

JOSÉ CARLOS MOTA CATARINO

**ESTUDOS MORFOMÉTRICOS EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE FIBROSE: QUANDO OS
INVESTIGADORES PRETENDEM
TRANSFORMAR UMA IMAGEM HISTOLÓGICA
NUM DADO ESTATÍSTICO**

Orientador: Doutor Pedro Faísca

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa, 2017

JOSÉ CARLOS MOTA CATARINO

**ESTUDOS MORFOMÉTRICOS EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE FIBROSE: QUANDO OS
INVESTIGADORES PRETENDEM
TRANSFORMAR UMA IMAGEM HISTOLÓGICA
NUM DADO ESTATÍSTICO**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, segundo o Despacho Reitoral n.º. 305/2017, perante a seguinte composição de Júri:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Tânia Carvalho

Orientador: Doutor Pedro Faisca

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa, 2017

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, na pessoa da sua Diretora, Professora Doutora Laurentina Pedroso, pela possibilidade de realização desta Dissertação de Mestrado e ao corpo docente no geral.

À Doutora Inês Viegas por ter sido incansável na ajuda que me deu com o tratamento estatístico deste trabalho.

Ao Doutor João Requicha e as Doutoradas Joana de Oliveira e Ângela Martins por terem sido dos professores que mais me desafiaram, puxaram por mim e me levaram com isso a melhorar como aluno e pessoa.

Um agradecimento muito especial à minha mãe, avô, irmão e irmã que foram nestes 6 anos fulcrais como pilares no que toca à estabilidade emocional, familiar e monetária necessárias à realização deste curso.

A todos os meus amigos e amigas que me acompanharam nesta longa caminhada, em especial ao Afonso Moura, ao Francisco Cravo, ao Souto, ao Monera, ao João Marreiros Correia, ao João Guilherme Dias, ao Parrinha, ao Bota, ao Rafa, ao Gonçalo, ao Tiago Carvalho, à Catarina Oliveira, à Beatriz Vítor, à Jéssica Ferreira, à Raquel Moreira e à Beatriz Franco

A todo o pessoal do serviço de histopatologia (Marta Pinto e Joana Rodrigues) e microscopia electrónica (Ana Vinagre e Sara Bonucci) do IGC por me terem recebido super bem e feito sentir rapidamente em casa.

Um agradecimento especial ao Doutor Pedro Faísca, pela oportunidade que me proporcionou de estagiar e acompanhá-lo no IGC, pelos conselhos valiosos sobre o futuro e por quer como orientador quer como pessoa nunca me ter falhado.

Por fim, um profundo agradecimento à Filipa Lúcio, por ter sido quem mais me apoiou e acreditou em mim nestes últimos anos.

Resumo

A quantificação de imagens histológicas é frequentemente requisitada em investigação biomédica. Muitos dos métodos utilizados são morosos, dificilmente reproduzíveis e com grande subjectividade.

Neste trabalho pretendeu-se descrever e validar metodologias de medição de fibrose mais objectivas, reproduzíveis e de fácil execução com recurso ao software Image J.

No modelo de fibrose hepática foram comparadas as percentagens obtidas numa secção total e em várias ampliações. Para a fibrose de miocárdio, foi criada uma macro e validada a sua reproductibilidade intra e inter-observacional.

Na fibrose hepática, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), mas a correlação revelou-se mais forte entre os resultados obtidos na fotografia da secção total e nas duas fotografias a 40x ($r = 0,963$). No caso da fibrose do miocárdio, não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados obtidos manualmente e com a macro ($p > 0,05$). Em relação à variabilidade inter-observador, a macro revelou-se um método menos variável ao apresentar índices de correlação mais elevado entre observadores que a medição manual.

A utilização do ImageJ permitiu a definição de metodologias em dois modelos de fibrose que permitiram uma medição objectiva, reproductível e de maneira menos laboriosa.

Palavras-chave: Patologia experimental, Resultados representativos, Morfometria, Modelos de Fibrose, ImageJ, Macros, Fígado, Coração.

Abstract

Quantification of histological images is often required in biomedical research. Many of the methods used are time-consuming, difficult to replicate and with great subjectivity.

This work aimed to describe and validate more objective, reproducible and easy to perform fibrosis measurement methodologies using ImageJ software.

In the liver fibrosis model, the percentages obtained in a total section and in several magnifications, were compared. For myocardial fibrosis, a macro was created and validated for its intra and inter-observational reproducibility.

In hepatic fibrosis, no statistically significant differences were found ($p > 0.05$), but the correlation was stronger between the results obtained in the photograph of the total section and in the two photographs at 40x ($r = 0.963$). In the case of myocardial fibrosis, no significant differences were found between the results obtained manually and with the macro ($p > 0.05$). Regarding the interobserver variability, the macro was shown to be a less variable method by presenting higher correlation coefficients between observers than manual measurement.

The use of ImageJ allowed the definition of methodologies in two models of fibrosis that allowed objective measurement, reproducible and in a less laborious way

.Keywords: Experimental pathology, Representative results, Morphometry, Fibrosis Models, ImageJ, Macros, Liver, Heart

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice	iv
Índice de Tabelas	i
Índice de Figuras	iii
Lista de Abreviaturas	i
1. Relatório de estágio	1
1.1. Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC)	1
1.1.1 Atividades desenvolvidas	2
1.2. Faculdade de Medicina Veterinária da Università degli Studi di Napoli	4
1.2.1. Atividades desenvolvidas	4
2. Introdução	6
2.1. Patologia Experimental – Importância	6
2.2. Morfometria	8
2.3. ImageJ / FIJI	10
2.4. O murganho como modelo experimental	13
2.5. Fibrose	15
2.5.1. Modelo Tetracloreto de Carbono (CCl ₄)	17

2.5.2. Modelo Isoprenalina	18
3. Objetivos	19
4. Materiais e Métodos	19
4.1. Fibrose hepática.....	20
4.2. Fibrose miocárdio.....	22
5. Resultados	25
5.1. Fibrose Hepática	25
5.2. Resultados fibrose miocárdio	27
5.2.1 Validação da macro.....	27
5.2.2. Validação da macro em relação à variabilidade inter-observador	28
6. Discussão	32
7. Conclusão.....	36
8. Bibliografia.....	38
Apêndices.....	42

Índice de Tabelas

Tabela 1	Percentagens de parênquima hepático afetado por fibrose.....	25
Tabela 2	Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos para a fibrose hepática	26
Tabela 3	Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos para a medição da fibrose de miocárdio através da utilização da macro.....	27
Tabela 4	Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos para a medição manual através do Color Threshold da fibrose de miocárdio	27
Tabela 5	Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos por diferentes observadores para a medição da fibrose de miocárdio através da utilização da macro.....	29
Tabela 6	Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos por diferentes observadores para a medição da fibrose de miocárdio através da medição manual com o Color Threshold	29
Tabela 7	Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos por diferentes observadores para a medição da área total de secção de coração através da utilização da macro	29
Tabela 8	Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos por diferentes observadores para a medição da área total de secção de coração através da medição manual com o Color Threshold.....	30
Tabela 9	Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos por diferentes observadores para a percentagem de secção afectada através da utilização da macro.....	30
Tabela 10	Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos por diferentes observadores para a percentagem de secção afectada através da medição manual com o Color Threshold	31

Tabelas 11 e 12 – Comparação dos coeficientes de correlação obtidos entre as medições dos diferentes operadores para a área de fibrose, com a utilização da macro e recorrendo apenas ao Color Threshold, respectivamente 31

Tabela 13 e 14 Comparação dos coeficientes de correlação obtidos entre as medições da área total de secção dos diferentes operadores, com a utilização da macro e recorrendo apenas ao Color Threshold, respectivamente 31

Tabela 15 e 16 Comparação dos coeficientes de correlação obtidos entre as medições dos diferentes operadores, para a percentagem de secção afetada com a utilização da macro e recorrendo apenas ao Color Threshold, respectivamente 32

Índice de Figuras

Figura 1 Gráfico representativo da distribuição temporal de cada rotação no estágio na universidade de Nápoles.	5
Figura 2 Exemplo de score utilizado na gradação de lesões inflamatórias no cólon.	8
Figura 3 Exemplo de score utilizado na gradação de fibrose hepática.....	8
Figura 4 Esquema representativo sobre os passos necessários até à análise morfométrica de uma lâmina de histologia.....	9
Figura 5 Barra de ferramentas principal do ImageJ	12
Figura 6 Comandos do ImageJ.....	12
Figura 7 Análise de uma fotografia de uma secção de coração de murganho tirada no estereoscópio e corada com TM com lesão fibrótica pintada de azul.....	12
Figura 8 Esquema representativo do fenómeno de deposição de fibrose.	16
Figura 9 fórmula química do Tetracloreto de carbono	18
Figura 10 Fígado 100x TM. Exemplo da imagem das lesões causadas pelo CCl4 num fígado de murganho.....	18
Figura 11 fórmula química da Isoprenalina	19
Figura 12 Bomba osmótica em rato	19
Figura 13 Coração 2x TM – exemplo de imagem histológica das lesões causadas pela isoprenalina num coração de murganho.....	17
Figura 14 Coração 200x – ampliação da lesão fibrótica.....	17
Figura 15 Fígado 40x TM – fotografia de uma secção inteira de fígado de murganho, após a colagem das fotografias com sobreposição a 40x	20

Figura 16 Fígado 40x TM – exemplo de uma fotografia utilizada para a medição de fibrose a 40x	21
Figura 17 Fígado 100x TM – exemplo de uma fotografia utilizada para a medição de fibrose a 100x	21
Figura 18 Fígado 200x TM – exemplo de uma fotografia utilizada para a medição de fibrose a 200x	211
Figuras 19, 20 e 21 Coração 2x TM – exemplos de fotografias escolhidas para os diferentes operadores realizarem as medições.....	23
Figuras 22, 23 e 24 Gráficos de dispersão representativos dos resultados obtidos para a correlação entre os diferentes resultados na fibrose hepática através das diferentes ampliações	26
Figuras 25, 26 e 27 Gráficos de dispersão representativos dos resultados obtidos para a correlação entre os diferentes resultados obtidos com as diferentes metodologias .	28

Lista de Abreviaturas

CCl_3 – Tricloreto de carbono

CCl_4 – Tetracloreto de carbono

ECM – matriz extracelular

H&E – hematoxilina e eosina

iBET- Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica

IGC – Instituto Gulbenkian de Ciência

ITQB - Instituto de Tecnologia Química e Biológica

KO – Knock-out

mm^2 – milímetros quadrados

OR – Oil Red

PAS – Periodic Acid Schiff

TM – tricrómico de Masson

WT – wild-type

1. Relatório de estágio

1.1. Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC)

Realizei a primeira parte do meu estágio curricular no serviço de histopatologia do IGC sob a supervisão do Doutor Pedro Faísca. Esta parte do estágio curricular teve a duração de 4 meses e meio, tendo iniciado no dia 15 de Setembro de 2016 e findado no dia 31 de Janeiro de 2017.

