

Uso de Fluorescência em um Método de Disector Modificado para Estimar o Número de Miócitos no Tecido Cardíaco

Use of Fluorescence in a Modified Disector Method to Estimate the Number of Myocytes in Cardiac Tissue

Rômulo Dias Novaes¹, Arlete Rita Penitente¹, André Talvani², Antônio José Natali¹, Clóvis Andrade Neves¹, Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado¹

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa¹; Universidade Federal de Ouro Preto e NUPEB, Ouro Preto², MG, Brasil

Resumo

Fundamento: Métodos convencionais de disector atualmente requerem consideráveis custos financeiros, técnicos e operacionais para estimar o número de células, incluindo cardiomiócitos, em uma área de 3D.

Objetivo: Usar a microscopia de fluorescência em um método de disector modificado para determinar o número de miócitos no tecido cardíaco em condições normais e patológicas.

Métodos: O estudo empregou ratos Wistar machos com quatro meses de idade e peso de $366,25 \pm 88,21$ g randomizados em grupos controles (GC, n = 8) e infectados (GI, n = 8). Os animais do GI foram inoculados com cepa Y de *T. cruzi* (300.000 tripomastigotas/50 g). Após oito semanas, os animais foram pesados e sacrificados. Os Ventrículos Esquerdos (VE) foram removidos para análise estereológica da densidade numérica de cardiomiócitos (Nv [c]) e o número total dessas células no VE (N [c]). Esses parâmetros foram estimados usando um disector fluorescente (DF) e comparados com os métodos convencionais de disector óptico (DO) e disector físico (DFi).

Resultados: Em ambos os métodos de disector, os animais do GI apresentaram queda significativa de Nv[c] e N[c] em comparação com os animais do GC (p > 0,05). Uma correlação forte, igual ou superior a 96%, foi obtida entre DF, DO e DFi.

Conclusão: O método DF parece ser igualmente confiável para determinar Nv[c] e N[c] em condições normais e patológicas, apresentando algumas vantagens em relação aos métodos convencionais de disector: redução de cortes histológicos e imagens na análise estereológica, redução do tempo de análise das imagens, a construção de DF em microscópios simples, utilizando o modo de epifluorescência, distinção de planos de disector em ampliações inferiores. (Arq Bras Cardiol 2012;98(3):252-258)

Palavras-chave: Cardiomiócitos, coração, microscopia de fluorescência, morfologia.

Abstract

Background: Conventional disector methods currently require considerable financial, technical and operational costs to estimate the number of cells, including cardiomyocytes, in a 3D area.

Objective: To use fluorescence microscopy in a modified disector method to determine the number of myocytes in cardiac tissue in normal and pathological conditions.

Methods: The study employed four-month-old male Wistar rats with weight of 366.25 ± 88.21 g randomized in control (CG, n=8) and infected (IG, n=8) groups. IG animals were inoculated with *T. cruzi* Y strain (300,000 trypomastigotes/50g wt). After eight weeks, the animals were weighted and euthanized. The left ventricles (LV) were removed for stereological analysis of numerical density of cardiomyocytes (Nv[c]) and total number of these cells in the LV (N[c]). These parameters were estimated using a fluorescent disector (FD) and compared with the conventional optical (OD) and physical (PD) disector methods.

Results: In both disector methods, IG animals presented significant decrease of Nv[c] and N[c] compared to CG animals (P< 0.05). There was no significant difference in these variables despite the disector method applied in CG and IG animals (P> 0.05). A strong correlation, equal or above 96%, was obtained between FD, OD and PD.

Conclusion: The FD method seems to be equally reliable to determine Nv[c] and N[c] in normal and pathological conditions and presents some advantages compared to conventional disector methods: reduction of histological slices and images in the stereological analysis, reduction of time to analyze the images, construction of FD in simple microscopes using the epifluorescence mode, distinction of disector planes in lower magnifications. (Arq Bras Cardiol 2012;98(3):252-258)

Keywords: Cardiomyocytes; fluorescence microscopy; heart; morphology.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Rômulo Dias Novaes •
Av. PH Rolfs, S/N - Campus Universitário - Centro - 36570-000 - Viçosa, MG, Brasil
E-mail: romuonovaes@yahoo.com.br
Artigo recebido em 08/07/11, revisado recebido em 18/08/11; aceito em 26/08/11.

