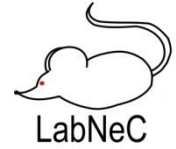




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PEDRO VITOR FREIXIELA ADAMCZYK



**MÉTODOS ESTEREOLÓGICOS E NÃO ESTEREOLÓGICOS PARA
CONTAGEM DE NEURÔNIOS IMUNOREATIVOS PARA DOUBLECORTINA
NO HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS: Uma revisão sistemática da literatura.**

Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

30 de novembro de 2016

PEDRO VITOR FREIXIELA ADAMCZYK

**MÉTODOS ESTEREOLÓGICOS E NÃO ESTEREOLÓGICOS PARA
CONTAGEM DE NEURÔNIOS IMUNOREATIVOS PARA DOUBLECORTINA
NO HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS: Uma revisão sistemática da literatura.**

Trabalho de conclusão do curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.
Orientadora: Profa. Dra. Cilene Lino de
Oliveira.

Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

30 de novembro de 2016

Agradecimentos

Primeiramente um especial agradecimento a toda minha família, em especial a meu Pai e minha Mãe, cuja dedicação e exemplo possibilitaram toda minha trajetória até aqui. Também a minha irmã e meu cunhado, sempre presentes em minha vida e me dando apoio.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Neurobiologia do Comportamento e colaboradores próximos, em especial a minha orientadora Profa. Cilene.

Meu muito obrigado também a todos os meus colegas de curso e de universidade, mas de maneira ímpar meus queridos amigos: Anderson, Artur, Bruno, Caio, João, Letícia, Leonardo, Otávio e Rafael.

Agradeço também a todos os meus amigos Suricatos.

Em especial a meus grandes amigos Cleber, Lucas e Thiago.

E por fim para aquela que divide comigo cada momento de minha existência, muito obrigado Carla.

“A ordem é um caos por decifrar.” – Livro dos Conformes.

Resumo

A neurogênese em mamíferos adultos, desde que foi introduzida, é um campo crescente da neurobiologia. Esse campo apresenta grande dependência de análises quantitativas na extração de resultados e conclusões, através da contagem de neurônios. A Doublecortina (DCX) é uma proteína associada aos microtúbulos que tem forte expressão em precursores neuronais e neurônios imaturos. Essa proteína possui largo uso na marcação de células neonatas, tanto para análise morfológica quanto para sua contagem. Métodos de contagens onde o número absoluto de células é quantificado em uma observação bidimensional de partículas tridimensionais tem se mostrado limitados na confiabilidade das estimativas realizadas. A partir da década de 80 do século XX um novo método chamado estereologia começou a ser mais desenvolvido e introduzido no meio da quantificação histológica. Este novo método foi dito não-enviesado pois eliminava suposições sobre tamanho, forma e disposição das partículas contadas por oferecer uma visão tridimensional das partículas observadas. Subsequentemente foram desenvolvidos aprimoramentos e técnicas nesse método, como o método *design-based* para definição de amostragem *a priori* e do método do fracionador óptico, que combina o esquema de amostragem fracionador e o dissector óptico para observação. No presente trabalho foi realizada uma revisão sistemática da quantificação de neurônios imunoistoquimicamente tratados para a marcação da DCX, tanto para trabalhos estereológicos quanto não-estereológicos. No intuito de estabelecer uma comparação e analisar as vantagens do método estereológico, bem como para a extração de dados para o desenvolvimento de protocolo para uma contagem estereológica. Foram analisados 21 trabalhos extraíndo-se todos os dados para presentes sobre o método de amostragem utilizados nos mesmos. O resultado da análise indica que a quantidade de informações publicadas não nos permite comparar os erros de contagem entre os métodos estereológicos e não estereológicos na quantificação de DCX no hipocampo de roedores.

Abstract

Adult neurogenesis in mammals is a growing field on the study of neurobiology. This field requires quantitative analysis, through the counting of neurons regions of the brain, for drawing results and conclusions. Doublecortin (DCX) is a microtubule-associated protein expressed by neuronal precursor cells and immature neurons. DCX has a broad use as a marker of newborn cells, for the purpose of morphological and quantitative analysis. Methods counting the absolute number of cells on a bidimensional basis have limitations such as the low accuracy of the estimates due to methodological bias. Unbiased methods, such as Stereology, began to be more developed eliminating the necessity for assumptions of size, shape e position of the quantified particles, for enabling a tridimensional view of them. Thereafter other developments were introduced in this method, like the design-based method for the definitions of *a priori* sampling schemes, and the optical fractionator method, which combines the fractionator sampling scheme with the optical disector for observation. The main aim in this study is to compare the coefficient of error between stereological and non-streological methods used in the quantification of DCX immunoreactive cells (DCX-ir) in the hippocampus of rodents. Additionally, a protocol for unbiased quantification of DCX-ir should be created. For that, a systematic review about the stereological and non-stereological methods to the quantification of DCX-ir and a pilot study to unbiased quantification were performed. Analysis of the systematic review revealed the incompleteness of the literature making comparisons between methods unrealistic. The pilot study indicates that more studies are necessary to know the real advantages of the stereological methods in the counting of DCX-ir.

Sumário

1. Introdução	7
2. Objetivos	12
2.1 Objetivos Gerais.....	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. Material e Métodos	13
3.1 Revisão sistemática.....	13
3.2 Protocolo da revisão sistemática	13
3.3 Extração dos resultados de interesse	14
3.4 Microscopia e análise de imagens	14
4. Resultados	16
4.1 Rastreamento da revisão sistemática	16
4.2. Dados extraídos da bibliografia selecionada na revisão sistemática	16
4.3 Imagens obtidas	18
5. Discussão	21
6. Referências	23

1. Introdução

A neurogênese pode ser definida como o processo de gerar neurônios funcionais a partir de precursores. Este fenômeno era tradicionalmente caracterizado por ocorrer somente durante as fases embrionárias e perinatal nos mamíferos. Porém, estudos posteriores demonstraram evidências para o aparecimento e presença pós-natal de células granulares no giro denteado do hipocampo de ratos (ALTMAN e DAS, 1965). Posteriormente, a integração funcional destes novos neurônios ao sistema nervoso central foi demonstrada (PATON e NOTTEBOHM, 1984). Além disso, foi observado que a neurogênese é um processo que ocorre durante toda a vida em quase todos os vertebrados examinados, incluindo humanos (ERIKSSON et al., 1998).