Localizado na Rua da Quinta Grande, número 6 em Oeiras, o IGC é um centro de referência nacional e internacional no que toca à investigação nos ramos da biologia e biomédica. Foi criada no ano de 1961 pela Fundação Calouste Gulbenkian com o objetivo de permitir e auxiliar a investigação em Portugal. Actualmente e desde 2012, o seu director é Jonathan Howard. Passou por vários processos de renovação até ao dia de hoje com o intuito de poder fazer frente a cinco desafios: O de promover um ambiente multidisciplinar que leve à excelência na investigação biológica e biomédica, servir de incubadora para novos investigadores e guia-los até ao sucesso, o de providenciar infraestruturas com tecnologia de ponta e financiamento necessário aos projetos em curso, o de ter programas de estudos internacionais de modo a facilitar a partilha de conhecimento e, por último, o de promover os valores da ciência junto da sociedade. O IGC está integrado em redes investigacionais nacionais e internacionais. A nível nacional faz parte do “Campus de Oeiras” dos quais fazem também parte o Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB) da Universidade de Lisboa e o Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET) e a nível internacional encontra-se inserido no EU-LIFE que consiste num grupo de 13 centros de investigação europeus cujo objetivo principal passa pelo avanço da tecnologia na Europa em conjunto.

A nível interno, neste momento alberga 42 grupos de investigação (por volta de 370 investigadores de 31 países diferentes) nas suas instalações e mais 29 grupos que desenvolvem os seus trabalhos em institutos externos associados. Os grupos de trabalho levam a cabo estudos que podem variar entre estudos fundamentais moleculares, celulares, de organismo até estudos populacionais. Para tal, em grande parte deles, são utilizados diferentes modelos nomeadamente leveduras, plantas, minhocas, moscas, peixes-zebra e murganhos sendo que a escolha é feita consoante qual ou quais possuem as características

mais importantes para os objetivos do estudo. O seu programa científico actual é multidisciplinar e inclui investigação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Interações entre patógeno e hospedeiro, Genética das Doenças, Biologia de Plantas, Neurociências e Biologia Computacional.

O serviço de histopatologia é constituído por duas técnicas de anatomia patológica, a Marta Pinto e a Joana Rodrigues e por um patologista, o Doutor Pedro Faísca. Os objetivos do serviço são o de processar amostras enviadas pelos diferentes grupos de investigação para posterior análise anatomopatológica das mesmas.

1.1.1. Atividades desenvolvidas

Ao estar inserido no serviço de histopatologia do IGC tive a oportunidade de acompanhar os desafios diários de um patologista experimental.

Sob a supervisão e em conjunto com o Doutor Pedro Faísca analisamos amostras de dois diferentes modelos, murganho (*Mus musculus*) e peixe-zebra (*Danio rerio*) sendo que a sua maioria eram provenientes de murganho. Em duas situações tive a oportunidade de trabalhar também com amostras provenientes de cultura de células (pele humana e adipócitos de murganho)

As amostras alternavam muito consoante o grupo que as enviava. Tive oportunidade de observar amostras histológicas no caso do murganho de sistema nervoso central (ex: Cérebro), sistema endócrino (ex: Tíroide e Glândulas adrenais), sistema tegumentar (ex: Pele), sistema reprodutor masculino e feminino (testículos, ductos deferentes, próstata, glândulas seminais, ovários, útero e vagina), sistema gastrointestinal e órgãos anexos (intestino delgado, intestino grosso, estômago, fígado, pâncreas e glândulas salivares), sistema respiratório (pulmões), sistema linfático (baço, linfonodos e medula óssea), sistema urinário, (rins) sistema musculo-esquelético (músculo e tibia), sistema circulatório (coração), tecido adiposo e órgãos dos sentidos (olhos). As amostras de peixe-zebra permitiam a observação do animal na íntegra numa lâmina permitindo a observação de todos os seus sistemas.

O trabalho desenvolvido variava consoante a experiência. O mais comum foi a descrição morfológica das lesões encontradas com associação causal ao modelo e experiência e posterior comparação entre grupos. (ex: a descrição de lesões de necrose e deposição de

fibrose num fígado de um murganho ao qual foi injectado acetaminofeno). Realizei também estudos morfométricos em determinadas amostras nas quais a descrição morfológica por si só não permitia posterior comparação entre grupos existindo a necessidade de algum género de quantificação que permitisse. Efectuei tal tipo de estudos em amostras de tecido adiposo (áreas de adipócitos), amostras de fígado e amostras de coração (áreas de fibrose e áreas de cardiomiócitos). Em certas tarefas trabalhei com diferentes sistemas de gradação de lesões em diferentes órgãos (ex: Colites induzidas). Por fim ajudei na realização de dois relatórios de necrópsia, um de peixe zebra e um de murganho. Embora variável o tipo de trabalho, em todos os casos eram tiradas fotografias digitais de órgãos representativos de cada grupo para enviar aos investigadores e para servirem de arquivo posterior. Nos casos que eram necessários os estudos morfométricos, para além das fotografias representativas, eram também tiradas fotos com esse intuito.

Grande parte das lâminas visualizadas eram provenientes de amostras incluídas em parafina e coradas com coloração de Hematoxilina e eosina (H&E) contudo em alguns casos eram pedidas colorações diferenciais, tendo assim oportunidade de me familiarizar com as imagens histológicas das seguintes colorações: Periodic Acid-Schiff (PAS), tricrómico de Masson (TM), Ziehl-Neelsen e oil red (OR) sendo que nesta última tratavam-se de amostras de congelação. Esporadicamente tive também a oportunidade de visualizar imunohistoquímicas em amostras de fígado.

Por fim em termos de infraestruturas, tive a chance de utilizar para visualização das lâminas um microscópio LEICA DMLB2 que se encontrava ligado a um computador MAC OS X Version 10.5.8 2.4ghz Intel Core 2 e para a captura de imagens utilizava o software LEICA FIRECAM. Em certas ocasiões onde a obtenção de uma imagem de uma secção inteira era necessária, tive também que utilizar o estereomicroscópio LEICA MZ 12.5 ou o digitalizador de lâminas HAMAMATSU NANOZOOMER-SQ DIGITAL SLIDE SCANNER D12140-01 com o software NDPI view. Para os estudos morfométricos aprendi a utilizar o software ImageJ.

1.2. Faculdade de Medicina Veterinária da Università degli Studi di Napoli

Realizei o resto do estágio curricular em Itália, na Università degli Studi di Napoli Federico II, no departamento de medicina veterinária. O estágio teve a duração 10 semanas, com início no dia 13 de Fevereiro de 2017 até ao dia 21 de Abril de 2017.

A Universidade de Nápoles pertence ao grupo das universidades mais antigas do mundo, tendo sido fundada pelo Imperador Federico em 1224. Actualmente o edifício principal localiza-se no Corso Umberto enquanto que o departamento de veterinária encontra-se na Via Federico Delpino em Nápoles. O diretor da faculdade de medicina veterinária é o Doutor Gaetano Oliva e a coordenadora de Erasmus e supervisora do meu estágio foi a Doutora Laura Rinaldi. As instalações da faculdade de medicina veterinária encontram-se inseridas num mosteiro do século XVI. No piso térreo está localizado o hospital de pequenos animais, onde os consultórios das diferentes especialidades estão dispostos em redor de um claustro central, enquanto que os laboratórios de anatomia patológica e parasitologia encontram-se no segundo e terceiro piso respectivamente.

1.2.1. Atividades desenvolvidas

Como aluno estagiário, fui inserido num sistema de rotações semanais. Iniciei a actividade na rotação de cirurgia e medicina interna, sob a supervisão do Doutor Gerardo Fatone onde acompanhei diversas consultas, de medicina geral e de especialidade e cirurgias principalmente ortopedias onde auxiliei esporadicamente como instrumentista ou segundo anestesiolista.

Na seguinte semana estive em radiologia, onde permaneci uma semana, sob a supervisão do Doutor Leonardo Meomartino, onde tive a oportunidade de efectuar três diferentes tipos de estudo imagiológicos: radiográfico, ecográfico e através da tomografia axial computadorizada. A maior parte dos pacientes que acompanhei eram casos cirúrgicos que necessitavam de efectuar estudos imagiológicos pré ou pós cirúrgicos.

Na seguinte semana estive no departamento de anatomia patológica sob a supervisão da Doutora Brunella Restucci e acompanhado pela aluna de doutoramento Karen Power. Nesta rotação tive a oportunidade de fazer exame e diagnóstico citológico,

exame e diagnóstico histopatológico, assistir a necropsias, montar lâminas, trabalhar com o micrótomo e auxiliar na preparação de soluções de tampão fosfato salino para utilização em preparações de imunohistoquímica. A tarefa que mais vezes realizei foi análise histopatológica de biopsias de cão e gato, contudo também tive a oportunidade de trabalhar com amostras de tigre e camelo. Nesta rotação permaneci 5 semanas.