Introdução

Nos últimos anos, grandes esforços foram direcionados para desenvolver um método confiável e reprodutível para estimar o número de partículas em órgãos e tecidos, mas até 1984, todos esses métodos apresentavam vieses intrínsecos¹⁻³. Em 1984, Sterio descreveu diversas modificações nas abordagens utilizadas para estimar a quantidade de objetos no espaço tridimensional e introduziu o método de disector⁴. A maioria dos autores atualmente considera o método de disector imparcial e fundamentos teóricos bem estabelecidos fazem que o método seja amplamente aceito⁵⁻⁷.

O disector pode ser obtido por dois métodos diferentes com base nos mesmos princípios teóricos e requisitos básicos para estimar o número de partículas. Esses métodos são o disector óptico e o disector físico^{4,8-10}. Embora ambos os métodos possuam vieses reduzidos quanto à estimativa da quantidade de partículas, eles ainda exigiam a aquisição de um grande número de imagens histológicas e muito tempo para realizar as contagens. Particularmente, o disector óptico também requer um microscópio de luz de alto custo adaptado com fase móvel do eixo Z¹¹. Além disso, o disector físico é extremamente trabalhoso, pois requer cortes e imagens histológicas com um perfeito alinhamento em diferentes cortes paralelos^{3,10}.

Considerando que o objetivo do projeto de amostragem para a estereologia é obter a quantidade máxima de informações estruturais quantitativas a um determinado custo ou esforço, o objetivo deste estudo foi a utilização de microscopia de fluorescência em um método de disector modificado para determinar o número de miócitos no tecido cardíaco em condições normais e patológicas. Assim, um modelo murino de infecção por *T. cruzi*, que reconhecidamente leva à ruptura de miócitos cardíacos e modifica o número dessas células no miocárdio, foi utilizado¹². Nossa hipótese é a de que o método proposto reduziria o custo operacional observado em métodos convencionais, mantendo a precisão das medições de quantidade de células.

Métodos

Animais e os grupos experimentais

Ratos Wistar machos com quatro meses de idade com peso inicial de $366,25 \pm 88,21$ g receberam ração para roedores e água *ad libitum*, e foram mantidos em instalações animais em um ambiente controlado (temperatura a 22 ± 3 °C, umidade a 60% - 70% e ciclos invertidos de luz/escurecimento de 12 horas). Os tamanhos das amostras foram determinados considerando a probabilidade $p = 1/2$ de ocorrer aumento ou diminuição das variáveis de interesse. Assim, considerando o nível de significância $\alpha = 0,05$, o número mínimo significativo de animais utilizados na análise estatística foi: $p = (02/01)^{\text{eventos}}$; portanto, se $n = 5$, $p = (1/2)^5$ ou $p = 0,03$; então, $p < 0,05^{10}$. Devido à variabilidade intrínseca do parasitismo em órgãos-alvo e à mortalidade associada à infecção por *T. cruzi*, um fator de correção de 50% foi incorporado ao cálculo inicial, determinando amostras de oito animais, aleatoriamente

alocados nos grupos controle (GC, $n = 8$) e infectados (GI, $n = 8$).

Infecção

Animais do GI foram inoculados intraperitonealmente com cepa Y de *T. cruzi* (300.000 tripomastigotas/peso corporal de 50 g em 1 ml de sangue de ratos infectados¹³). A infecção foi confirmada quatro dias pós-inoculação pela presença de tripomastigotas no sangue periférico coletado da cauda do rato, como descrito por Brener¹⁴. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa de Animais do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (protocolo número 30/2009).

Análise biométrica

Oito semanas após a inoculação, os animais foram sacrificados sob anestesia e os corações foram removidos. Os Ventrículos Esquerdos (VE) foram dissecados e pesados separadamente. Volume do VE foi obtido pelo método de imersão, onde o deslocamento líquido do volume do órgão foi pesado. Como a gravidade específica (σ) da solução salina isotônica é 1,0048, o volume é obtido por: volume = peso/ σ , ou simplesmente volume (10^3 mm³) \approx peso (g)¹⁵. O peso e volume do VE foram determinados incluindo o septo interventricular.