Em condições fisiológicas, a neurogênese adulta em mamíferos está restrita a duas áreas específicas do cérebro, a zona subgranular no giro denteado do hipocampo (ZSG) e a zona subventricular dos ventrículos laterais (ZSV) (GAGE, 2000; LANDGREN e CURTIS, 2011). Na ZSG se originam as novas células granulares denteadas enquanto os novos neurônios que surgem na ZSV migram pelo eixo rostral até o bulbo olfatório para tornarem-se interneurônios (GAGE, 2000). A neurogênese é um processo dinâmico, altamente refinado e sujeito a modulação por diversos estímulos, fisiológicos, patológicos e farmacológicos (GAGE, 2000). Por exemplo, o tratamento crônico com fármacos antidepressivos aumenta a maturação de neurônios e o aumento da arborização em sua morfologia (SANTARELLI et al., 2003). Além disso, tem sido observada uma relação entre o aumento da neurogênese hipocampal e o efeito antidepressivo dos fármacos (SANTARELLI et al., 2003).

Diversos métodos são utilizados para a identificação das etapas e quantificação da taxa de neurogênese (CANALIA et al., 2007; LANDGREN e CURTIS, 2011). Os neurônios novos pós-mitóticos em fase de diferenciação têm forte expressão de Doublecortina (DCX), uma proteína associada aos microtúbulos que é crítica para a sua migração radial (ZHANG et al., 2009). Portanto, a imunistoquímica para DCX pode ser útil para identificação dos neurônios novos nas regiões neurogênicas fornecendo uma ferramenta útil para se obter dados quantitativos para neurogênese. Esta análise quantitativa da neurogênese é feita pela contagem de células expressando DCX na região (ZHANG et al., 2009). A análise quantitativa de células é uma poderosa ferramenta de estudo, não apenas no estudo da neurogênese como numa série de diversas áreas da histologia e neuroanatomia (SCHMITZ e HOF, 2005). Apesar da

utilidade da imunorreatividade de DCX para identificar neurônios novos não encontramos na literatura protocolos detalhados sobre como realizar a sua quantificação.

Um método utilizado para estimativa do número de células é realizado com a observação das imagens de duas dimensões dos cortes histológicos vistos em microscopia ótica. Nesta abordagem são necessários pressupostos sobre forma e a distribuição das células pois se configura como uma análise bidimensional de partículas tridimensionais (WEST, 2002; SCHMITZ e HOF, 2005). Os erros sistemáticos oriundos da aplicação dos pressupostos de forma, posição e distribuição podem tornar enviesados os resultados de uma contagem (MOUTON, 2002). A estereologia, um método desenvolvido posteriormente, seria menos enviesado por ter menos pressupostos a respeito das partículas a serem contadas. Originalmente a palavra estereologia foi cunhada para designar métodos que possibilitem interpretações tridimensionais baseadas em observações feitas em cortes bidimensionais, portanto, com resultados menos enviesados (SCHMITZ e HOF, 2005).

Baseando-se nos princípios de estereologia, Sterio (1984) propôs um método de quantificação denominado de método de contagem por dissecação utilizando sondas (do inglês probe) para observar o tecido e contar as partículas presentes no mesmo utilizando uma moldura (do inglês frame, Figura 1) de contagem para inclusão e exclusão de objetos (GUNDERSEN, 1987). O método de contagem por dissecação avalia pares de seções físicas de amostras histológicas sequenciais e separadas por uma distância conhecida, chamadas de dissecações (STERIO, 1984). Onde as partículas apenas são contabilizadas sendo observadas na seção primeira, ou de referência, e ausentes na subsequente (Figura 2) (GUNDERSEN, 1987). A análise das dissecações provê uma visão tridimensional das partículas (WEST, 2002), evitando assim, o viés inerente da contagem de partículas tridimensionais observadas em duas dimensões (Figura 2). Este método atingiu aceitação, pois não necessitava de pressupostos sobre tamanhos, formas ou orientação das partículas diminuindo assim o erro sistemático (WEST, 2002; SCHMITZ e HOF, 2005). Posteriormente este método sofreu modificações e derivou variadas vertentes, como por exemplo o método *Design-based*. Este método utiliza-se de condições de amostragem *a priori* que eliminam preocupações e correções devido a geometria das partículas, sendo mais livre de pressupostos, e conseqüentemente menos enviesado (SLOMIANKA e WEST, 2005). Atualmente, a

estereologia *Design-based* representa uma série de ferramentas, baseadas em um contexto estatístico e estocástico, de uma amostragem pautada na representatividade do tecido total (SCHMITZ e HOF, 2005).

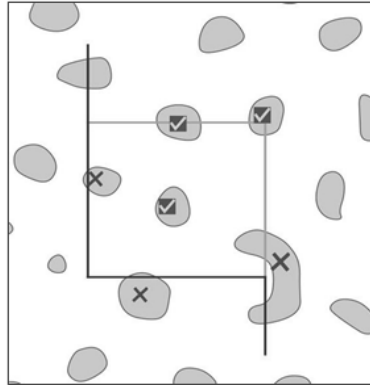


Figura 1. Moldura (Frame) de contagem. Mostrando linha de exclusão (escura) e linha de inclusão (clara). Fonte: stereology.info

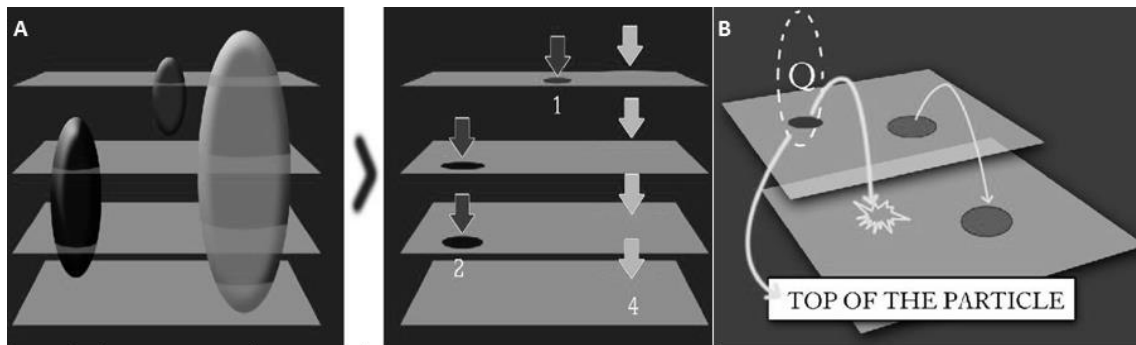


Figura 2. (A) Os efeitos da geometria das partículas na análise. (B) Aplicação do método do dissecador de Sterio, onde a partícula "Q" é contada apenas quando aparece no corte de referência. Fonte: Kaplan et al., 2012.

