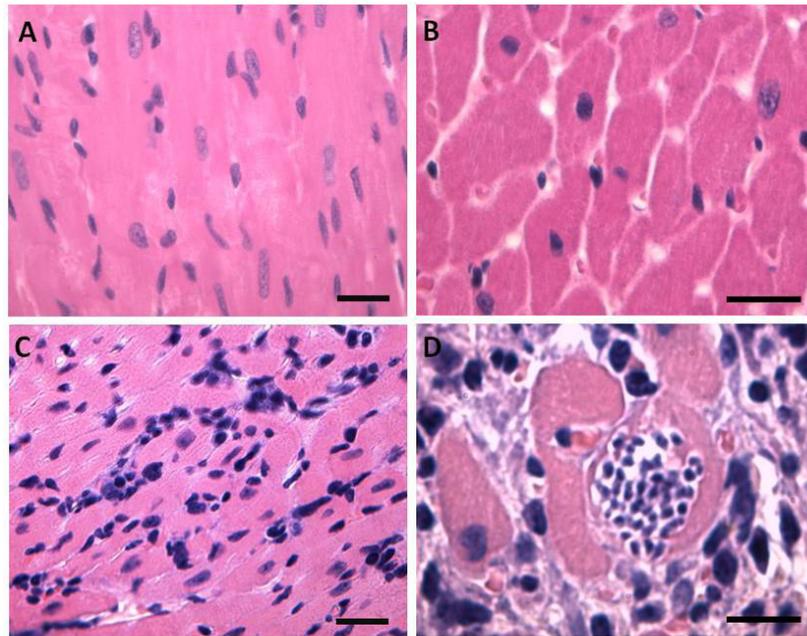
La tabla 2 muestra el resultado del análisis de correlación de  $Nv[c]$  y  $N[c]$  obtenidos usando los diferentes métodos de disector. Una correlación fuerte, directa y significativa fue obtenida en todas las correlaciones entre los métodos.

### Discusión

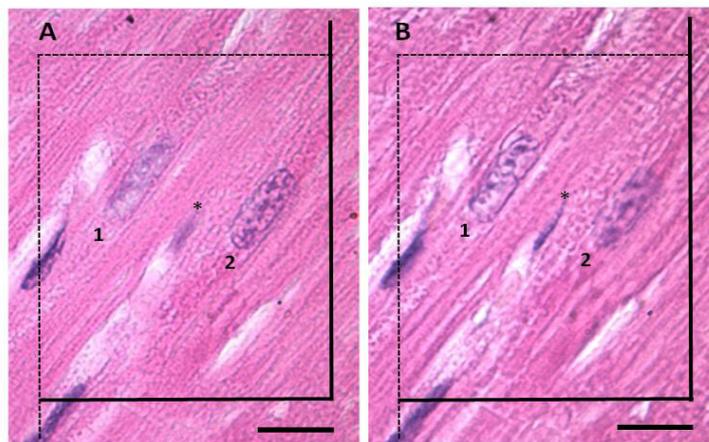
Por muchos años, los estudios morfológicos de tejidos biológicos fueron basados en descripciones histopatológicas ambiguas. Los símbolos usados para indicar el aumento o disminución de una variable es la mejor manera de expresar los datos en un contexto semicuantitativo<sup>20</sup>. A medida que esos abordajes morfológicos fueron perfeccionados, un sistema bidimensional (2D) cuantitativo fue incorporado al análisis histológico y patológica para describir las características morfométricas de órganos y tejidos<sup>1,21,22</sup>. Esos perfeccionamientos introdujeron avances significativos en los estudios histocuantitativos. Mientras tanto, la estimativa de parámetros microscópicos en un espacio tridimensional (3D) se mantuvo como una cuestión aun no bien resuelta, y los métodos convencionales morfométricos presentaban sesgos intrínsecos que reducían la confiabilidad de medidas morfológicas<sup>2,3,23</sup>.

Considerando el sesgo intrínseco de diversas medidas morfométricas, los cálculos de las estadísticas de probabilidad y geometría aplicadas en la geología y otras ciencias del suelo fueron adaptados para el estudio de materiales biológicos<sup>1,24</sup>, formando la base de la estereología actual<sup>3</sup>. El desarrollo de la estereología es una evolución importante en los métodos histocuantitativos, permitiendo el desarrollo de datos morfológico más precisos y confiables<sup>9,10,25,26</sup>.