Processamento de tecidos e determinação de áreas histológicas

Os átrios e ventrículos foram colocados em fixador histológico por 48 horas (preparado na hora com 10% w/v de formaldeído em 0,1 M de tampão fosfato pH 7.2)^{16,17}. Fragmentos do VE foram obtidos através do método orientador para definir cortes aleatórios isotrópicos e uniformes (IUR) exigidos no estudo estereológico³. Esses fragmentos foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em cortes de 3 μ m e corados por hematoxilina-eosina (H & E) ou 4',6-diamidino-2-fenilindol em 0,2% (DAPI)¹⁸.

O número representativo de disectores utilizados na análise estereológica para cada animal foi determinado considerando-se a estabilização do coeficiente de variação (CV) do número de núcleos de miócitos em amostras aleatórias crescentes de disectores (5, 10, 15, 20 e 25). Então, a média aritmética e os respectivos CV para cada tamanho de amostra foram calculados. Quando o aumento de números de disectores resultou em nenhuma diferença significativa de CV entre três amostras consecutivas, o menor tamanho de amostra foi considerado como o tamanho mínimo representativo¹⁹. Usando esse método, a variação do número de núcleos de miócitos estabilizou-se a partir da amostra de 10 disectores.

Métodos de disector ópticos e físicos

Cortes corados com H&E foram montados em lâminas histológicas utilizando o meio de montagem Entelan[®]

(Merk, Darmstadt, Alemanha) e as imagens foram capturadas usando um microscópio de luz (Olympus BX-60®, Tóquio, Japão) conectado a uma câmera digital (Olympus QColor-3®, Tóquio, Japão). A observação foi feita com uma objetiva planacromática de 100× de imersão a óleo (NA= 1,25) para identificar claramente as bordas dos núcleos de cardiomiócitos (*cmyn*)^{16,17}.

O número de núcleos de cardiomiócitos (*cmyn*) em uma sonda tridimensional foi estimado utilizando os métodos de disector óptico (DO) e físico (DFi)³. O disector consiste de dois planos paralelos destinados a fazer a amostragem dos “pontos superiores” das partículas presentes entre os dois. O volume de amostragem foi criado com dois cortes paralelos separados por 3 μm (*h*) e 2 planos de referência ambos contendo uma área de teste (*A_T*). Em ambos os métodos de disector, um par de fotomicrografias separadas pela distância *h* é usado para formar os dois planos de referência. No DO, as fotomicrografias paralelas são obtidas na mesma área histológica ajustando o plano focal (*h* = 3 μm), utilizando o parafuso micrométrico. No DFi, dois cortes seriais são obtidos no micrótomo (*h* = 3 μm) e a mesma área histológica é fotografada em ambos os cortes, fornecendo duas fotomicrografias fisicamente separadas.

Método de disector fluorescente

No método de disector fluorescente (DF), os cortes corados com DAPI foram montados em lâminas histológicas utilizando solução de sacarose de 50% em água destilada (w/v). As imagens foram capturadas em um modo de epifluorescência do mesmo microscópio usando uma lâmpada de mercúrio HBO 100 e um filtro para excitação do pigmento a 365 nm e emissão de luz a 460 nm. A observação foi feita com as mesmas lentes planacromáticas de 100× descritas anteriormente. Nesse método, usando os cortes 3 μm (*h*), os dois planos de referência necessários para delimitar o disector são obtidos em uma imagem única e pares de fotomicrografias não são necessários como no método convencional. Além disso, o *cmyn* presente sobre a espessura do corte pode ser observado dentro ou fora do plano focal. Para evitar a contagem repetida de células, os cortes foram obtidos em semisséries utilizando 1 em cada 20 cortes. O DF foi adicionalmente obtido com uma lente objetiva de 40× apenas para demonstrar a possibilidade de aplicar o método usando ampliações menores.