Outro desenvolvimento que tornou-se padrão no campo da estereologia é o dissecador óptico (Figura 3). O dissecador óptico é uma sonda tridimensional feita em cortes histológicos espessos, onde o foco de um microscópio é utilizado para deslocar pelo eixo-Z e assim utilizar o método da dissecção de Sterio em secções ópticas em vez de secções físicas, não sendo necessários múltiplos cortes e pressupostos da distância dos mesmos (SCHMITZ e HOF, 2005). Esse método também possibilita a utilização de uma Zona de guarda (Guard Zone), que consiste em uma região dentro da profundidade da amostra que é ignorada na observação, evitando artefatos histológicos devido ao corte ou encolhimento do tecido (KEUKER, 2001) (Figura 4). No método *Design-based*, a combinação do dissecador óptico com um método de amostragem chamado de esquema fracionador são chamados juntos de Fracionador óptico (CRUZ-ORIVE,

1997). Esse esquema de amostragem fracionador envolve um esquema de amostragem ao mesmo tempo aleatório e sistemático para contagem de uma área de interesse determinada (CRUZ-ORIVE, 1997). A amostragem é a parte mais importante desse método, pois ela deve ser representativa de todo o tecido. Uma amostragem sistemática consiste em utilizar uma periodicidade definida, com um início e o tamanho da periodicidade aleatórias, onde todas as partes da região de interesse tenham igual chance de serem observadas (GUNDERSEN et al., 1999). Neste caso tanto as secções a serem escolhidas como as regiões observadas dentro das lâminas seguem este padrão (Figura 4). Na região de interesse dentro da secção este efeito é atingido utilizando uma Grade (Grid) (Figura 4) definida *a priori* para regular os saltos e os locais observados e dentro desta Grade a Moldura (Frame) desenvolvido por Gunderesen para a contagem (WEST, 2012) (Figura 4). Assim, este sistema requer uma amostragem menor para atingir uma estimativa precisa do número celular em uma região de interesse (WEST, 2012).

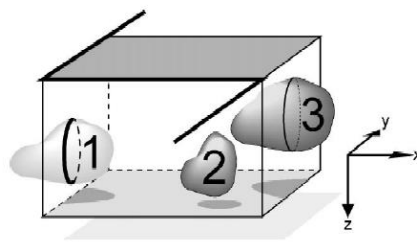


Figura 3. Sonda do Dissecção óptica. Fonte: Keuker, 2001.

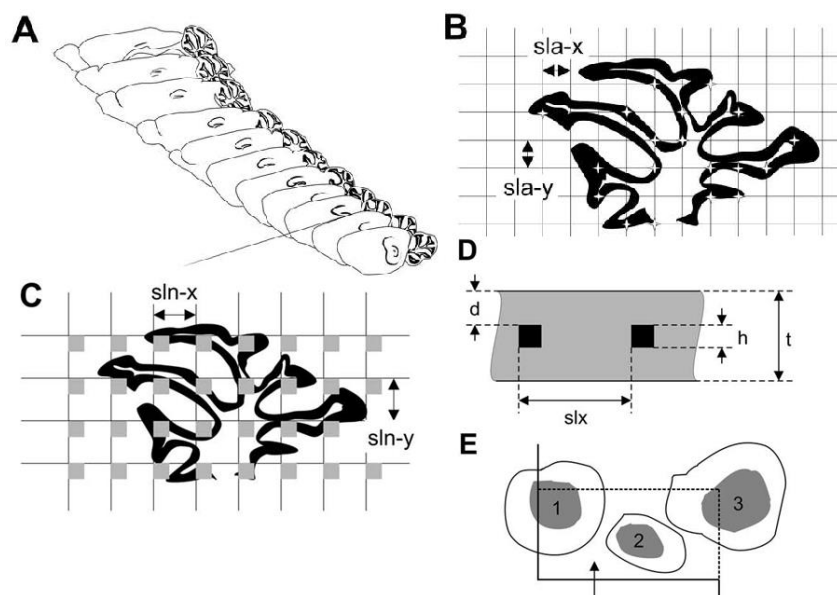


Figura 4. (A) Exemplo de seleção das secções a serem observadas. (B) Região de interesse e configuração da Grade de contagem. (C) Configuração dos campos de visão do microscópio dentro da Grade de contagem. (D) Observação lateral do corte indicando: “t” como altura total, “d” como a zona de guarda e “h” como o tamanho da sonda de observação. (E) Visão da moldura de contagem dentro do campo de visão do microscópio. (Fonte: Schmitz e Hof, 2005.)

Três tipos de amostra de frações são usados no método do fracionador óptico. Primeiramente, a fração de amostragem da secção (do inglês section sampling fraction) (ssf), representa o número total de secções (ou cortes histológicos) amostradas ao longo da estrutura inteira serialmente seccionada. A fração de amostragem da área (do inglês area sampling fraction) (asf) corresponde à área da secção que é investigada na amostra com a moldura (frame). E por último a fração de amostragem da espessura (do inglês thickness sampling fraction) (tsf) corresponde a altura da sonda (KEUKER, 2001). Sendo assim o número total de partículas (N) de uma dada estrutura do cérebro é obtida através da multiplicação da razão inversa das frações com o total de partículas contadas (SQ-), por estrutura cerebral, obtidas no dissector óptico (KEUKER, 2001). Temos então a equação (1). Asf é definido pelo equação (2), onde “a” caracteriza a área do frame de contagem e “dx.dy” a área interna das grades utilizadas para a observação e os saltos dentro da região de interesse (KEUKER, 2001). Hsf é definido pela equação (3), onde “h” é caracterizado pelo tamanho da espessura da sonda (Figura 4), ou seja da secção óptica, e tQ- é a espessura média da secção (KEUKER, 2001).

$$(1) N = \sum Q \cdot (1/ssf) \cdot (1/asf) \cdot (1/hsf)$$

$$(2) Asf = a/(dx.dy)$$

$$(3) Hsf = h/ tQ-$$

Outra estimativa complementar utilizada nesse método do fracionador óptico é a estimativa de Cavalieri, comumente utilizado para estimar volume de regiões específicas, como por exemplo o hipocampo (SCHMITZ e HOF, 2005). Cavalieri teorizou que dois sólidos, incluídos entre um par de planos paralelos, terão volumes proporcionais a razão do conjunto de todos os planos paralelos que os intersecta, desde que as áreas destes planos tenham a mesma razão. Apesar da aplicação do método do fracionador óptico para a quantificação de imunoistoquímica para DCX não encontramos na literatura protocolos detalhados sobre como realizar esta quantificação. Além disso, não está claro se o emprego de métodos estereológicos diminui os erros de contagem da imunoistoquímica para DCX em comparação aos métodos não-estereológicos. O cálculo do Coeficiente de erro (CE) é importante para estimar a precisão e acurácia das medidas. Assim, o presente estudo tem por objetivo comparar o erro sistemático (CE) dos métodos estereológicos com o dos métodos não-estereológicos nesta área de pesquisa além de propor um protocolo detalhado de contagem de DCX eliminando ou reduzindo os erros sistemáticos.