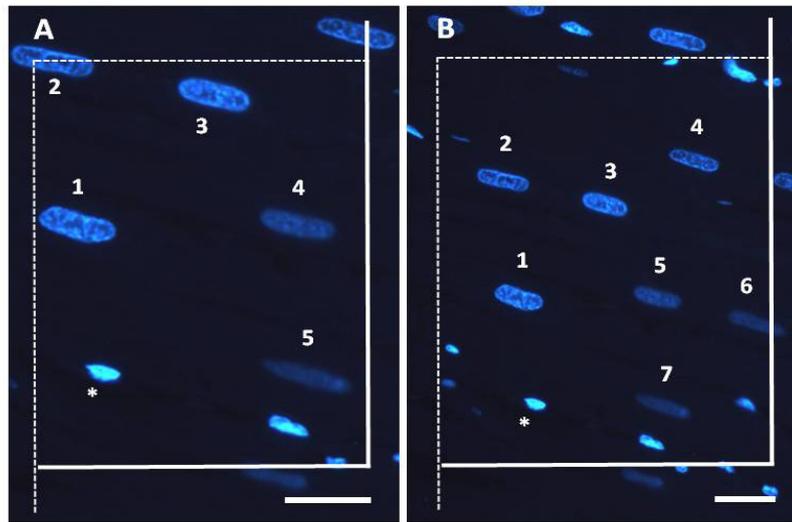
La estimativa de la cantidad de objetos en el tejido biológico ha sido una cuestión crucial en estudios morfológicos y de patología diagnósticos, constituyendo las medidas más refinadas en la estereología<sup>3,7</sup>. El desarrollo de métodos de disector por Sterio en 1984 llevó a una forma creativa y relativamente simple de estimar el número de partículas en un órgano o tejido<sup>4</sup>. Mientras tanto, el



**Figura 1** – Fotomicrografías representativas del ventrículo izquierdo de los grupos control (A y B) e infectados (C y D). Los animales infectados fueron inoculados intraperitonealmente con cepa Y de *T. cruzi* (300.000 tripomastigotas/50 g de peso corporal). (A) Corte longitudinal del miocardio mostrando una estructura bien organizada (aumento de 400×, bar = 15 μm, coloreado por H&E). En B, vemos una sección transversal del miocardio mostrando espacio reducido intersticial y una estrecha relación entre los miocitos (aumento de 100×0, bar = 15 μm, coloreado por H&E). (C) Corte longitudinal mostrando un infiltrado inflamatorio difuso y desorganización de la estructura del miocardio (aumento de 400×, bar = 15 μm, coloreado por H&E). El panel D muestra infiltrado inflamatorio difuso con aumento evidente del espacio intersticial y del diámetro del miocito. Este panel muestra un gran número de formas amastigotas de *T. cruzi* en el citoplasma de los miocitos (aumento de 100×0, bar = 15 μm, coloreado por H&E).



**Figura 2** – Fotomicrografías representativas de los dos planos focales de disector separados por 3 μm de distancia (h). El disector es la unión de un plano de referencia con un recuento imparcial sobre el área (A<sub>r</sub>) y un plano look-up a una distancia h. Los núcleos de los cardiomiocitos (cmyn) son contados o mostrados porque 1) son alcanzados por el plano de referencia, 2) sus transectos son capturados por la estructura de recuento allí presente, y 3) no son alcanzados por el plano look-down y en el borde prohibido de A<sub>r</sub> (borde grueso). (A) Hay dos cmyn en el cuadro del plano look-up (numerado) y solamente el cmyn 2 debe ser contado. En este plano, observamos también la sombra del otro cmyn (1) y un núcleo de fibroblastos fusiformes (\*) que no son contados porque violan por lo menos 1 de los 3 requisitos anteriores. (B) El cmyn 1 se encuentra en el foco del plano look-down, y el cmyn 2 es una sombra fuera del foco. Si h y A<sub>r</sub> son conocidos, el volumen del disector es determinado. Dividiendo el número de núcleos por este volumen, una estimativa directa de Nv[c] es obtenida (aumento de 100×0, bar = 15 μm, coloreado por H & E).