Estimativa da densidade numérica e número total de cardiomiócitos

A densidade numérica do *cmyn* (Nv[*c*], *cmyn* por mm³) foi determinada a partir de 10 pares aleatórios de dissectores para cada animal, definidos como $Nv[c] = Q[cmyn] / h \times A_T$, onde *Q* representa o número de perfis de *cmyn* contados na área de teste na seção de referência do disector (plano *look-up*)^{3,17}. No DF, o valor *Q* na fórmula Nv[*c*] foi multiplicado por um fator de correção de 0,5 para evitar a superestimação das medidas. O número total de *cmyn* no VE (N[*c*]) foi estimado como o produto do Nv[*c*] / volume do VE. As contagens foram realizadas em *A_T* = 2.670 μm². Todas as análises estereológicas foram realizadas utilizando o software Image Pro-Plus 4.5® (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas utilizando a plataforma estatística GraphPad Prism (versão 5.01, GraphPad Software, San Diego, CA). Os dados são expressos como média e desvio padrão (média ± DP). A normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Com base nesse teste, os dados de peso e volume foram comparados com o teste *t*. O teste U de Mann-Whitney foi usado para comparar os dados estereológicos entre os grupos. Os métodos de disector foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis e correlacionados utilizando o método de Spearman. A significância estatística foi estabelecida em $\alpha=0,05$.

Resultados

Não houve diferença estatística na massa corporal (GC, 502,17 ± 57,76 g vs. GI, 494,69 ± 87,90 g; *p* > 0,05) e volume do ventrículo esquerdo (GC, 456,47 ± 26,18 mm³ versus GI, 487,69 ± 34,89 mm³; *p* > 0,05) entre os grupos.

A análise histopatológica do VE mostrou um infiltrado inflamatório difuso acentuado no GI. Além disso, esse grupo tinha uma desorganização da estrutura histológica com um aumento da área intersticial e maior distância entre os miócitos ventriculares. Essas células também mostraram uma área transversal aumentada e algumas apresentaram estreitamento da região citoplasmática induzida por uma grande quantidade de formas amastigotas de *T. cruzi* (fig. 1).

O DO convencional é representado na figura 2. Nesse método, o disector foi obtido na mesma imagem microscópica ajustando-se o eixo Z do microscópio para criar uma separação óptica de 3 μm entre as imagens. No método físico (imagem não mostrada), o disector foi obtido usando as imagens microscópicas de dois cortes histológicos seriais diferentes fisicamente separados na mesma distância como no DO (3 μm).

O método de disector proposto, denominado disector fluorescente (DF), é representado na figura 3. Nesse método, o disector foi obtido na mesma imagem microscópica através da emissão de fluorescência diferencial pelo *cmyn*. Enquanto no DO e DFi foram necessárias 160 fotomicrografias (80 pares de disector) na análise estereológica, no DF, metade das imagens microscópicas (80 dissectores individuais) foi utilizada.

No DF, um fator de correção de 50% foi incorporado à fórmula utilizada para determinar Nv[*c*] em DO e DFi. Assim, a fórmula usada para estimar Nv[*c*] no DF foi $Nv[c] = Q[cmyn] \times 0,5 / h \times A_T$; onde a constante 0,5 foi criada para evitar a superestimação da contagem de *cmyn* no DF.

Os resultados de Nv[*c*] e N[*c*] obtidos usando os diferentes métodos de disector são apresentados na tabela 1. Em ambos os métodos de disector, os animais infectados apresentaram queda significativa de ambas as variáveis em relação aos animais controle. Não houve diferença significativa nos valores dessas variáveis, apesar dos métodos de disector usados.