Para atingir os objetivos propomos uma revisão bibliográfica sistemática para o levantamento dos valores de CE e seus componentes em contagens estereológicas e não estereológicas da imunoistoquímica para DCX. O CE nestas contagens é composto por dois componentes, a variância pela imprecisão de contagem, VAR(Noise), e a variância causada pelo esquema de amostragem uniforme e sistemática das secções, VAR(SURS) configurado pela equação (4) (HOSSEINI-SHARIFABAD e NYENGAARD, 2007).

$$(4) CE = \sqrt{VAR(Noise) + VAR(Surs)}$$

O coeficiente de variância, CV, é dado por $CV = s.d./mean$ (HOSSEINI-SHARIFABAD e NYENGAARD, 2007). Mais informações sobre o erro sistemático, o coeficiente do erro e seus componentes pode ser encontrado em Gundersen et al. 1999. Além disso, espera-se obter informações sobre os fatores necessários para utilização de métodos de contagem estereológicas e a posterior criação de um protocolo aplicável em pesquisa.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral:

O presente estudo tem por objetivo comparar o erro sistemático (CE) dos métodos estereológicos com o dos métodos não estereológicos nesta área de pesquisa além de propor um protocolo detalhado de contagem de DCX eliminando ou reduzindo os erros sistemáticos.

2.2 Objetivos específicos:

a- Realizar uma revisão sistemática sobre os valores de erros sistemáticos e seus componentes em contagens estereológicas e não estereológicas na quantificação de imunoistoquímica para DCX.

b- Realizar uma metanálise com os valores e informações disponíveis da revisão sistemática.

c- Analisar os fatores relevantes para utilização do método estereológico definido neste trabalho.

d- Criação de um protocolo para utilização do método estereológico em quantificações posteriores.

3. Material e Métodos

3.1 Revisão sistemática

Neste trabalho realizamos uma revisão bibliográfica de forma sistemática definindo a priori um protocolo a ser seguido, discriminando no mesmo os parâmetros para o rastreamento e seleção dos artigos para posterior análise. Nesse protocolo, primeiramente, definimos os objetivos da revisão, demarcando resultados e população de interesse. Em seguida definimos os métodos indicando: 1-A base de dados utilizada; 2-A estratégia de busca dentro da base, delimitada pelos objetivos; 3-As fases e níveis de rastreamento dentro da busca; 4-E finalmente os diversos critérios de inclusão e exclusão dos trabalhos examinados.

3.2. Protocolo da Revisão sistemática

3.2.1. População de interesse: Ratos e Camundongos.

3.2.2. Resultados de interesse: Número de células imunorreativas para DCX ou de suas partes, bem como tamanho do erro sistemático associado à contagem destas mesmas células.

3.2.3. Base de dados utilizada: MEDLINE via PubMed.

3.2.4. Estratégia de busca: Definida palavras-chave como sendo, ((brain) AND neuron) AND counting). Estas foram definidas no intuito de incluir um grande escopo de trabalhos relevantes, porém com um número razoável para aplicação do rastreamento. Foram determinadas a partir de testes com variadas buscas baseadas nas palavras-chave do trabalho de revisão de estereologia em neurociência de Schmitz e Hof, 2005.

3.2.5. Fases: Fase 1: análise de resumo e Fase 2: análise de texto completo.

3.2.6. Critérios de Inclusão/exclusão:

a- Tipo de estudo: Exclui artigos que não possuem dados quantitativos.

b- Tipo de população: Ratos e camundongos de qualquer tipo, excluindo demais espécies.

c- Tipo de resultados: Inclui artigos que indiquem no resultado quantificação de células imunorreativas para DCX, excluindo os que não possuem.

d- Restrição linguística: Nenhuma.

e- Restrição de data de publicação: Nenhuma.

3.3. Extração dos resultados de interesse

Dos trabalhos analisados foram extraídos os seguintes dados:

Para trabalhos estereológicos:

- a- Espessura do corte analisado.
- b- Número de secções analisadas.
- c- Intervalo entre as secções analisadas.
- d- Tamanho das unidades da Grade (Grid).
- e- Tamanho da Moldura (Frame)
- f- Tamanho do dissector óptico.
- g- Tamanho da Zona de guarda (Guard zone).
- h- Valor do Coeficiente de erro (CE).

Para trabalhos não-estereológicos:

- a- Espessura do corte analisado.
- b- Número de secções analisadas.
- c- Valor do Coeficiente de erro (CE) ou dado similar referente à erro sistemático do método aplicado na quantificação.

Além destes dados foram extraídos quaisquer informações relevantes para análise, entendimento e reprodução dos métodos utilizados na quantificação.

3.4 Microscopia e análise de imagens

No presente trabalho foram realizadas captações de imagens para posterior análise e extração de dados para realização de um teste piloto utilizando o método do fracionador óptico.

As imagens foram obtidas de regiões quaisquer do Giro denteado de ratos adultos. Foram utilizadas lâminas previamente preparadas em nosso laboratório contendo cortes histológicos de cinquenta micrometros de cérebros de ratos adultos

imunoistoquimicamente tratados para marcação da Doublecortina (DCX) (Possamai et al., 2015). Essas imagens foram realizadas utilizando microscopia em dois equipamentos distintos, sendo eles:

a- Leica DMI6000 B Microscope (Confocal). Em aumento da objetiva de 20x e 63x. Para análise de profundidade através do eixo Z, e teste da moldura (Frame).

b- Digitalizador de lâminas Axio Scan. Aumento da objetiva de 10x a 40x. Para análise de todo o Giro denteado e teste da Grade (Grid).

4. Resultados

4.1. Rastreamento da revisão sistemática

Aplicando o protocolo para revisão anteriormente descrito obtivemos, primeiramente, após aplicação da estratégia de busca na base de dados o número de 1157 artigos compatíveis com a busca. Desses 1157 trabalhos foram selecionados 21 através do rastreamento utilizando os critérios de inclusão e exclusão.

4.2. Dados extraídos da bibliografia selecionada na revisão sistemática

Todos os 21 artigos selecionados apresentavam dados quantitativos a cerca de neurônios DCX+ localizado no giro denteado de ratos ou camundongos adultos. Desses 21 trabalhos, 15 contêm dados de métodos estereológicos e, conseqüentemente, 6 possuem métodos não-estereológicos. Dentre os 15 estudos estereológicos apenas 1, Llorens-Martín et al. 2006, não utilizou o método do fracionador óptico, e mesmo esse 1 sendo classificado pelos autores como dissector físico, o método utilizado possuía alterações utilizando microscopia confocal, o que na prática o aproxima em resultado do dissector óptico. Em todos esses 15 estudos estereológicos a microscopia confocal foi utilizada para obter os resultados, mais predominante no papel de possibilitar o dissector óptico através do eixo-Z do microscópio.