Por fim, estive 2 semanas na rotação de parasitologia sob a supervisão da Doutora Laura Rinaldi e acompanhado pelas alunas de doutoramento Rosachiara Vascone, Luisa Del Prete e Valeria Caruso. Neste laboratório tive contacto e oportunidade de efectuar diferentes procedimentos de diagnóstico parasitológico tais como: esfregaços de sangue para pesquisa de hemoprotozoários, teste de Knot para diagnóstico de microfilárias de *Dirofilaria immitis* e *repens*, testes coprológicos como esfregaços fecais, FLOTAC e Mini-FLOTAC (metodologia criada na instituição com o protocolo publicado na Nature Protocols) para pesquisa de ovos, oocistos de *Giardia spp.* e larvas de parasitas broncopulmonares nas fezes de animais de companhia, animais de produção e exóticos, testes de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para *Giardia spp.*, imunofluorescência para pesquisa de *Leishmania spp.* e teste de Baermann para pesquisa de larvas. Tive também a oportunidade de participar em discussões de casos clínicos com as alunas de doutoramento

qu

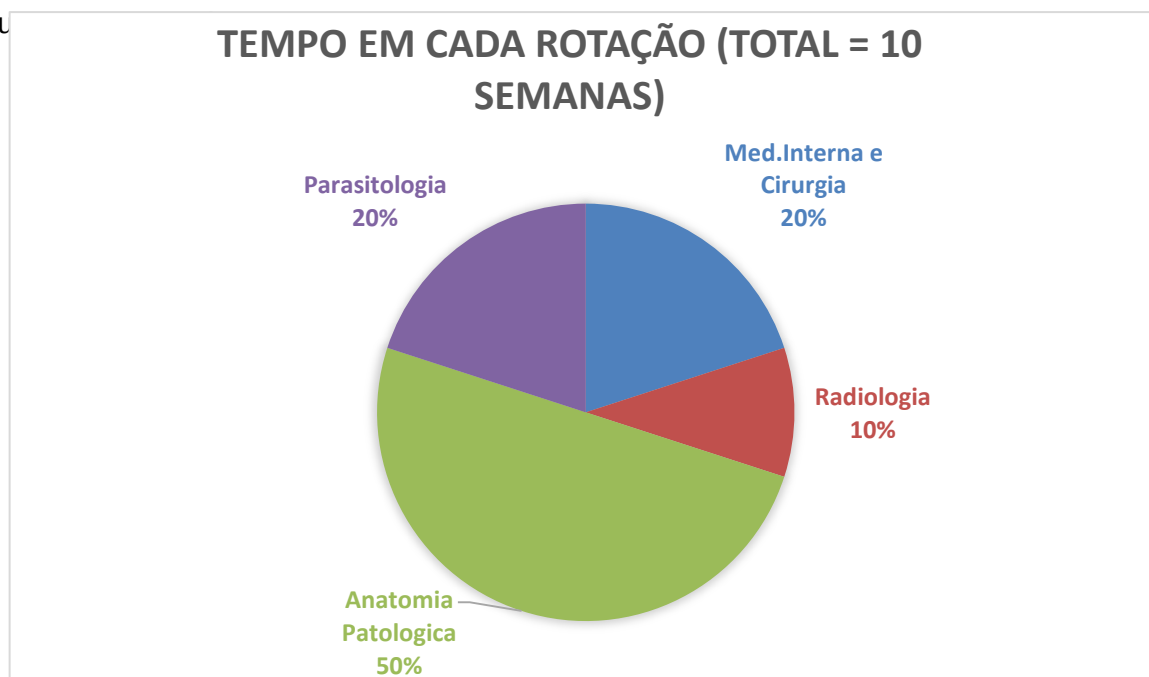


Figura 1 Gráfico representativo da distribuição temporal de cada rotação no estágio na universidade de Nápoles.

2. Introdução

2.1. Patologia Experimental – Importância

“A good physiological experiment ... requires that it should present anywhere, at any time, under identical conditions, the same certain and unequivocal phenomena that can always be confirmed.” – Johannes Peter Müller, Fisiologista Alemão (1801-1858).

O papel de um patologista é fortemente influenciado pelo local e objetivos do seu trabalho.

A um anatomopatologista a exigência máxima passa por chegar a uma lista de diagnósticos diferenciais/diagnóstico definitivo que encaixem no caso clínico apresentado com base nas alterações morfológicas encontradas.

No entanto, ao patologista experimental para além da descrição das mesmas alterações morfológicas e da chegada a um diagnóstico diferencial/final é muitas vezes pedido que “ traduza ” para números o que foi visto numa lâmina para permitir uma posterior análise estatística e comparação entre diferentes grupos/modelos experimentais. (Schofield, P.N., Ward, J.M. & Sundberg, J.P. 2016)

Este facto tem especial importância devido à crescente discussão em torno da reprodutibilidade dos resultados pré-clínicos obtidos após a utilização de modelos animais. (Schofield, P.N., Ward, J.M. & Sundberg, J.P. 2016) A reprodutibilidade depende da correta documentação de todos os procedimentos experimentais efetuados. Tendo isto em conta e o facto de que os resultados histopatológicos continuarem a ser uma das abordagens mais utilizadas para a caracterização de fenótipos de organismos-modelo, a replicabilidade e correta descrição dos achados histopatológicos são de extrema importância e têm um grande impacto na interpretação dos efeitos de uma mutação ou tratamento medicamentoso. (Scudamore, C.L. *et al* 2016) (Schofield, P.N., Ward, J.M. & Sundberg, J.P. 2016)

A obtenção desta reprodutibilidade é um desafio constante. Para tal, é indispensável a utilização de sistemas que permitam uma obtenção correta de resultados com o mínimo de variabilidade inter-observador. Esta desafiante necessidade é muitas das

vezes enfrentada através da utilização de sistemas de pontuação/ *scores* para gradação de lesões (figura 2 e 3), possibilitando assim as comparações entre grupos mais fáceis e menos variáveis. Contudo a utilização destes sistemas de *scores* nem sempre é fácil ou linear. Estes podem ser adaptados pelo patologista, de artigos que este encontre sobre o modelo em questão, em casos em que não existe bibliografia específica pode criar um esquema de pontuação ele próprio ou adaptar de literatura relacionada com medicina humana. (Seamons A., Treuting P.M., Brabb T., Maggio-Price L. 2013). Esta última opção é muitas vezes a única e leva a que, por vezes, seja difícil a sua adaptação aos modelos experimentais pois nestes casos não é tida em conta certas particularidades fisiológicas e fisiopatológicas dos animais utilizados nas experiências.

Todos estes fatores podem levar a que a mesma lâmina dê origem a resultados díspares entre observadores e é nestes momentos que as ferramentas morfométricas podem ganhar importância de relevo. (Soreide K, *et al* 2009)

É, também, de salientar a necessidade de adaptação constante às diferentes necessidades de cada grupo de investigação. Este é um pilar importantíssimo na obtenção de resultados com interesse científico, pois, o patologista tem que ser crítico em relação as metodologias utilizadas e se são ou não as melhores para obter resultados de relevo. Exemplificando: as diferentes metodologias de recolha e processamento das amostras podem ser diferentes consoante o objetivo final do investigador. Num caso onde o interesse principal seja a descrição e quantificação de tumores colorretais o processamento das amostras deve ser diferente do que num caso de avaliação de colites auto-imunes. Esta otimização de todo o processamento tem que ser efetuada pelo patologista, através de um diálogo dinâmico com os técnicos de anatomia patológica e investigadores pois, em última instância é ele que observa as lâminas e é o responsável por dar os resultados mais fidedignos possíveis. Por fim tem também que ser capaz de se adaptar aos diferentes modelos que são utilizados e ter capacidade de distinguir lesões relevantes e associadas diretamente à experiência de lesões idiossincráticas (Schofield, P.N., Ward, J.M. & Sundberg, J.P. 2016).

Pode-se, então, afirmar que o trabalho de um patologista experimental é desafiante devido à necessidade incessante da obtenção de resultados fidedignos e com reprodutibilidade. Esta obrigação leva a que cada vez mais sejam utilizadas e desenvolvidas diferentes ferramentas e metodologias que nem sempre são fáceis de aplicar.

Mucosal loss*	Hyperplasia*	Inflammation*	Extent*,**
0- none	0- none	0- none	0- none
1- mild <5%	1- mild	1- mild mucosa only	1- <5%
2- moderate 6–30%	2- moderate	2- moderate mucosa and submucosa	2- 6–30%
3- marked 31–60%	3- severe with aberrant crypts	3- severe with abscesses, erosions	3- 31–60%
4- severe >61%	4- severe with herniation	4- severe with obliteration of architecture and ulceration or transmural	4- >60%

*These are scored for each section of large bowel (cecum, proximal colon, mid colon and distal colon) and summed for total IBD score.
 **Two extent scores are included in the IBD score. Extent 1 = % of intestine affected in any manner; Extent 2 = % percent of intestine affected by the most severe score.
 doi:10.1371/journal.pone.0079182.t001

Figura 2 Exemplo de score utilizado na gradação de lesões inflamatórias no colon. Retirado de Seamons A., Treuting P.M., Brabb T., Maggio-Price L. 2013. PLoS One. Nov 11;8(11)

Modified staging: architectural changes, fibrosis and cirrhosis	
Change	Score
No fibrosis	0
Fibrous expansion of some portal areas, with or without short fibrous septa	1
Fibrous expansion of most portal areas, with or without short fibrous septa	2
Fibrous expansion of most portal areas with occasional portal to portal (P-P) bridging	3
Fibrous expansion of portal areas with marked bridging (portal to portal (P-P) as well as portal to central (P-C))	4
Marked bridging (P-P and/or P-C) with occasional nodules (incomplete cirrhosis)	5
Cirrhosis, probable or definite	6
Maximum possible score	6

Figura 3 Exemplo de score utilizado na gradação de fibrose hepática. Retirado de Ishak, K. et al 1995, 22, Journal of Hepatology 696-699

2.2. Morfometria

A palavra morfometria deriva da fusão de duas palavras de origem grega – “morfos” que significa forma e “metron” que significa medida/medição. Definindo, é um tipo de estudo matemático que engloba diferentes métodos dos quais se extraem medições exatas a partir de formas e padrões. (Soreide K, *et al* 2009)

É considerada uma ferramenta integrativa capaz de gerar variáveis contínuas que posteriormente possibilitam comparações estatísticas. Os seus principais objetivos são o de descrever objetiva e quantitativamente de maneira fidedigna e repetível o que foi observado anteriormente pelos olhos de um patologista, não ser variável entre observadores e dar origem a resultados clinica e estatisticamente valorizáveis. Estes três pontos são imprescindíveis para a correta aplicação de métodos morfométricos apresentando todos igual importância sendo que nenhuma metodologia morfométrica tem valor científico caso não tenha existido, previamente à sua aplicação, a observação e confirmação de um

patologista experiente que tenha dado o seu aval ao uso do dito método. (figura 4) (Di Ieva, A. *et al* 2012)