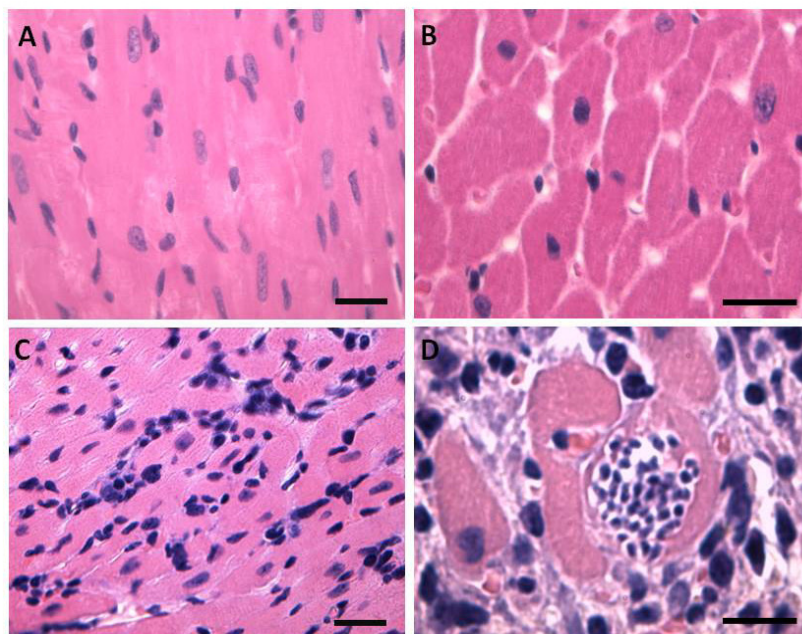


Fig. 1 – Fotomicrografias representativas do ventrículo esquerdo dos grupos controle (A e B) e infectados (C e D). Os animais infectados foram inoculados intraperitonealmente com cepa Y de *T. cruzi* (300.000 tripomastigotas/50 g de peso corporal). (A) Corte longitudinal do miocárdio mostrando uma estrutura bem organizada (aumento de 400 \times , barra = 15 μ m, corado por H&E). Em B, vemos uma seção transversal do miocárdio mostrando espaço reduzido intersticial e uma estreita relação entre os miócitos (aumento de 100 \times , barra= 15 μ m, corado por H&E). (C) Corte longitudinal mostrando um infiltrado inflamatório difuso e desorganização da estrutura do miocárdio (aumento de 400 \times , barra = 15 μ m, corado por H&E). O painel D mostra infiltrado inflamatório difuso com aumento evidente do espaço intersticial e do diâmetro do miócito. Este painel mostra um grande número de formas amastigotas de *T. cruzi* no citoplasma dos miócitos (aumento de 100 \times , barra= 15 μ m, corado por H&E).

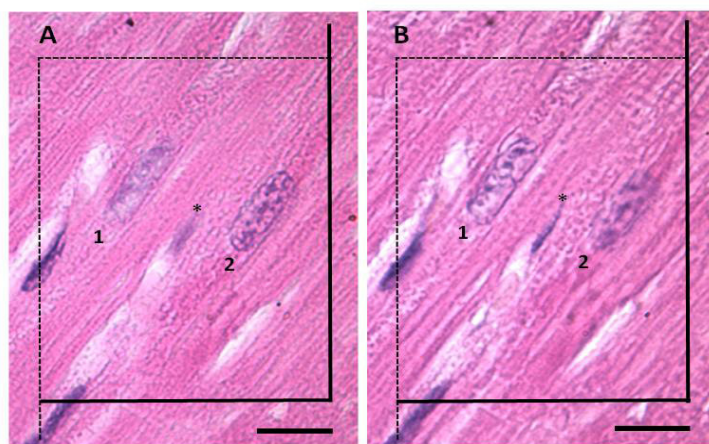


Fig. 2 – Fotomicrografias representativas dos dois planos focais de disector separados por 3 μ m de distância (*h*). O disector é a união de um plano de referência com uma área imparcial de contagem (AT) e um plano look-up a uma distância *h*. Os núcleos dos cardiomiócitos (*cmyn*) são contados ou amostrados porque 1) são atingidos pelo plano de referência, 2) seus transectos são capturados pela estrutura de contagem lá presente, e 3) não são atingidos pelo plano look-down e na borda proibida de AT (borda grossa). (A) Há dois *cmyn* no quadro do plano look-up (numerado) e somente o *cmyn* 2 deve ser contado. Neste plano, observamos também a sombra do outro *cmyn* (1) e um núcleo de fibroblastos fusiformes (*) que não são contados porque violam pelo menos 1 dos 3 requisitos anteriores. (B) O *cmyn* 1 encontra-se no foco do plano look-down, e o *cmyn* 2 é uma sombra fora do foco. Se *h* e AT são conhecidos, o volume do disector é determinado. Dividindo o número de núcleos por este volume, uma estimativa direta de $Nv[c]$ é obtida (aumento de 100 \times , barra= 15 μ m, corado por H & E).