Relatos sobre os valores dos CE estavam presentes em 6 dos 15 estudos estereológicos e ausentes nos trabalhos empregando métodos não-estereológicos. Dentre os trabalhos que mostram valores para o erro sistemático apenas um deles (Llorens-Martín et al. 2006) mostrou as variáveis e expõe o processo que levou ao valor de CE. O relato dos dados necessários para cálculo de CE ou para a reprodução dos métodos quantitativos variaram de trabalho para trabalho, como apresentado nas tabelas 1 (medidas estereológicas) e 2 (medidas não-estereológicas). Dentre os trabalhos usando métodos estereológicos, cinco relataram que a escolha do valor final ideal dos parâmetros de amostragem (tabela 1) foi feita após um teste piloto. Porém nenhum destes ou dos demais 11 estudos estereológicos mostraram qualquer informação destes testes piloto ou como foram desenvolvidos. Em todos os trabalhos foram indicadas fontes variadas como referência para o desenvolvimento do método e do esquema de amostragem sendo que 14 do total indicavam fontes genéricas, difusas e indiretas sobre quantificação estereológica e nenhuma fonte com observação similar aquela realizada no artigo. 2 casos indicaram referências bibliográficas diretas para o desenvolvimento

do esquema de amostragem, porém em nenhum dos casos foi possível a derivação dos valores dos trabalhos utilizando as referências indicadas. Sendo que em 1 desses casos a referência apontava para outra referência direta e a mesma também mostrou-se insuficiente de dados.

Todos os artigos utilizando métodos não-estereológicos fizeram uma contagem integral das células de interesse encontradas nas secções reservadas para contagem. Nenhum destes trabalhos indica informação sobre qualquer tipo de viés ou erro sistemático pelo método. Assim como nenhum desses estudos aponta qualquer tipo de fator de correção do número de células para obter o resultado final. Todos os trabalhos usando métodos não-estereológicos apontam regras para a observação das células, mais especificamente, sobre o aparecimento e desaparecimento da célula no foco do microscópio e sobre a contagem. Apenas dois destes estudos relatam mais detalhes sobre a realização da contagem e o papel do observador tais como contagem cega ou o método de observação da secção no microscópio.

Tabela 1: Dados extraídos das bibliografias utilizando métodos estereológicos.

Artigo	Espessura da secção (µm)	Número de Secções	Número de intervalo entre as secções	Grade (µm)	Moldura (µm)	h (µm)	Zona de Guarda	CE
Acosta et al. 2013	40	x	6	125x125	100x100	x	x	<0.07
Bregy et al. 2012	15	x	x	70x70	35x35	9	3	0.04-0.07
Ekane et. Al. 2010	x	x	x	100x100	22x22	x	x	x
Elibol-can et al. 2014	50	16-22	3	120x120	12x12	10	x	0.02-0.04
Jinno et al. 2011	40	12	x	200x200	23x23	x	2	x
Keiner et al. 2008	40	x	12	95x145	60x60	15	x	x
Kim et al. 2009	40	x	x	x	x	x	x	x
Kunze et al. 2015	40	x	x	x	x	x	x	x
Llorens-Martín et al. 2006	50	x	x	x	x	6	x	0.01-0.05
Ojo et al. 2013	50	x	5 a 6	100x100	40x40	5	2	<0.05
Pietranera et al. 2010	50	6	8	x	x	x	x	x
Rao et al.	x	x	15	x	x	x	x	x
Saul et al. 2014	40	x	12	200x200	60x60	15	15	x
Stefovska et al. 2008	50	x	x	400x400	60x60	10	x	0.021-0.039
Zhang et al. 2009	16	x	6	480x480	30x30	x	x	x

Dados contidos, respectivamente: Espessura do corte histológico em µm; número de secções observadas; intervalo entre as secções observadas; tamanho da Grade de contagem (Grid) em µm; tamanho da Moldura (Frame) em µm; tamanho da profundidade do dissecor óptico (h) em µm; Tamanho da Zona de guarda (Guard zone) em µm; valor do Coeficiente de erro (CE). “x” indica valores ausentes no trabalho.

Tabela 2: Dados extraídos das bibliografias utilizando métodos não-estereológicos.

Artigos	Espessura da secção (μm)	Número de secções analisadas	CE ou similar
Balentova et al. 2014	30	10 a 15	x
Groves et al. 2016	50	1 a cada 5 do total	x
Llorens-Martín et al. 2010	50	x	x
McClure et al. 2013	40	1 a cada 10 do total	x
Fu et al. 2016	30	1 a cada 12 do total	x
Tskiti et al. 2014	x	x	x

Dados contidos, respectivamente: Espessura do corte histológico em μm ; número de secções observadas; valor de coeficiente de erro ou dado similar. “x” indica valores ausentes no trabalho.

4.3 Imagens obtidas

Neste trabalho diversas imagens foram obtidas para posterior análise. Imagens sequenciais e com distâncias uniformes (Figura 5) foram realizadas em Leica DMI6000 B Microscope (Confocal) em campo claro e posteriormente observadas para análise de diferentes profundidades através do eixo-Z do microscópio confocal. Essas imagens foram realizadas com aumento da objetiva de 63 vezes, com distâncias de 1-2 μm num total percorrido de 10-12 μm . Foram realizadas também as projeções máximas, que consiste na compilação desses estratos em uma única imagem (Figura 6).

Também foram obtidas imagens utilizando o equipamento Digitalizador de lâminas Axio Scan que realiza a digitalização da lâmina inteira. Isso permite uma varredura por toda a lâmina, possibilita a observação das região de interesse como um todo e viabiliza teste e criação da grade de contagem (Figura 7).