Apesar de não ser uma metodologia nova, existindo publicações sobre o assunto datadas dos anos sessenta e setenta, (Fritsch S., Grimm H., 1969) (Fontolliet-Girardier C. 1972) a sua utilização na patologia tem vindo a aumentar. Este aumento deve-se à continua necessidade de obtenção de resultados que para além de corretos não sejam variáveis entre observadores. Isto leva a que estas ferramentas sejam amplamente utilizadas em casos que a caracterização histológica seja difícil ou ambígua com o intuito de encontrar e estandardizar parâmetros objetivos e quantificáveis em oposição a parâmetros subjetivos evitando assim fatores de confusão ou vieses introduzidos pelo observador. Tendo isto em conta a morfometria encontra cada vez mais o seu nicho em casos que a gradação e distinção entre lesões benignas e malignas são difíceis (ex: tumores hepatocelulares, carcinomas da adrenocortical, etc.) (Ciaramella, P., *et al* 2017) (Rahman SM, Itakura H. 1996) ou em situações em que a quantificação (da área, perímetro, percentagem afetada) de uma certa lesão permita a comparação entre diferentes grupos e a obtenção de fatores preditivos de prognóstico. (Rathore A.S., *et al* 2017)

Estes métodos apresentam, contudo, algumas contrapartidas pois são trabalhosos, consomem muito tempo para a sua realização e obrigam a utilização de instrumentos e infraestruturas especializadas que não são encontradas em todos os laboratórios, exigindo, por vezes, investimentos avultados. (Soreide K, *et al* 2009)

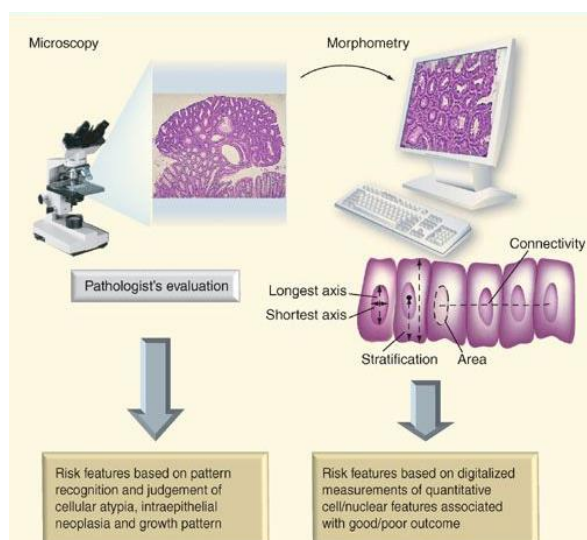


Figura 4 Esquema representativo sobre os passos necessários até à análise morfométrica de uma lâmina de histologia. Retirado de: Soreide, K. *et al* 2009 *Expert.Rev. Mol. Diagn.* Mar; 9 (2):125-37

2.3. ImageJ / FIJI

Criado por Wayne Rasband e seus colaboradores do National Institute of Health (Bethesda, MD, USA) é um software Java disponibilizado online de forma gratuita que é amplamente utilizado para efetuar tarefas de análise e manipulação de imagens, tendo aplicabilidade direta em fotografias de amostras histológicas. (Ferreira, T. & Rasband, W. 2012). É capaz de trabalhar com imagens 8-bit, 16-bit e 36-bit nos formatos TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM e FITS. A diferença entre o ImageJ e o FIJI é que o segundo já vem com todos os plug-ins disponíveis no site instalados. (Collins, T.J. 2007) (Ferreira, T. & Rasband, W. 2012). Apresenta uma interface muito *user-friendly* e no site oficial são facilmente encontrados tutoriais, manuais de utilizador e *plug-ins* que permitem ao utilizador diferentes abordagens à edição e análise de imagens com interesse na investigação biomédica. (Papadopoulos, F. *et al* 2007). Possui as ferramentas necessárias para diferentes tipos de análise morfométrica pois contém a capacidade de definição de escalas em grandezas reais (centímetros, milímetros, micrómetros, etc) possibilitando assim a medição de áreas, perímetros, distâncias e ângulos. Permite, também, a contagem de células e a criação histogramas de densidade. No que toca ao processamento de imagem permite a manipulação de contraste através de diferentes filtros (ex: *smooth / sharpen*) e através do balanço de cores. (Ferreira, T. & Rasband, W. 2012).

Em imagens histológicas é possível, em tecidos corados com H&E, com colorações diferenciais como o Tricrómico de Masson (TM) ou o *Sirius Red*, ou até mesmo amostras de imunocito/imunohistoquímica, efectuarem-se diferentes estudos morfométricos, sendo o mais importante para este trabalho a medição de áreas.

A medição de áreas é possível através da utilização de diferentes funcionalidades intrínsecas do programa. Para este fim, na barra de ferramentas principal (figura 5) são de salientar as ferramentas de seleção – marcadas com tracejado vermelho– e os comandos do menu - marcados a tracejado azul. Destes comandos os mais importantes são o *Color Threshold* o processo *Smooth* e as ações de *Set scale* e *Measure*.

O *Color Thresholding* é sem dúvida uma das mais importantes ferramentas no que diz respeito à medição de características complexas/descontínuas numa imagem. (imagem 6) Funciona através da separação de pixels com valores de intensidade diferentes com base em intervalos seleccionados. A seleção destes intervalos é feita manipulando os valores de *Hue* (seleção colorimétrica), *Saturation* (quantidade de cinzento na cor) e *Brightness*

(quantidade de branco e preto misturados na cor), permitindo desta forma a seleção de zonas que seriam difíceis de selecionar recorrendo apenas a ferramentas de seleção manual. (McNaughton, A. 2010) O *smooth* efetua a sobreposição de píxeis vizinhos, facilitando o *Color thresholding* e o *set scale* e o *measure* (imagem 6) permitem a definição de escalas e medição das áreas selecionadas possibilitando a obtenção de valor tangíveis após a sua seleção. (Ferreira, T. & Rasband, W. 2012).

É importante referir a possibilidade de selecionar manualmente e duplicar áreas selecionadas de interesse através do uso do botão direito do murganho bem como a capacidade de pintar de cor diferente áreas selecionadas. A escala escolhida é mantida e deste modo é possível aplicar o *Color threshold* evitando áreas de possível confusão durante a seleção colorimétrica. (Ferreira, T. & Rasband, W. 2012).

Por fim há que abordar a capacidade de criação de macros pelo programa. Macros são linhas código que se traduzem em programas simples que automatizam uma série de comandos do ImageJ. A forma mais fácil de serem criadas é através da utilização do memorizador de comandos incorporado no programa. Este à medida que diferentes ações são efetuadas produz linhas de código que são transcritas para um ficheiro. Este ficheiro é executável e irá sinalizar o programa a fazer todas as ações nele descritas. Isto permite que tarefas repetitivas sejam diminuídas a uma pequena quantidade de cliques permitindo diminuir a quantidade de trabalho e tempo consumido em cada tarefa. (Mutterer, J. & Rasband, W. 2012)

Todas estas ferramentas possuem um especial interesse quando a quantificação de áreas afetadas permite a comparação direta entre grupos de animais. No exemplo da fibrose, o uso de colorações diferenciais como o TM, que coram o colagénio de uma cor diferente do parênquima do órgão (azul e vermelho respetivamente) permitem que numa fotografia os píxeis correspondentes a lesões fibróticas tenham valores de intensidade bastante diferentes do restante parênquima possibilitando a sua seleção através do *Color threshold*, a sua quantificação e posterior análise (figura 7). (Collins, T.J. 2007)

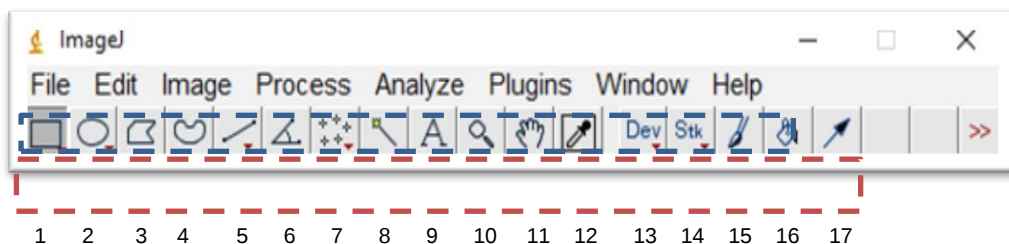


Figura 5 Barra de ferramentas principal do IMAGEJ. Dentro do tracejado vermelho as ferramentas de seleção e do tracejado azul o menu de comandos. Legenda: 1 – seleção em retângulo ; 2 – seleção oval ; 3 – seleção em polígono; 4- seleção livre; 1,2,3 e 4 – ferramentas de seleção de área; 5 – seleção em linha recta ; 6 – medição de ângulo; 7 – marcação de pontos; 8 – ferramenta de varinha (seleciona área consoante os graus de cor); 9 – Anotações; 10 – Zoom; 11 – Ferramenta de “scrolling”; 12 – seleção de cor; 13 – Menu do “developer”; 14 – Menu “Stacks” (para atribuir atalhos a teclas do teclado) 15 – pincel; 16 – balde de tinta (preenche da mesma cor uma área circunscrita) 17 – ponteiro de seleção