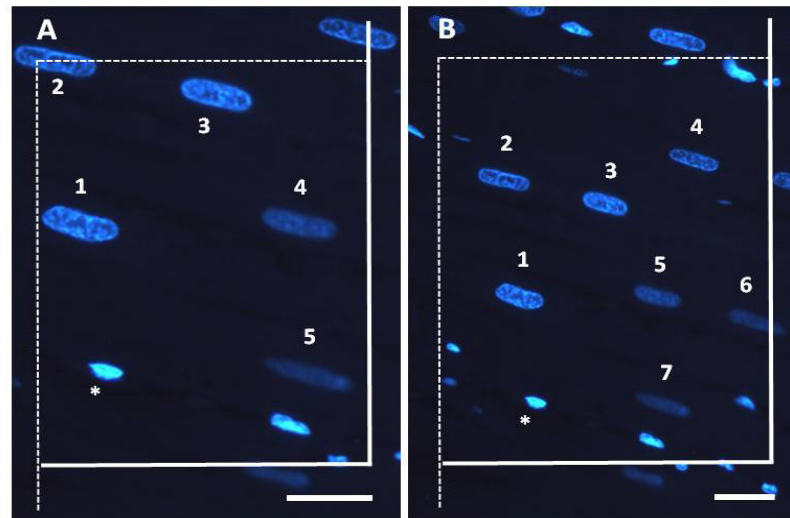


Fig. 3 – Fotomicrografia representativa do método disector fluorescente obtida usando lente objetiva de 100 × (A) e 40× (B). Nesse método, dois diferentes planos focais são formados na mesma imagem microscópica através da emissão de fluorescência diferencial pelos núcleos dos cardiomiócitos (cmyn). O cmyn superficial (plano look-up) aparece no plano focal com maior luminosidade e o cmyn nos planos profundos (plano look-down) é observado fora do plano focal com baixa luminosidade. A união desses planos de referência à distância *h* com uma área imparcial de contagem (AT) constitui um disector fluorescente (DF). (A) O cmyn 1, 2 e 3 no plano look-up podem ser contados e os núcleos 4 e 5 estão no plano look-down e não devem ser contados. Núcleos de fibroblastos são indicados por asterisco (aumento de 100×, barra= 15µm, corados por 6-diamidino-2-fenilindol). (B) Há quatro cmyn no quadro do plano look-up (1, 2, 3 e 4) que podem ser contados. O cmyn 5, 6 são observados no plano look-down e o núcleo 7 é capturado na borda proibida de AT. Portanto, estes não devem ser contados, porque elas violam os requisitos de contagem (aumento de 400×, barra = 15 µm, corados por 6-diamidino-2-fenilindol). Os mesmos princípios para a contagem de cmyn descritos para o disector convencional são utilizados nesse método.

Tabela 1 – Densidade numérica e número absoluto de cardiomiócitos no miocárdio ventricular esquerdo de ratos controles e ratos infectados

	DO	DFi	DF
Nv[c] / mm³			
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*
N[c] x 10⁴			
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*

Os dados são expressos como média ± DP. DO - Disector ótico; DFi - Disector físico; DF - Disector fluorescente; Nv[c] - densidade numérica de cardiomiócitos; N[c] - número absoluto de cardiomiócitos. Todos os valores foram obtidos usando uma lente objetiva de 100× (aumento de 1000×)*, denotando uma diferença estatística comparado ao GC ($p < 0,01$), teste U de Mann-Whitney. Não há diferenças estatísticas entre os métodos de disector, teste de Kruskal-Wallis.

A tabela 2 mostra o resultado da análise de correlação de Nv[c] e N[c] obtidos usando os diferentes métodos de disector. Uma correlação forte, direta e significativa foi obtida em todas as correlações entre os métodos.

Discussão

Por muitos anos, os estudos morfológicos de tecidos biológicos foram baseados em descrições histopatológicas ambíguas. Inicialmente, a utilização de símbolos para indicar o aumento

ou diminuição de uma variável representava a melhor maneira para expressar os dados em um contexto semiquantitativo²⁰. À medida que essas abordagens morfológicas foram aperfeiçoadas, um sistema bidimensional (2D) quantitativo foi incorporado à análise histológica e patológica para descrever as características morfométricas de órgãos e tecidos^{1,21,22}. Esses aperfeiçoamentos introduziram avanços significativos nos estudos histoquantitativos. No entanto, a estimativa de parâmetros microscópicos em um espaço tridimensional (3D) manteve-se como uma questão ainda não bem resolvida, e os métodos convencionais morfométricos