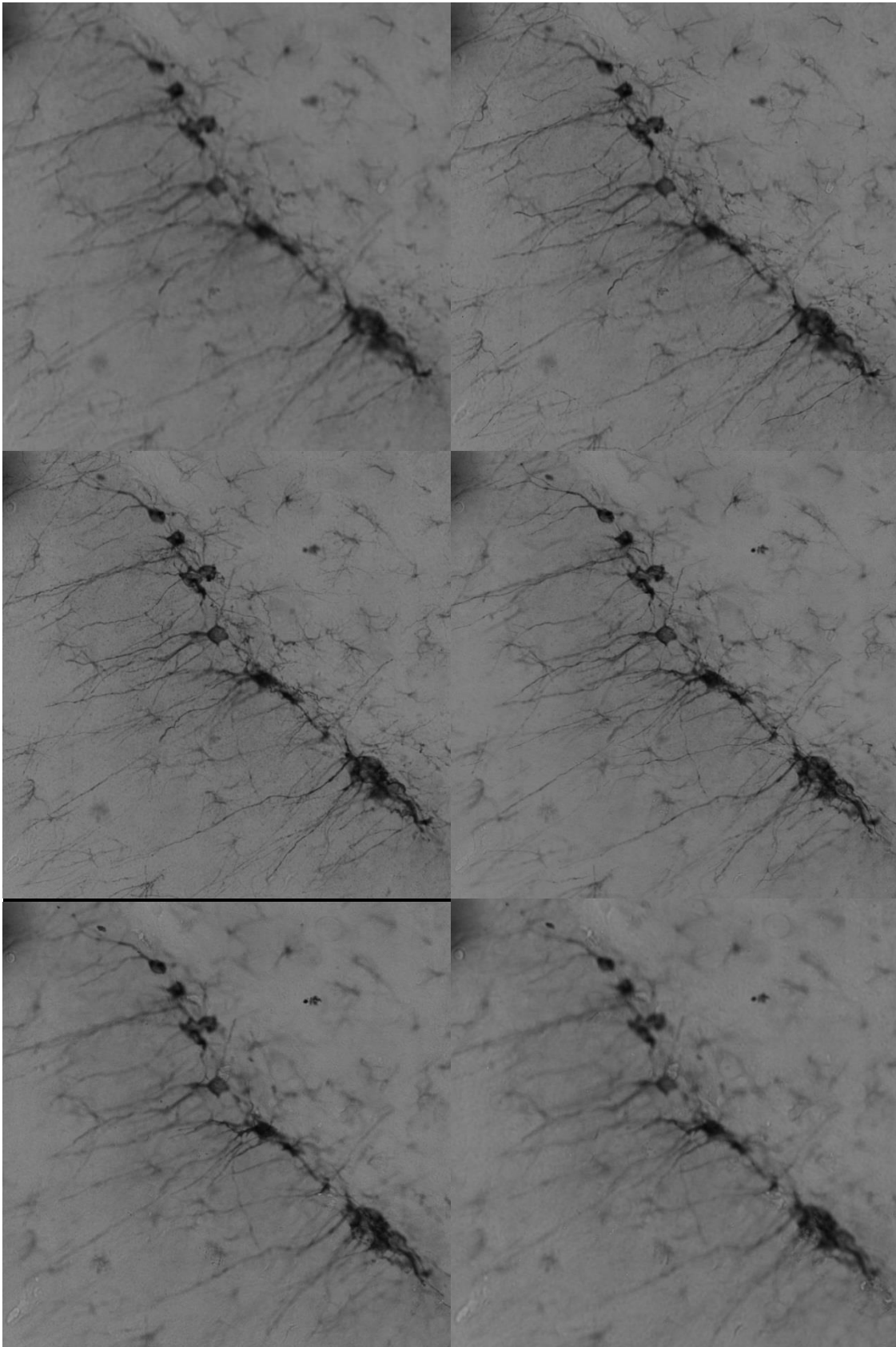


Figura 5. Sequência de fotos ao longo do eixo-Z (profundidade) . Sequência da esquerda para a direita, de cima para baixo, do foco superior para o inferior da secção. Com uma distância percorrida de 12 μm com diferença de 2 μm entre as imagens.

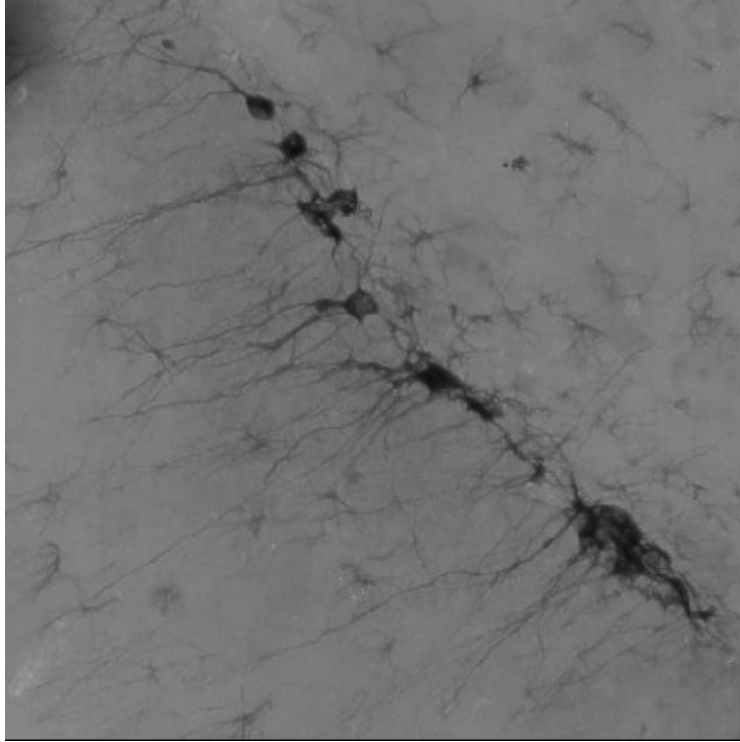


Figura 6. Imagem com projeção máxima de todos os estratos da sequência da Figura 5.

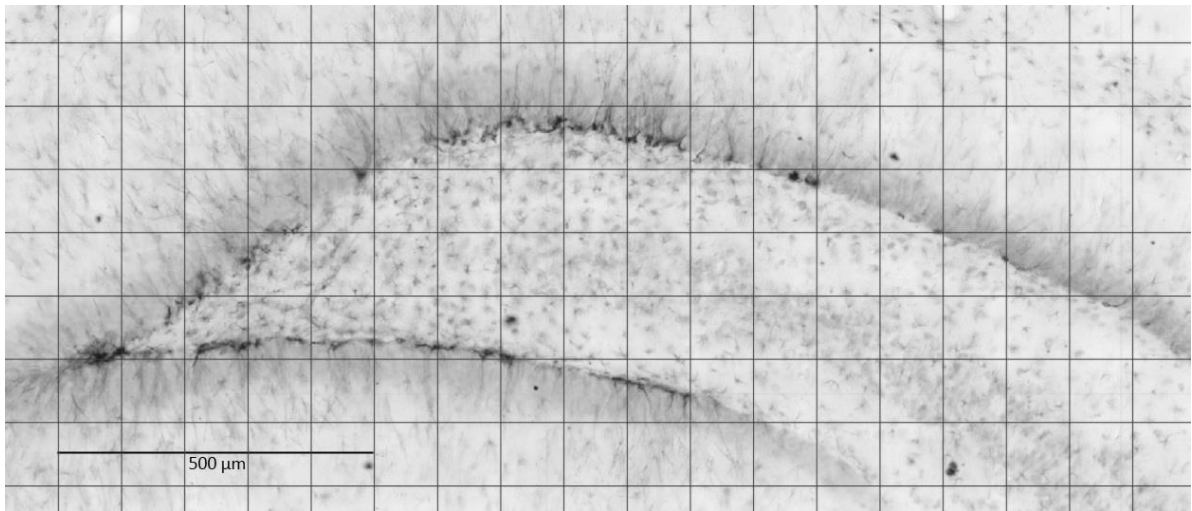


Figura 7. Giro denteado com sobreposição de exemplo de grade de contagem no valor de 100x100 µm.