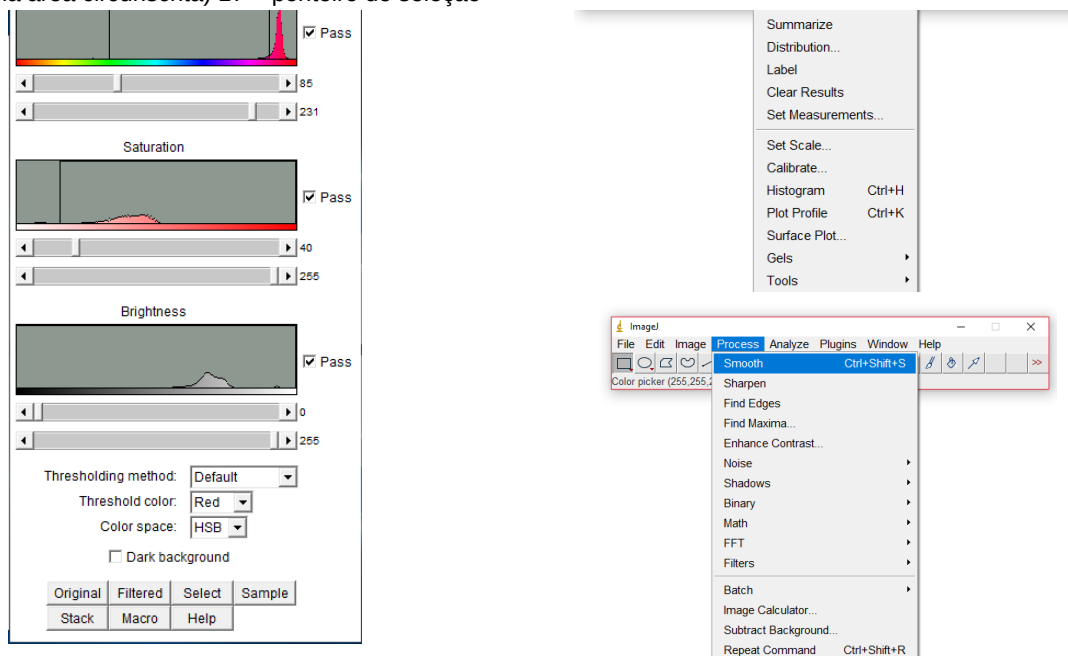


Figura 6 Comandos do ImageJ. À esquerda o *Color Threshold* – Barras *Hue*; *Saturation* e *Brightness* utilizados na seleção com base na cor de áreas de interesse. À direita em cima o processo *Smooth* para ajudar o processo, tornando a seleção de áreas mais fácil (atalho do teclado: Control + Shift + S) e à direita em baixo os comandos *Set Scale* e *Measure* (*Measure*: atalho no teclado – tecla M)

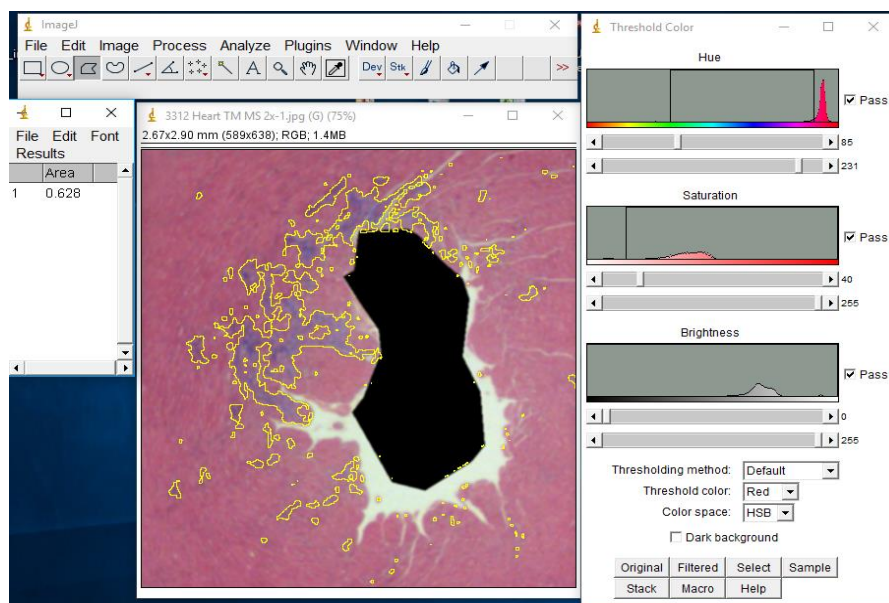


Figura 7 Análise de uma fotografia de uma secção de coração de murgancho tirada no estereoscópio e corada com TM com lesão fibrótica pintada de azul. Culminar do uso das diferentes ferramentas referidas. Seleção de área que manualmente seria de difícil e laboriosa execução

2.4. O murganho como modelo experimental

O murganho é atualmente o animal mais utilizado como modelo para investigação biomédica. Tal acontece porque partilha 99% do genoma com o humano o que significa que partilham características tanto fisiológicas como patológicas a nível dos diferentes sistemas do organismo sendo por isso utilizados extensivamente com o objetivo de conhecer melhor mecanismos fisiopatológicos de várias doenças, para avaliar a eficácia de novas drogas, prever respostas do paciente a novas terapêuticas e mesmo para desvendar mecanismos fisiológicos ainda pouco conhecidos através de estudos fundamentais. Tendo estas características em conta mais os factos de serem pequenos, de terem um temperamento dócil e serem fáceis de manter e reproduzir em cativeiro fizeram com que o murganho se tornasse o modelo experimental mais utilizado e escrutinado nos dias de hoje. (Rosenthal, N. & Brown, S. 2007)

Esta proximidade genómica aliada à necessidade de melhor entendimento dos mecanismos adjacentes de diferentes doenças levaram ao avanço nas tecnologias de manipulação genética com o objetivo de gerar murganhos modelo de doenças humanas. Isto permite a que, posteriormente, sejam subjugados a experimentação biomédica, algo não possível em pacientes humanos, com o intuito de melhor conhecer o impacto de um gene/molécula numa determinada doença. A sua utilização tem-se revelado extremamente valiosa em diversas patologias. Os modelos para diferentes tipos de cancro, doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, obesidade, ansiedade, depressão entre outros são apenas alguns exemplos a salientar. (Justice, M.J. & Dhillon, P. 2016)

O murganho de laboratório é uma criação artificial, não existindo por isso um verdadeiro “wild-type” (WT). O seu património genético deriva dos murganhos domesticados cuja origem esta ligada a anos de trocas entre colecionadores dos quatro cantos do mundo. O seu genoma é, por isso, um mosaico com origem em diferentes subespécies do *Mus musculus* (murganho comum), que incluem o *M.m. domesticus*, *M.m. castaneus*, *M.m. molossinus*, entre outros, sendo o genoma do *M.m. domesticus* o contribuidor predominante para a maior parte das estirpes, existindo contudo também evidência que outras espécies *Mus*, que não as *M. Musculus*, tenham contribuído para algumas estirpes. (Rosenthal, N. & Brown, S. 2007). No último século apareceram mais de 450 estirpes diferentes de murganhos de laboratório. No entanto a maior parte dos projetos de investigação utiliza um leque reduzido sendo as mais comuns os C57BL/6, BALB/c, C3H/He, 129, FVB, e os Swiss. (Rosenthal, N. & Brown, S. 2007)

Como referido, existem inúmeros modelos. A sua obtenção pode variar entre vários métodos nomeadamente através da indução de mutações ou através da indução química de lesões. (Justice, M.J. & Dhillon, P. 2016)

As mutações podem ser geradas por vários métodos, tendo começado com o uso de radiação ou compostos com capacidade de danificar o DNA, que apesar de rápidos e pouco dispendiosos levavam ao aparecimento descontrolado de múltiplas alterações genómicas sem interesse. Mais recentemente através de técnicas de engenharia genética mais avançada é possível induzir mutações únicas, em diferentes fases da vida e em tecidos localizados. Destas novas técnicas são de salientar o uso de murganhos transgénicos onde o gene de interesse é injetado no oócito fertilizado do murganho o qual irá dar origem a descendência com cópias extra desse gene e a manipulação de células estaminais do embrião, que permite manipular genes na sua localização original e dar origem a *knock-outs* (KO) quando se danifica a função desse gene ou *Knock-ins* quando se introduz uma versão alterada desse mesmo gene. Os murganhos originados através deste método nascem com um gene silenciado ou em sobre expressão o que permite aferir sobre o impacto fenotípico do mesmo em relação a murganhos não geneticamente modificados, os WT. Esta mutagénese pode ser controlada em relação ao tecido e fase da vida em que acontecem indo de encontro ao “modelo-ideal” pois uma grande parte das doenças em humanos acontece nas fases mais avançadas da vida. (Rosenthal, N. & Brown, S. 2007)

A indução química é um método mais simples. Tem como base o uso de compostos cujo o efeito já é amplamente conhecido e que a sua administração de algum modo lesiona um tecido alvo. Este tipo de modelo tem interesse para estudar o efeito de, por exemplo, terapêuticas regeneradoras. Exemplos deste tipo de modelo podem ser o uso de sulfato sódico dextrano para a indução de colite, a utilização de isoprenalina para induzir fibrose no miocárdio ou o uso de tetracloreto de carbono (CCl_4) na indução de necrose e fibrose hepática. (Rosenthal, N. & Brown, S. 2007) (Brooks, W.W. & Conrad, C.H. 2009) (Huang, Y. *et al* 2006).

Uma das formas para a avaliação fenotípica é a análise histopatológica de amostras e a sua posterior comparação entre genótipos.