**Figura 3** – Fotomicrografía representativa del método disector fluorescente obtenida usando lente objetiva de 100 × (A) y 40× (B). En ese método, dos diferentes planos focales son formados en la misma imagen microscópica a través de la emisión de fluorescencia diferencial por los núcleos de los cardiomiocitos (cmyN). El cmyN superficial (plano look-up) aparece en el plano focal con mayor luminosidad y el cmyN en los planos profundos (plano look-down) es observado fuera del plano focal con baja luminosidad. La unión de esos planos de referencia a la distancia  $h$  con un cuadro imparcial de recuento de área ( $A_r$ ) constituye un disector fluorescente (FD). (A) El cmyN 1, 2 y 3 en el plano look-up pueden ser contados y los núcleos 4 y 5 están en el plano look-down y no deben ser contados. Núcleos de fibroblastos son indicados por asterisco (aumento de 100×0, bar= 15µm, coloreados por 6-diamidino-2-fenilindol). (B) Hay cuatro cmyN en el cuadro del plano look-up (1, 2, 3 y 4) que pueden ser contados. El cmyN 5, 6 son observados en el plano look-down y el núcleo 7 es capturado en el borde prohibido de  $A_r$ . Por lo tanto, estos no deben ser contados, porque ellas violan los requisitos de recuento (aumento de 400×, bar = 15 µm, coloreados por 6-diamidino-2-fenilindol). Los mismos principios para el recuento de cmyN descriptos para el disector convencional son utilizados en ese método.

**Tabla 1** – Densidad numérica y número absoluto de cardiomiocitos en el miocardio ventricular izquierdo de ratones controles y ratones infectados

	OD	PD	FD
<b>Nv[c] / mm<sup>3</sup></b>			
Controles	17.5424,64 ± 6.135,36	18.3977,32 ± 9.162,78	17.2429,44 ± 8.123,37
Infectados	90.771,41 ± 3.314,30*	95.352,20 ± 3.144,13*	91.141,127 ± 3.741,09*
<b>N[c] x 10<sup>4</sup></b>			
Controles	7.948,51 ± 471,45	8.302,75 ± 519,98	8.017,90 ± 474,789
Infectados	4.665,58 ± 318,99*	5.042,18 ± 371,44*	4.969,99 ± 354,77*

Los datos son expresados como media ± DE. OD - Disector óptico; PD - Disector físico; FD - Disector fluorescente; Nv[c] - densidad numérica de cardiomiocitos; N[c] - número absoluto de cardiomiocitos. Todos los valores fueron obtenidos usando una lente objetiva de 100× (aumento de 1000×)\*, denotando una diferencia estadística comparado al GC ( $P < 0,01$ ), test U de Mann-Whitney. No hay diferencias estadísticas entre los métodos de disector, test de Kruskal-Wallis.

método de disector aun exige una serie de requisitos técnicos que aumentan el tiempo y el costo de la adquisición de datos<sup>5,8,10</sup>. La necesidad de obtener y analizar un gran número de imágenes microscópicas es una limitación común de los métodos OD y PD, principalmente cuando varios grupos y muestras de tejidos son estudiados al mismo tiempo. Además de eso, los costos para la adquisición o adaptación de un microscopio con eje Z controlado contribuyen para limitar la aplicación del OD<sup>11</sup>. Por otro lado, la obtención de un PD es extremadamente trabajosa, pues envuelve la calidad de la microtomía, el procesamiento adecuado de cortes

seriados y capacidad técnica para determinar un alineamiento perfecto de esos cortes<sup>4</sup>. Además de eso, un mínimo error de alineamiento puede llevar a un sesgo en el recuento de células caracterizado por una superestimación o subestimación de los resultados estereológicos. Así, esos métodos convencionales de disector aun requieren considerables costos financieros, técnicos y operativos para estimar la cantidad de partículas en un área tridimensional<sup>11</sup>.