5. Discussão

Neste trabalho encontrou-se que, aproximadamente um terço dos artigos utilizando quantificações estereológicas, relataram os valores de CE ou fizeram menção ao erro sistemático. Isto parece surpreendente, uma vez que diversas fontes de referência metodológica indicam o CE, ou seus componentes, como valores indispensáveis para a aplicação do método estereológico e sua confiabilidade (KEUKER, 2001; SCHMITZ e HOF, 2005; HOSSEINI-SHARIFABAD e NYENGAARD, 2007). A omissão de parâmetros fundamentais para a contagem estereológica nos relatos científicos pode diminuir as vantagens obtidas com o uso de um método baseado no refinamento e eliminação de viés metodológico e erro sistemático (SCHMITZ e HOF, 2005; WEST, 2002), bem como prejudicar a reprodutibilidade dos resultados de contagem. Naqueles trabalhos que fizeram relato mais detalhado do método de quantificação, foram encontrados valores de CE próximos de 0.10 ou abaixo, considerado valor de referência por outros autores (KEUKER, 2001; SCHMITZ e HOF, 2005; HOSSEINI-SHARIFABAD e NYENGAARD, 2007). Notou-se também que a ausência de informação sobre a realização dos testes piloto utilizados para definir o método de amostragem e seus valores, bem como protocolos ou indicadores mais detalhados de como as contagens ocorreram. Notou-se essas deficiências observando os critérios apresentados na Tabela 1: nenhuma publicação relatou todos os itens necessários para a reprodução da contagem. Na maior parte dos trabalhos avaliados, a falta de informação foi a regra e não a exceção. Isso se faz importante notar visto que no método do fracionador óptico o tipo de amostragem é muitas vezes considerado como a parte mais importante do método (KEUKER, 2001; SCHMITZ e HOF, 2005). É importante também destacar que, como relatado aqui neste trabalho, a maioria desses trabalhos indicavam fontes genéricas, difusas e indiretas sobre quantificação estereológica e nenhuma fonte com observação similar aquela realizada no artigo. E mesmo aqueles que indicavam fontes mais diretas de sua amostragem mostraram-se ausentes de algumas das informações mesmo regredindo para estas outras referências, por vezes até mais de uma regressão e ainda assim configurada a falta de informação.

Assim como nos estudos usando métodos estereológicos, os trabalhos relatando quantificações não-estereológicas também possuem uma significativa falta de informações. A falha no relato de informações tanto em parâmetros básicos tais como o

número de secções, quanto os parâmetros mais complexos como a forma da contagem propriamente dita, ou o papel do observador na contagem ou outros vieses possíveis. A falha de relatar os detalhes dos dois estilos de contagem acaba por prejudicar a possibilidade de uma comparação direta entre esses métodos apoiando-se na literatura. Esta limitação impede uma análise mais clara sobre as vantagens e desvantagens de cada método. Desta maneira, não conseguimos atingir o primeiro objetivo específico do presente trabalho por ausência de dados adequados e como consequência o segundo objetivo específico também foi inviabilizado. Além disto esta inconstância nos relatos dos métodos de quantificação coloca em perigo o princípio da possibilidade de reprodutibilidade dos mesmos, algo consideravelmente importante no desenvolvimento científico.

Apesar da aceitação crescente dos métodos estereológicos nas publicações científicas, em uma proporção de 3 para 1 indicada nesta revisão da literatura, há situações em que o método estereológico pode mostra-se pouco prático, por causas diversas, como por exemplo, falta de equipamentos ou de equipamentos adequados. No caso específico deste trabalho não possível realizar o método por falta de uma automatização do microscópio Confocal nos eixos-X e Y, impedindo uma sistematização precisa. Em outras situações, a vantagem do uso dos métodos estereológicos pode mostrar-se pequena ou nula, como indicado por Noori e Fornal (2011) na contagem de células marcadas com Brdu e Ki67. No estudo piloto realizado neste trabalho, nas imagens feitas no microscópio Confocal, foi observado que as mesmas células imunomarcadas com DCX eram vistas em todas as camadas do eixo Z sugerindo que a avaliação da profundidade não adicionou informações relevantes para a contagem. Assim, permanece a dúvida com relação a aplicação e as vantagens dos métodos estereológicos na contagem de DCX. Esperamos solucionar essas dúvidas e criar um protocolo adequado a contagem de DCX em estudos futuros utilizando métodos *design-based*.

6. Referências

ACOSTA, Sandra A. et al. Influence of Post-Traumatic Stress Disorder on Neuroinflammation and Cell Proliferation in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 12, e81585, 9 dez. 2013.

ALTMAN, Joseph; DAS, Gopal D.. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **The Journal Of Comparative Neurology**, [s.l.], v. 124, n. 3, p.319-335, jun. 1965.

BALENTOVA, S. *et al.* Ionizing radiation induced long-term alterations in the adult rat rostral migratory stream. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 1, p. 265–271, Jan. 2014.

BREGY, Amade et al. Posttraumatic hypothermia increases doublecortin expressing neurons in the dentate gyrus after traumatic brain injury in the rat. **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 233, n. 2, p.821-828, fev. 2012.

CRUZ-ORIVE, L. M.. Stereology of single objects. **Journal Of Microscopy**, [s.l.], v. 186, n. 2, p.93-107, maio 1997.

ELIBOL-CAN, Birsen et al. Examination of Age-dependent effects of fetal ethanol exposure on behavior, hippocampal cell counts, and doublecortin immunoreactivity in rats. **Developmental Neurobiology**, [s.l.], v. 74, n. 5, p.498-513, 3 dez. 2013.

ERIKSSON, Peter S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 11, p.1313-1317, nov. 1998.

FU, Sherleen et al. Aberrant Adult Neurogenesis in the Subventricular Zone-Rostral Migratory Stream-Olfactory Bulb System Following Subchronic Manganese Exposure. **Toxicological Sciences**, [s.l.], v. 150, n. 2, p.347-368, 21 jan. 2016

GAGE, F. H.. Mammalian Neural Stem Cells. **Science**, [s.l.], v. 287, n. 5457, p.1433-1438, 25 fev. 2000.