Contudo o murganho não é um modelo perfeito apresentando algumas contrapartidas nomeadamente a dificuldade na previsão do fenótipo dos mutantes e da propagação de mutações que causem alterações na fertilidade. Não é o modelo mais

facilmente manipulável nem o ideal para todos os tipos de estudos sendo, por exemplo, as moscas da fruta e leveduras melhores modelos para pesquisas sobre ciclo celular enquanto que os peixe-zebra têm maior interesse em estudos do efeito de drogas. (Seok, J. *et al* 2013)

Apesar de ser um reconhecido e estabelecido modelo foi e é várias vezes questionado em relação à reprodutibilidade dos seus resultados pois muitas das vezes estes não são aplicáveis e originam ensaios clínicos com resultados, por vezes, pouco animadores. (Seok, J. *et al* 2013)

Mesmo tendo em conta as contrapartidas é inegável que o murganho, como modelo experimental, já teve um impacto profundo na investigação biomédica sendo expectável que continue a aumentar no futuro. (Rosenthal, N. & Brown, S. 2007) (Justice, M.J. & Dhillon, P. 2016)

2.5. Fibrose

A fibrose é a formação e deposição de tecido conjuntivo fibroso em excesso num órgão ou tecido, num processo reparativo ou reativo. Pode ter vários fenómenos que originem a sua formação nomeadamente doenças genéticas, processos inflamatórios, exposição a toxinas, alterações isquémicas ou doenças autoimunes, mas independentemente do estímulo inicial, a sua característica principal é a ativação de fibroblastos e miofibroblastos com consequente produção e deposição de matriz extracelular (ECM) no local da lesão. Esta deposição tem o intuito de reparar o tecido, porém, consoante a severidade, extensão e duração do dano esta deposição de ECM pode ou não ser reversível e afetar o normal funcionamento do tecido afetado. (Wynn, T.A & Thirumalai R.R 2012)

A fibrose é um fenómeno complexo. Após o dano tecidular de modo a restabelecer eficazmente a homeostase, a cascata da coagulação é o primeiro mecanismo a ser ativado. Quando o endotélio é danificado, as plaquetas circulantes são ativadas ao encontrar o colagénio exposto e o fator von Willebrand na camada subendotelial. O fator de coagulação II (protrombina) é clivado proteoliticamente para formar trombina. A trombina, por sua vez, funciona como uma serina-protease que converte o fibrinogénio solúvel em cadeias insolúveis de fibrina ajudando as plaquetas a reagruparem-se de modo a formarem o coágulo primário de fibrina para assegurar uma hemóstase rápida. As plaquetas ativadas

libertam fatores de crescimento que são potentes quimiotáticos para células inflamatórias para além de estimularem a síntese de ECM pelos fibroblastos locais. A libertação destes agentes quimiotáticos leva ao recrutamento de células inflamatórias para o local lesado com o objetivo primário de fagocitar detritos celulares e o de destruir o agente que causou a destruição do tecido. Após a limpeza do local ofendido dá-se a reparação do tecido. Para isto as células inflamatórias produzem fatores de crescimento (Ex: TGF- β) que iniciam vias de transdução de sinal que induzem a proliferação e ativação dos fibroblastos levando à diferenciação de alguns em miofibroblastos, responsáveis pela produção massiva de ECM (principalmente colagénio e glicosaminoglicanos) que irá preencher as áreas ocupadas outrora por células mortas. Este processo de reparação tecidual é complexo, com uma regulação rigorosa da síntese e da degradação da ECM de modo a assegurar a manutenção da arquitetura normal dos tecidos. Quando a degradação da ECM não consegue acompanhar a síntese, alterações profundas e por vezes irreversíveis acontecem na arquitetura do órgão. (Wynn, T.A & Thirumalai R.R 2012) (Borthwick, L.A., Wynn T.A., Fisher, A.J. 2014)

A fibrose é, então, o resultado final comum a várias doenças e está intrinsecamente associado a alterações inflamatórias num órgão. A deposição de colagénio é uma parte indispensável para a regeneração tecidual, contudo a forma como esta acontece é influenciada diretamente pela extensão, severidade e duração da lesão ao tecido podendo originar, em ultima instância, cicatrizes permanentes que levam ao mau funcionamento do órgão (ex: a fibrose observada na doença hepática terminal ou na doença renal crónica. É cada vez mais claro que este fenómeno é levado a cabo pela direta intereção entre populações celulares diferentes e múltiplos fatores de crescimento e citocinas (como demonstra a figura 8), tendo cada uma delas papeis importantes no desenrolar da mesma. (Borthwick, L.A., Wynn T.A., Fisher, A.J. 2014)

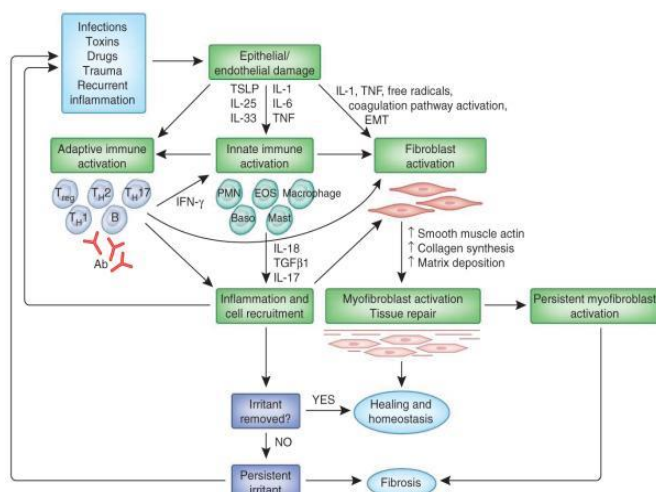


Figura 8 Esquema representativo do fenómeno de deposição de fibrose. Legenda: Ab – anticorpo. PMN – leucócitos polimorfonucleados. EOS – eosinófilo; Baso – Basófilo; Mast – Mastócito. TSLP – linfopoetina estromal do timo. IL – interleucinas. TNF – Factor de necrose tumoral. EMT – transição epitélio-mesenquimal. Retirado de Wynn, T.A & Thirumalai R.R 2012

2.5.1. Modelo Tetracloreto de Carbono (CCl₄)

Os modelos de fibrose hepática e cirrose podem ser induzidos através do uso de toxinas/compostos químicos. Um dos mais estudados é o tetracloreto de carbono. (Kumar, P. et al 2014). Este tipo de composto causa dano direto aos hepatócitos o que leva a uma reação inflamatória com ativação das células estreladas hepáticas e consequente deposição de fibrose. (Huang, Y. et al 2006). As células estreladas hepáticas são responsáveis pela acumulação e metabolismo da vitamina-A e recentemente descobriu-se que têm um papel fundamental na produção de matriz extracelular e deposição de tecido fibroso a nível do fígado. Após certos estímulos estas células são capazes de se diferenciar em células miofibroblásticas e assim ter um papel central na resposta do fígado ao dano celular. Estas células possuem inúmeras outras funções para além das supracitadas nomeadamente a de influenciar vários processos imunitários através da secreção de lipoproteínas, fatores de crescimento e citocinas. (Friedman, S.L. 2008)

O mecanismo fisiopatológico de ação do CCl₄, cuja fórmula química esta representada na figura 13, assenta no facto de este ser metabolizado pelo citocromo p450, presente nos hepatócitos, sendo principalmente mais ativo nos localizados perto do espaço centrolobular. Ao ser metabolizado, dá origem a um radical livre o Tricloreto de carbono (CCl₃) que é tóxico e induz a necrose das células hepáticas. As lesões são então caracterizadas pela presença de hepatócitos em diferentes fases de degenerescência, focos de necrose, infiltrados inflamatórios mistos e a deposição de colagénio. Esta fibrose é principalmente visível nas áreas centrolobulares que podem vir a dar origem a septos fibrosos e com ligações entre zonas centrolobulares (figura 14). (Huang, Y. et al 2006). (Kumar, P. et al 2014). Em casos muito severos pode levar mesmo à cirrose que é o tipo de lesão mais avançado e severo sendo normalmente irreversível. (Zhou, W., Zhang, Q., Qiao L.

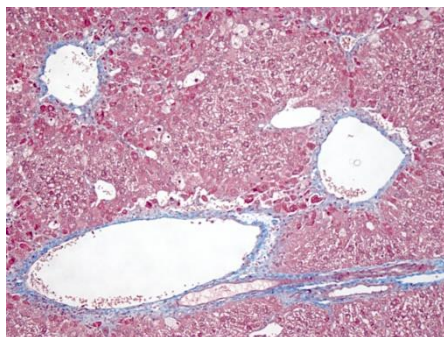
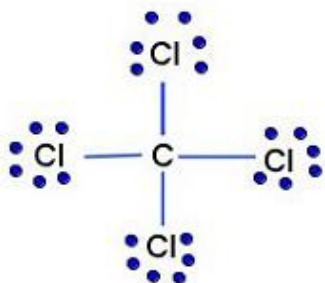


Figura 9 Fórmula química tetracloreto de carbono adaptado de <https://socratic.org/questions/what-is-the-molecular-geometry-of-ccl4-draw-its-vsepr-and-lewis-structure> acedido em 20-11-2016

Figura 10 Fígado 100x TM. Exemplo da imagem das lesões causadas pelo CCl₄ num fígado de murganho. Fotografia tirada pelo autor

2.5.2. Modelo Isoprenalina

A isoprenalina um simpaticomimético sintético agonista- β não seletivo análogo da epinefrina. A sua fórmula química encontra-se esquematizada na figura 9. Tem efeito por isso nos tecidos com células ricas em receptores beta como é o caso do coração. Está descrito que o uso abusivo pode levar a dano nos cardiomiócitos parecido ao causado por um enfarte. O mecanismo fisiopatológico de indução de dano no miocárdio acredita-se estar relacionado com um pico de diminuição da pressão sanguínea após administração da isoprenalina levando a dano mediado por hipoperfusão do músculo cardíaco. A administração deste fármaco leva também a marcada disfunção diastólica do ventrículo esquerdo. As características histológicas da necrose e consequente fibrose do miocárdio no murganho induzida por isoprenalina são a deposição de tecido fibrótico na região do subendocárdio/miocárdio, principalmente a nível do ventrículo esquerdo e na zona dos músculos papilares. Este padrão é semelhante ao encontrado em outros modelos de isquemia cardíaca (Ex: sutura da artéria descendente anterior esquerda). Tendo estas características em conta o uso deste modelo tem interesse em estudos sobre a resposta do músculo cardíaco ao dano celular e qual a sua capacidade de regeneração face a diferentes estímulos. (Brooks, W.W. & Conrad, C.H. 2009)

Diferentes protocolos recorrendo a diferentes dosagens em diferentes espaços temporais são utilizados consoante o tipo de estudo que se pretende efetuar. As amostras analisadas no presente trabalho foram obtidas através de 2 protocolos – através de injeções diárias e através do uso de bombas osmóticas subcutâneas (figura 10) que vão libertando de maneira continua doses baixas de isoprenalina. (Brooks, W.W. & Conrad, C.H. 2009) Os tipos de lesões observadas nestes modelos encontram-se representadas nas

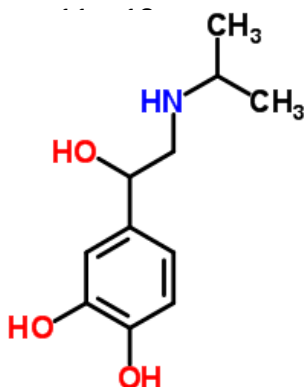


Figura 11 fórmula química da isoprenalina retirado de <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure3647.html> acedido em 20-11-2016