Tabela 2 – Correlações entre os resultados de densidade numérica e número absoluto de miócitos do ventrículo esquerdo obtidos por diferentes métodos de disector nos ratos controle e infectados

	Nv[c] / mm ³		N[c]	
	Correlação (r)	Valor p	Correlação (r)	Valor p
Controles				
DO x DFi	0,98	< 0,0001	0,98	< 0,0001
DO x DF	0,96	< 0,0001	0,97	< 0,0001
DFi x DF	0,96	< 0,0001	0,96	< 0,0001
Infectados				
DO x DFi	0,99	< 0,0001	0,99	< 0,0001
DO x DF	0,97	< 0,0001	0,98	< 0,0001
DFi x DF	0,97	< 0,0001	0,97	< 0,0001

DO - Disector ótico; DFi - Disector físico; DF - Disector fluorescente; Nv[c] - densidade numérica de cardiomiócitos; N[c] - número absoluto de cardiomiócitos. Os resultados são relativos aos dados obtidos usando uma lente objetiva de 100× (aumento de 1000×). As correlações foram testadas pelo método de Spearman.

apresentavam vieses intrínsecos que reduziam a confiabilidade de medidas morfológicas^{2,3,23}.

Considerando o viés intrínseco de diversas medidas morfométricas, os cálculos das estatísticas de probabilidade e geometria aplicadas na geologia e outras ciências do solo foram adaptados para o estudo de materiais biológicos^{1,24}, formando a base da estereologia atual³. O desenvolvimento da estereologia é uma evolução importante nos métodos histoquantitativos, permitindo o desenvolvimento de dados morfológico mais precisos e confiáveis^{9,10,25,26}.

A estimativa da quantidade de objetos no tecido biológico tem sido uma questão crucial em estudos morfológicos e de patologia diagnósticos, constituindo as medidas mais refinadas na estereologia^{3,7}. O desenvolvimento de métodos de disector por Sterio em 1984 levou a uma forma criativa e relativamente simples de estimar o número de partículas em um órgão ou tecido⁴. No entanto, o método de disector ainda exige uma série de requisitos técnicos que aumentam o tempo e o custo da aquisição de dados^{5,8,10}. A necessidade de obter e analisar um grande número de imagens microscópicas é uma limitação comum dos métodos DO e DFi, principalmente quando vários grupos e amostras de tecidos são estudados ao mesmo tempo. Além disso, os custos para a aquisição ou adaptação de um microscópio com eixo Z controlado contribuem para limitar a aplicação do DO¹¹. Por outro lado, a obtenção de um DFi é extremamente trabalhosa, pois envolve a qualidade da microtomia, o processamento adequado de cortes seriados e capacidade técnica para determinar um alinhamento perfeito dessas cortes⁴. Além disso, um mínimo erro de alinhamento pode levar a um viés na contagem de células caracterizado por uma superestimação ou subestimação dos resultados estereológicos. Assim, esses métodos convencionais de disector ainda requerem consideráveis custos financeiros, técnicos e operacionais para estimar a quantidade de partículas em um área tridimensional¹¹.

O presente estudo propõe um método alternativo para estimar a quantidade de miócitos no tecido cardíaco usando microscopia de fluorescência em um método de disector modificado. A construção de um DF baseou-se

nos requisitos semelhantes aos usados para a contagem de partículas descritos nos métodos de disector convencionais. No entanto, uma adaptação da fórmula para determinar N[c] foi necessária no DF. A introdução de um fator de correção foi necessário para reduzir a superestimação das medições. Nos métodos convencionais, os resultados da contagem de partículas excluem aquelas que atingiram o plano proibido (geralmente o plano *look-down*), contribuindo para reduzir o viés de medição^{27,28}. Como no DF, a presença ou ausência da mesma partícula não pode ser observada em ambos os planos de disector, como ocorre no DO e no DFi. O cálculo de probabilidade determina um fator de correção 0,5 para a fórmula N[c], considerando 50% de chance de uma partícula ser observada ou não em ambos os planos.