GIACHINO, C. et al. Maternal deprivation and early handling affect density of calcium binding protein-containing neurons in selected brain regions and emotional behavior in periadolescent rats. **Neuroscience**, [s.l.], v. 145, n. 2, p.568-578, mar. 2007

GROVES, Natalie J. et al. Behavioural Effects of Adult Vitamin D Deficiency in BALB/c Mice Are not Associated with Proliferation or Survival of Neurons in the Adult Hippocampus. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 4, e0152328, 4 abr. 2016.

GUNDERSEN, H. J. G. et al. The efficiency of systematic sampling in stereology - reconsidered. **Journal Of Microscopy**, [s.l.], v. 193, n. 3, p.199-211, mar. 1999.

GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B.. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction*. **Journal Of Microscopy**, [s.l.], v. 147, n. 3, p.229-263, set. 1987.

HOSSEINI-SHARIFABAD, Mohammad; NYENGAARD, Jens Randel. Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. **Journal Of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 162, n. 1-2, p.206-214, maio 2007.

JINNO, Shozo. Topographic differences in adult neurogenesis in the mouse hippocampus: A stereology-based study using endogenous markers. **Hippocampus**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.467-480, 25 abr. 2011.

KEINER, Silke; WITTE, Otto W.; REDECKER, Christoph. Immunocytochemical Detection of Newly Generated Neurons in the Perilesional Area of Cortical Infarcts After Intraventricular Application of Brain-Derived Neurotrophic Factor. **J Neuropathol Exp Neurol**, [s.l.], v. 68, n. 1, p.83-93, jan. 2009.

KEUKER, Jeanine I.h.; VOLLMANN-HONSDORF, Gesa K.; FUCHS, Eberhard. How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews. **Brain Research Protocols**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.211-221, jul. 2001.

KIM, Beom Joon et al. Reduced neurogenesis after suppressed inflammation by minocycline in transient cerebral ischemia in rat. **Journal Of The Neurological Sciences**, [s.l.], v. 279, n. 1-2, p.70-75, abr. 2009.

KUNZE, Albrecht et al. Two distinct populations of doublecortin-positive cells in the perilesional zone of cortical infarcts. **Bmc Neuroscience**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.16-20, 15 abr. 2015.

LANDGREN, Henrik; CURTIS, Maurice A.. Locating and labeling neural stem cells in the brain. **Journal Of Cellular Physiology**, [s.l.], v. 226, n. 1, p.1-7, 23 jul. 2011

LLORENS-MARTÍN, M.; TORRES-ALEMÁN, I.; TREJO, J.I.. Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons. **Hippocampus**, [s.l.], v. 16, n. 5, p.480-490, 2006.

LLORENS-MARTÍN, María; TORRES-ALEMÁN, Ignacio; TREJO, José Luis. Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. **Molecular And Cellular Neuroscience**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.109-117, jun. 2010.

MCCLURE, Robyn E.s.; BARHA, Cindy K.; GALEA, Liisa A.m.. 17 β -Estradiol, but not estrone, increases the survival and activation of new neurons in the hippocampus in response to spatial memory in adult female rats. **Hormones And Behavior**, [s.l.], v. 63, n. 1, p.144-157, jan. 2013.

MOUTON, P. R. et al. Stereological length estimation using spherical probes. **Journal Of Microscopy**, [s.l.], v. 206, n. 1, p.54-64, abr. 2002.

NDODE-EKANE, X.e. et al. Vascular changes in epilepsy: functional consequences and association with network plasticity in pilocarpine-induced experimental epilepsy. **Neuroscience**, [s.l.], v. 166, n. 1, p.312-332, mar. 2010.

NOORI, Hamid R.; FORMAL, Casimir A.. The Appropriateness of Unbiased Optical Fractionators to Assess Cell Proliferation in the Adult Hippocampus. **Front. Neurosci.**, [s.l.], v. 5, p.15-20, 2011

OJO, Bunmi et al. An NCAM Mimetic, FGL, Alters Hippocampal Cellular Morphometry in Young Adult (4 Month-Old) Rats. **Neurochemical Research**, [s.l.], v. 38, n. 6, p.1208-1218, 18 out. 2012.

PATON, J.; NOTTEBOHM, F.. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. **Science**, [s.l.], v. 225, n. 4666, p.1046-1048, 7 set. 1984.

PIETRANERA, L. et al. Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurogenesis in Oestradiol Neuroprotection of the Hippocampus of Hypertensive Rats. **Journal Of Neuroendocrinology**, [s.l.], v. 22, n. 10, p.1082-1092, 15 set. 2010

RAO, Muddanna S.; HATTIANGADY, Bharathi; SHETTY, Ashok K.. Status epilepticus during old age is not associated with enhanced hippocampal neurogenesis. **Hippocampus**, [s.l.], v. 18, n. 9, p.931-944, set. 2008

SANTARELLI, L.. Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. **Science**, [s.l.], v. 301, n. 5634, p.805-809, 8 ago. 2003.

SAUL, Michele L. et al. Differences in amygdala cell proliferation between adolescent

and young adult rats. **Developmental Psychobiology**, [s.l.], v. 56, n. 3, p.517-528, 15 jun. 2013

SCHMITZ, C.; HOF, P.r.. Design-based stereology in neuroscience. **Neuroscience**, [s.l.], v. 130, n. 4, p.813-831, jan. 2005.

SLOMIANKA, L.; WEST, M.j.. Estimators of the precision of stereological estimates: An example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. **Neuroscience**, [s.l.], v. 136, n. 3, p.757-767, jan. 2005.

STEFOVSKA, Vanya G. et al. Sedative and anticonvulsant drugs suppress postnatal neurogenesis. **Annals Of Neurology**, [s.l.], v. 64, n. 4, p.434-445, out. 2008.

STERIO, D. C.. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. **Journal Of Microscopy**, [s.l.], v. 134, n. 2, p.127-136, maio 1984.

TSKITISHVILI, Ekaterine et al. Estetrol attenuates neonatal hypoxic–ischemic brain injury. **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 261, p.298-307, nov. 2014.

WEST, Mark J.. Design-based stereological methods for counting neurons. **Progress In Brain Research**, [s.l.], p.43-51, 2002.

WEST, Mark J.. Introduction to Stereology. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s.l.], v. 2012, n. 8, p.1-6, ago. 2012

ZHANG, P. et al. Allopregnanolone enhances the neurogenesis of midbrain dopaminergic neurons in APP^{swe}/PSEN1 mice. **Neuroscience**, [s.l.], v. 290, p.214-226, abr. 2015.

ZHANG, Xue-mei et al. Doublecortin-expressing cells persist in the associate cerebral cortex and amygdala in aged nonhuman primates. **Front. Neuroanat.**, [s.l.], v. 3, p.25-36, 2009.