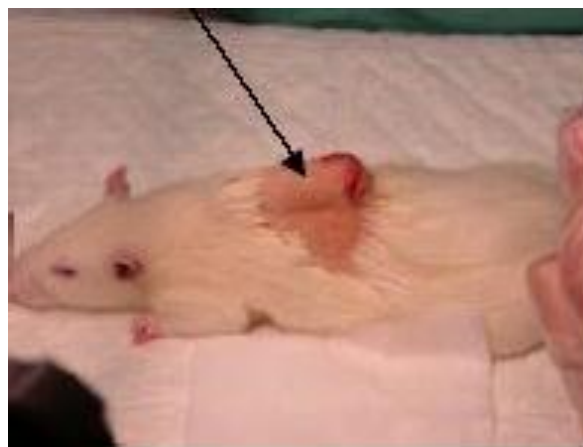


Figura 12 bomba osmótica em rato. Retirado de http://www.unige.ch/cyberdocuments/theses2004/HeQ/these_body.html acedido em 23-11-2016

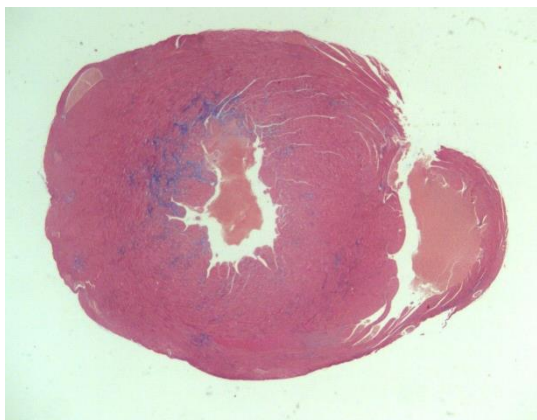


Figura 13 Coração 2x TM - exemplo de imagem histológica das lesões causadas pela isoprenalina num coração de murganho. Fotografia tirada pelo autor

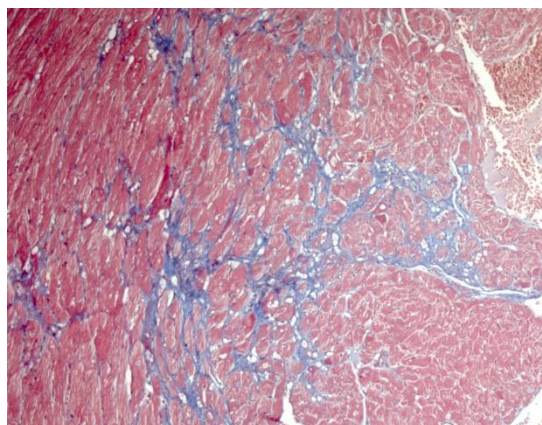


Figura 14 Coração 200x TM – ampliação da lesão fibrótica. De notar o padrão aleatório e desorganizado da deposição de colagénio. Fotografia tirada pelo autor

3. Objetivos

Aplicação do software ImageJ como auxiliar na gradação de lesões de fibrose em modelos experimentais.

Para tal propõem-se dois objetivos secundários:

- Definição de uma metodologia que origine resultados mais significativos de forma menos laboriosa em casos de fibrose hepática
- A validação de uma macro para permitir a medição de fibrose em miocárdio de murganho de forma mais célere.

4. Materiais e Métodos

Obtenção das amostras

Todas as amostras foram obtidas durante o desenvolvimento do estágio curricular na Unidade de Histopatologia do Instituto Gulbenkian da Ciência à medida que, diferentes

órgãos, eram enviados por grupos de investigação para a unidade para análise histopatológica sendo escolhidas para o presente estudo, amostras provenientes de modelos de fibrose do miocárdio (modelo da isoprenalina) e fibrose hepática (modelo do tetracloreto de carbono). A colheita e fixação em formol tamponado a 10% foi efetuada pelos investigadores e todo o processamento da amostra após até à obtenção das lâminas foi feita pelas duas técnicas de anatomia patologia residentes da unidade. Todas as lâminas selecionadas foram coradas com a coloração de Tricrómico de Masson (protocolo presente como apêndice IV) que corou de azul o colagénio e vermelho os hepatócitos/cardiomiócitos. Todas as lâminas de TM apresentavam 3 secções diferentes

4.1. Fibrose hepática

Delineamento experimental

Para tentar definir uma metodologia menos laboriosa, mas ao mesmo tempo que origine resultados significativos de uma secção do fígado, compararam-se as percentagens obtidas após a medição de área de fibrose e área total de parênquima em duas fotografias com uma ampliação de 40x, três fotografias a 100x e três fotografias a 200x, sendo os resultados comparados com uma fotografia a 40x da secção completa do fígado obtida através de 5 a 8 fotografias a 40x com sobreposição para permitir uma posterior colagem através do uso do software grátis Image Composite Editor Version 2.0.3.0 (64 bit) 2015 da Microsoft. (fotografia 15). As duas fotografias a 40x foram escolhidas com base em não se sobreporem e que se localizassem numa zona mais central da secção de fígado (Fotografia 16). As fotografias a 100x e 200x, foram tiradas de maneira aleatória, tendo o cuidado para não existirem áreas sobrepostas e que o parênquima ocupasse toda a área da fotografia (Fotografias 17 e 18). Escolheram-se apenas duas ou três fotografias para garantir que era o método menos laborioso possível em comparação com as fotografias necessárias para se elaborar uma colagem completa da secção.

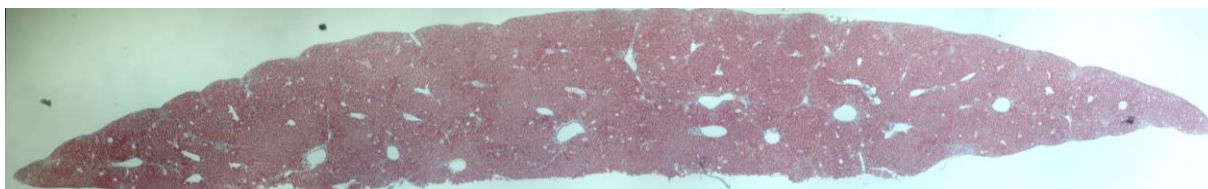


Figura 15 Fígado 40x TM – fotografia de uma secção inteira de fígado de murgancho, após a colagem das fotografias com sobreposição a 40x

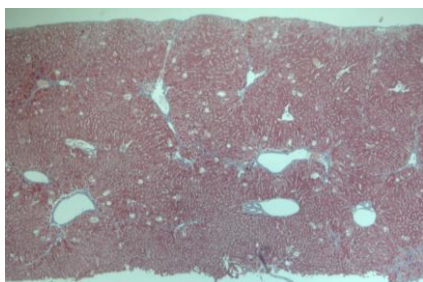


Figura 16 Fígado 40x TM – exemplo de uma fotografia utilizada para a medição de fibrose a 40x

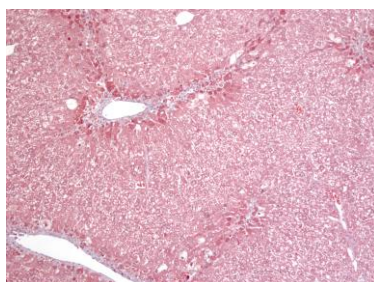


Figura 17 Fígado 100x TM – exemplo de uma fotografia utilizada para a medição de fibrose a 100x

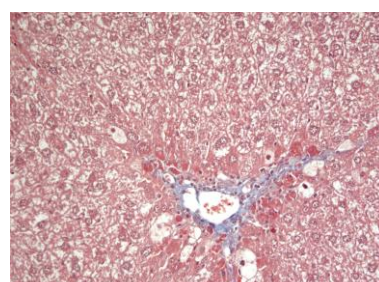


Figura 18 Fígado 200x TM – exemplo de uma fotografia utilizada para a medição de fibrose a 200x

Crítérios de inclusão e exclusão

Para o presente estudo, foram seleccionadas uma secção de fígado por lâmina com base no facto de apresentarem lesões de fibrose, validadas pelo patologista e que o Tricrómico de Masson tivesse corado de azul forte o colagénio. Foram excluídas amostras onde a coloração diferencial tenha dado resultados não fidedignos.

Obtenção de imagens para a quantificação de fibrose

Para a quantificação das extensões das lesões fibróticas hepáticas foram tiradas fotografias com o auxílio de um microscópio LEICA DMLB2 ligado a um computador MAC OS X Version 10.5.8 2.4ghz Intel Core 2 através do software LEICA FIRECAM obtendo-se ficheiros no formato TIFF ou JPEG. As fotografias para quantificação de fibrose hepática tinham uma resolução de 2088x1550 píxeis.

Quantificação das áreas de fibrose, áreas totais de secção e percentagem afetada

Após obtidas as imagens, para edição e análise das mesmas, foi utilizado o software grátis IMAGEJ, cujas funcionalidades foram anteriormente descritas. As escalas utilizadas foram: para fotografias com apiação de 2x 221 píxeis/mm; a 40x 0,734 píxeis/mm; a 100x 1.842 píxeis/mm e para 200x 3,673 píxeis/mm

A quantificação de fibrose e da área total da secção/parênquima presente na fotografia foi efetuada manualmente com o auxílio da ferramenta *Color threshold*, com base no descrito no apêndice I, presente no ImageJ e reportada em milímetros quadrados (mm²).

Posteriormente para a obtenção da percentagem afetada, dividiu-se a área de fibrose obtida sobre a área total, multiplicando-se o resultado por cem. O número de amostras de fígado analisadas foram 10 ($n=10$) o que levou à obtenção de 151 fotografias de diferentes ampliações (40x, 100x e 200x). Foram obtidas 40 percentagens diferentes.

Análise estatística

A estatística descritiva e inferencial foi realizada recorrendo ao programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 22.0.