El presente estudio propone un método alternativo para estimar la cantidad de miocitos en el tejido cardíaco usando

**Tabla 2 – Correlaciones entre los resultados de densidad numérica y número absoluto de miocitos del ventrículo izquierdo obtenidos por diferentes métodos de disector en los ratones control y infectados**

	Nv[c] / mm <sup>3</sup>		N[c]	
	Correlación (r)	Valor P	Correlación (r)	Valor p
<b>Controles</b>				
OD x PD	0,98	< 0,0001	0,98	< 0,0001
OD x FD	0,96	< 0,0001	0,97	< 0,0001
PD x FD	0,96	< 0,0001	0,96	< 0,0001
<b>Infectados</b>				
OD x PD	0,99	< 0,0001	0,99	< 0,0001
OD x FD	0,97	< 0,0001	0,98	< 0,0001
PD x FD	0,97	< 0,0001	0,97	< 0,0001

OD - Disector óptico; PD - Disector físico; FD - Disector fluorescente; Nv[c] - densidad numérica de cardiomiocitos; N[c] - número absoluto de cardiomiocitos. Los resultados son relativos a los datos obtenidos usando una lente objetiva de 100× (aumento de 1000×). Las correlaciones fueron testeadas por el método de Spearman.

microscopía de fluorescencia en un método de disector modificado. La construcción de un FD se basó en los requisitos semejantes a los usados para el recuento de partículas descriptos en los métodos de disector convencionales. Mientras tanto, una adaptación de la fórmula para determinar N[c] fue necesaria en el FD. La introducción de un factor de corrección fue necesario para reducir la superestimación de las mediciones. En los métodos convencionales, los resultados del recuento de partículas excluyen aquellas que alcanzaron el plano prohibido (generalmente el plano *look-down*), contribuyendo para reducir el sesgo de medición<sup>27,28</sup>. Como en el DF, la presencia o ausencia de la misma partícula no puede ser observada en ambos planos de disector, como ocurre en el OD y en el PD. El cálculo de probabilidad determina un factor de corrección 0,5 para la fórmula N[c], considerando 50% de posibilidad de que una partícula sea observada o no en ambos planos.

La aplicación del FD con el método propuesto proveyó resultados similares de Nv[c] y N[c] en comparación con los otros métodos de disector, sin diferencias significativas entre los métodos. Ambos métodos presentaron sensibilidad suficiente para determinar la reducción del número de los miocitos en el ventrículo izquierdo en el modelo murino de infección cardíaca inducida por *T. cruzi*. Ese modelo fue seleccionado para este estudio, debido al tropismo bien establecido para el tejido cardíaco presentado por ese parásito y su capacidad de reducir el número de miocitos debido a la diferenciación, replicación y evasión de células del parásito, que se propaga en un proceso destructivo continuo<sup>12,13</sup>. Además de eso, las correlaciones entre el FD con los métodos convencionales eran fuertes, indicando que el método FD puede ser igualmente confiable para estimar el número de miocitos en el tejido cardíaco. La confiabilidad de esas medidas parece ser mantenida tanto en condiciones de salud como en condiciones patológicas.

Aunque el FD también sea un método óptico, el presente estudio demostró que el FD puede también ser obtenido utilizando lente objetiva con aumentos menores (40×), en comparación con las lentes convencionales (100×) necesarias

en el OD. En el OD, ampliaciones menores no son usadas frecuentemente porque determinan una gran profundidad de campo, lo que dificulta la adquisición de diferentes planos focales de disector (*look-up* y *look-down*), pues mantienen todas las estructuras de los cortes dentro del foco a despecho del ajuste del eje Z<sup>3</sup>.

## Conclusión

El FD descripto en este estudio ofreció un método alternativo para estimar el número de miocitos en el tejido cardíaco. Ese método parece ser confiable tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas para determinar los mismos parámetros de Nv[c] y N[c] obtenidos por métodos convencionales de disector. Aunque los resultados hayan sido semejantes entre los tres métodos, el FD mostró algunas ventajas en relación al OD y al PD, tales como: 1) reducción (por la mitad) del número de cortes histológicos y imágenes necesarias en el análisis estereológico, 2) reducción del tiempo de análisis de las imágenes necesarias, 3) construcción de FD en microscopios simples, utilizando el modo de epifluorescencia, 4) distinción de los planos de disector de *look-up* y *look-down* ampliaciones menores, 5) confiabilidad de los resultados estereológicos que envuelven costos técnicos y operativos reducidos en comparación con los métodos OD y PD.

## Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

## Fuentes de Financiación

El presente estudio no tuvo fuentes de financiación externas.

## Vinculación Académica

Este artículo forma parte de tesis de Doctorado de Rômulo Dias Novaes, por Universidade Federal de Viçosa.

## Referencias

1. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol.* 1966;30(1):23-38.
2. Aherne WA. Methods of counting discrete tissue components in microscopical sections. *J R Micr Soc.* 1967;87(3):493-508.
3. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003;75(4):469-86.
4. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc.* 1984;134(Pt2):127-36.
5. Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc.* 2001;204(Pt3):232-46.
6. Charleston LB, Thyer AC, Klein NA, Soules MR, Charleston JS. An improved method for the production of slides from oversized samples of glycol methacrylate-embedded tissues: Application for optical disector based stereology. *J Histotechnol.* 2003;26(1):49-52.
7. Eisele JC, Schaefer I-M, Nyengaard JR, Post H, Liebetanz D, Brühl A, et al. Effect of voluntary exercise on number and volume of cardiomyocytes and their mitochondria in the mouse left ventricle. *Basic Res Cardiol.* 2008;103(1):12-21.
8. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988;96(10):857-81.
9. Weibel ER. Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. *J Microsc.* 1989;155(Pt3):393-403.
10. Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol.* 1990;258(4 Pt1):148-56.
11. Xavier-Vidal R. Disector Z-axis mechanical method for stereology. *An Acad Bras Cienc.* 2010;82(2):539-44.
12. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas' heart disease. *Circulation.* 2007;115(9):1109-23.
13. Martinelli PM, Camargos ER, Azevedo AA, Chiari E, Morel G, Machado CRS. Cardiac NGF and GDNF expression during *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Auton Neurosci.* 2006;130(1-2):32-40.
14. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1962;4:389-96.
15. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie.* 1970;26(1):57-60.
16. Xavier-Vidal R, Neves MC, Villar VC, Viana WN, Mandarim-de-Lacerda CA. Estereologia do miocárdio em fetos humanos: estudo quantitativo das modificações estruturais nos dois últimos trimestres de gestação. *Arq Bras Cardiol.* 1993;60(4):221-4.
17. Xavier-Vidal R, Madi K. Comparação entre os miocárdios ventriculares direito e esquerdo durante período fetal humano: uma avaliação estereológica. *Arq Bras Cardiol.* 1999;72(5):581-6.
18. Masotti L, Cavatorta P, Avitabile M, Barcellona ML, von Berger J, Ragusa N. Characterization of 4'-6 diamidino-2 phenylindole (DAPI) as a fluorescent probe of DNA structure. *Ital J Biochem.* 1982;31(2):90-9.
19. Moro L, Vasconcelos AC, Santos FGA, Alves CM, Nunes JES, Sampaio IBM. Determination of the minimal representative number of microscopical fields to quantify apoptosis in canine lymph nodes. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2004;56(3):408-10.
20. Bucher O. [Contribution to the method of morphometry]. *Anat Anz.* 1967;120(1):39-40.
21. Rohr H. Principles, possibilities of use and limits of morphometry. *Acta Histochem Suppl.* 1976;16:83-9.
22. Rohr H, Oberholzer M, Barstsch G, Keller M. Morphometry in experimental pathology: methods, baseline data and applications. *Int Rev Exp Pathol.* 1976;15:233-325.
23. Elias H, Hyde DM. A guide to practical stereology. New York: Karger; 1983.
24. Chalkley HW. Methods for quantitative morphological analysis of tissues. *J Natl Cancer Inst.* 1943;4:47-53.
25. Collan Y. Stereology in diagnostic pathology. *Pathologica.* 1997;89(4):462-6.
26. von Bartheld C. Counting particles in tissue sections: choices of methods and importance of calibration to minimize biases. *Histol Histopathol.* 2002;17(2):639-48.
27. Weibel ER. Stereological methods: practical methods for biological morphometry. London: Academic Press; 1979.
28. Mouton PR. Principles and practices of unbiased stereology: an introduction for bioscientist. Baltimore: John Hopkins University Press; 2002.