A aplicação do DF com o método proposto forneceu resultados similares de Nv[c] e N[c] em comparação com os outros métodos de disector, sem diferenças significativas entre os métodos. Ambos os métodos apresentaram sensibilidade suficiente para determinar a redução do número dos miócitos no ventrículo esquerdo no modelo murino de infecção cardíaca induzida por *T. cruzi*. Esse modelo foi selecionado para este estudo, devido ao tropismo bem estabelecido para o tecido cardíaco apresentado por esse parasita e sua capacidade de reduzir o número de miócitos devido à diferenciação, replicação e evasão celular, que se propaga em um processo destrutivo contínuo^{12,13}. Além disso, as correlações entre o DF com os métodos convencionais foram fortes, indicando que o método DF pode ser igualmente confiável para estimar o número de miócitos no tecido cardíaco. A confiabilidade dessas medidas parece ser mantida tanto em condições de saúde quanto em condições patológicas.

Embora o DF também seja um método óptico, o presente estudo demonstrou que o DF pode também ser obtido utilizando lente objetiva com aumentos menores (40×), em comparação com as lentes convencionais (100×) necessárias no DO. No DO, ampliações menores não são usadas frequentemente porque determinam uma grande profundidade de campo, o que dificulta a aquisição de diferentes planos focais de disector (*look-up* e *look-down*), pois mantém todas as estruturas dos cortes dentro do foco a despeito do ajuste do eixo Z³.

Conclusão

O DF descrito neste estudo ofereceu um método alternativo para estimar o número de miócitos no tecido cardíaco. Esse método parece ser confiável tanto em condições normais quanto em condições patológicas para determinar os mesmos parâmetros de $N_v[c]$ e $N[c]$ obtidos por métodos convencionais de disector. Embora os resultados tenham sido semelhantes entre os três métodos, o DF mostrou algumas vantagens em relação ao DO e ao DFi, tais como: 1) redução (pela metade) do número de cortes histológicos e imagens necessárias na análise estereológica, 2) redução do tempo de análise das imagens necessárias, 3) construção de DF em microscópios simples, utilizando o modo de epifluorescência, 4) distinção dos planos de disector de *look-up* e *look-down* ampliações menores, 5) confiabilidade dos resultados

estereológicos que envolvem custos técnicos e operacionais reduzidos em comparação com os métodos DO e DFi.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Rômulo Dias Novaes pela Universidade Federal de Viçosa.

Errata

Considerar correto e utilizar para citação o título do artigo "Uso de Fluorescência em um Método de Disector Modificado para Estimar o Número de Miócitos no Tecido Cardíaco" ao invés de "Uso de Fluorescência em um Método de Dissector Modificado para Estimar o Número de Miócitos no Tecido Cardíaco", publicado em ahead of print.

Referências

- Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol.* 1966;30(1):23-38.
- Aherne WA. Methods of counting discrete tissue components in microscopical sections. *J R Micro Soc.* 1967;87(3):493-508.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003;75(4):469-86.
- Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc.* 1984;134(Pt2):127-36.
- 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.
- 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.
- Eisele JC, Schaefer I-M, Nyengaard JR, Post H, Liebetanz D, Brüel 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.
- 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.
- Weibel ER. Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. *J Microsc.* 1989;155(Pt3):393-403.
- Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol.* 1990;258(4 Pt1):148-56.
- Xavier-Vidal R. Disector Z-axis mechanical method for stereology. *An Acad Bras Cienc.* 2010;82(2):539-44.
- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas' heart disease. *Circulation.* 2007;115(9):1109-23.
- 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.
- 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.
- Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie.* 1970;26(1):57-60.
- Xavier-Vidal R, Neves MC, Villar VC, Viana WN, Mandarin-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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bucher O. [Contribution on the method of morphometry]. *Anat Anz.* 1967;120(1):39-40.
- Rohr H. Principles, possibilities of use and limits of morphometry. *Acta Histochem Suppl.* 1976;16:83-9.
- 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.
- Elias H, Hyde DM. A guide to practical stereology. New York: Karger; 1983.
- Chalkley HW. Methods for quantitative morphological analysis of tissues. *J Natl Cancer Inst.* 1943;4:47-53.
- Collan Y. Stereology in diagnostic pathology. *Pathologica.* 1997;89(4):462-6.
- 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.
- Weibel ER. Stereological methods: practical methods for biological morphometry. London: Academic Press; 1979.
- Mouton PR. Principles and practices of unbiased stereology: an introduction for bioscientist. Baltimore: John Hopkins University Press; 2002.