Para os resultados obtidos sobre a fibrose hepática foram calculadas a média, mediana, máximos, mínimos e desvio padrão (estatística descritiva). Para definir se existiam diferenças estatisticamente significativas entre grupos foi efetuado um teste ANOVA após a confirmação da distribuição normal dos resultados através de um teste de Shapiro-Wilk. Para detetar correlações entre os resultados dos diferentes grupos do foram efetuados testes de Pearson. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

4.2. Fibrose miocárdio

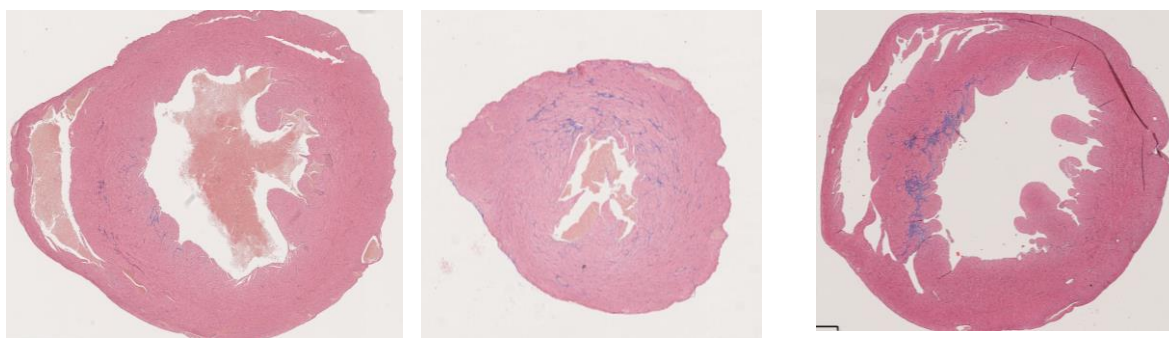
Delineamento experimental

A validação da utilização da macro como método válido para a quantificação de lesões fibróticas foi feita de duas formas.

Primeiro: a comparação de resultados obtidos através das duas metodologias em 45 amostras diferentes todas medidas pelo mesmo operador (o autor deste trabalho), sendo comparados os resultados obtidos para a área de fibrose, área total da secção e percentagem afetada.

Segundo: de maneira a aferir sobre a influência da variação inter-observador, quer no uso da macro, quer na medição manual, foram escolhidas 6 secções que, em grupos de dois, fossem claramente diferentes umas das outras em termos de área afectada pela fibrose e com o objetivo de serem minimamente representativas de modo a avaliar a efectividade dos métodos para o maior espectro possível de área afectada por lesões tendo

em conta as amostras disponíveis. Escolhidas as secções, como exemplificado nas figuras 19, 20 e 21, foi pedido a três observadores diferentes que medissem a área de fibrose, a área total de secção e a percentagem afectada recorrendo aos dois métodos para posterior comparação com os resultados obtidos pelos diferentes operadores através das diferentes metodologias. As zonas a serem medidas foram sempre validadas por um patologista de maneira a garantir que eram sempre medidas as mesmas áreas entre observadores e que zonas pintadas de azul, que não correspondiam a fibrose não eram incluídas (ex: zonas com colagénio de suporte da parede dos vasos sanguíneos)



Figuras 19, 20 e 21 – Coração 2x TM – exemplos de fotografias escolhidas para os diferentes operadores realizarem as medições. A primeira é de um coração muito pouco afectado, a segunda de um coração mais afectado, mas com lesões não muito proeminentes e no ultimo caso um coração fortemente afectado com lesões proeminentes.

Crítérios de inclusão e exclusão

Para esta parte do estudo foram incluídas todas as secções que, após uma cuidadosa análise histopatológica, foram diagnosticadas com lesões de tipo fibrótico no miocárdio. As lâminas apresentavam 3 secções (*Higher Section, Medium Section, Lower Section*) sendo seleccionadas todas as lâminas onde, pelo menos, uma das secções se encontrasse afectada por fibrose desprezando-se as secções que não estavam afectadas. Foram excluídas todas as secções não afectadas e casos onde o tricrómico de massom não corou o colagénio com um azul intenso.

Obtenção de imagens para a quantificação de fibrose

No caso das lesões no miocárdio, foi utilizado o estereomicroscópio LEICA MZ 12.5 conectado a um computador portátil TOSHIBA Intel R Core i7-2677M CPU 1.80ghz com 8gbs de RAM e o Windows 7 como sistema operativo através do software UEyeCockpit obtendo-se ficheiros no formato JPEG. Em alguns casos, foram digitalizadas lâminas através do uso do digitalizador Hamamatsu Nanozoomer-SQ Digital Slide Scanner D12140 e

foram adquiridas posteriormente fotografias em formato JPEG através da utilização do software NDP.view 2. As fotografias obtidas para a quantificação de fibrose de miocárdio tinham uma resolução de 2048x1536 pixels,

Quantificação das áreas de fibrose, áreas totais de secção e percentagem afetada

A quantificação de fibrose e da área total de secção neste caso foi feita através de duas metodologias, utilizando-se uma Macro escrita pelo autor deste trabalho e manualmente através do *Color threshold*, da maneira descrita no apêndice I. Para obtenção de uma percentagem, por secção, após medidas a área de fibrose e a área total da secção dividia-se o primeiro resultado pelo segundo e multiplicava-se por cem. As áreas a ser desprezadas eram selecionadas e pintadas de branco para que durante a medição, não interferirem com os resultados. No caso da quantificação de fibrose, eram selecionadas as zonas de interesse a serem medidas, criava-se um duplicado e media-se apenas na fotografia duplicada, garantindo assim não se estar a quantificar zonas sem interesse. (explicado nos apêndices).

Para ir de encontro ao objetivo proposto deste trabalho, a validação da macro dividiu-se em duas fases. Primeiro a comparação de resultados obtidos através do uso da macro com os resultados obtidos através da medição manual, sendo o operador o autor deste trabalho, o que levou à análise de 45 secções (n=45) e à obtenção de 45 fotografias numa ampliação de 2x e o número de medições obtidas foram 270 (135 através da macro e 135 manualmente). Para a segunda fase, foram escolhidas 6 secções (n=6) representativas dos resultados obtidos. Nesta fase, foram utilizadas 6 fotografias diferentes que originaram 24 medições, pois tratavam-se de 4 operadores diferentes (medições do autor e dos 3 operadores convidados).

Análise estatística

A estatística descritiva e inferencial foi realizada recorrendo ao programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 22.0.

Para os resultados referentes à fibrose do miocárdio, no que toca à estatística descritiva foram calculados os mesmos parâmetros que nas amostras de fígado. Para os resultados obtidos através da macro e à mão pelo autor deste trabalho a não normalidade dos resultados foi determinada através de um teste de Shapiro-Wilk, o que levou a que para verificar se existiam diferenças entre grupos estatisticamente significativas fosse realizado

um teste de Mann-Whitney. Para os resultados dos diferentes observadores, a normalidade foi verificada através do mesmo teste e as diferenças entre grupos desta vez recorrendo-se a um teste ANOVA. Para detetar correlações entre os diferentes métodos foram efetuados testes de Pearson (amostras com distribuição normal) e de Spearman (amostras sem distribuição normal). Valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos

5. Resultados

5.1. Fibrose Hepática

Com o objetivo da definição de uma metodologia que origine os resultados mais significativos, de maneira menos laboriosa em casos de fibrose hepática, foram comparadas as percentagens obtidas através da medição da fibrose em duas fotografias a 40x e três a 100x e 200x com as percentagens obtidas na secção total a uma ampliação de 40x. Analisando os resultados da tabela 1 em conjunto com os da tabela 2, é possível caracterizar e comparar os resultados obtidos através das medições a diferentes ampliações. Os quatro grupos apresentaram resultados semelhantes no que respeita a médias e desvios padrão, existindo algumas incongruências no que se refere aos máximos e mínimos. Estão, também assinalados casos onde se verificaram discrepâncias entre os resultados obtidos. Contudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre grupos ($p > 0,05$).

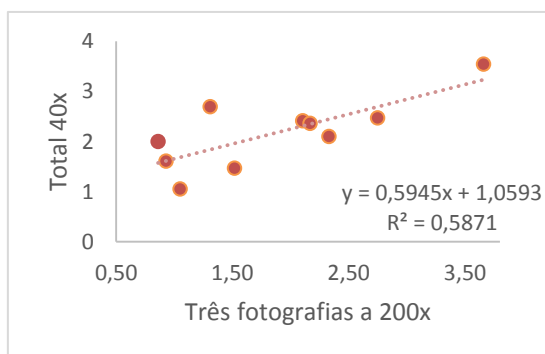
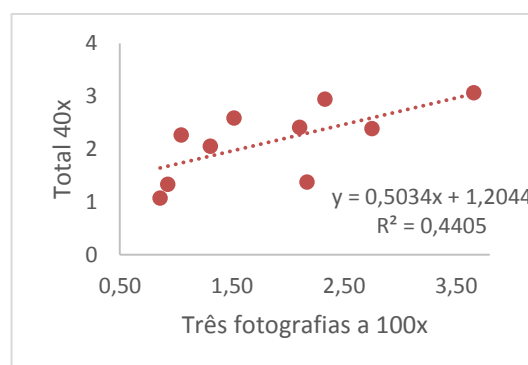
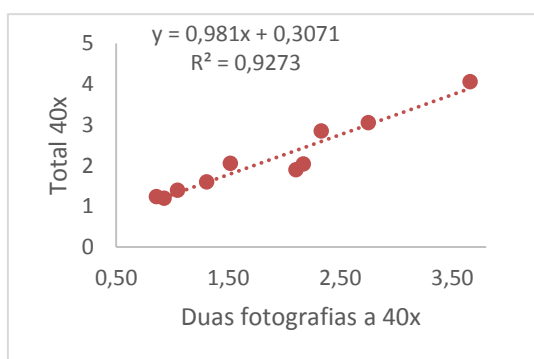
Tabela 1 Percentagens de parênquima hepático afetado por fibrose. Resultados obtidos das medições feitas a diferentes ampliações e com diferentes números de fotografias. Estão assinalados a amarelo os resultados que se afastaram do resultado obtido na imagem da secção total a 40x

Fígado Total 40x (%)	2 fotografias a 40x (%)	3 fotografias a 100x (%)	3 fotografias a 200x (%)
2.10	1.9	2.41	2.41
2.75	3.05	2.38	2.47
3.66	4.06	3.06	3.54
2.33	2.85	2.94	2.1
1.31	1.6	2.05	2.69
1.05	1.4	2.26	1.05
0.93	1.2	1.33	1.61
0.86	1.24	1.07	2
1.52	2.06	2.58	1.47
2.17	2.04	1.37	2.36

Tabela 2 Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos para a fibrose hepática

	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Total 40x	10	1.87	0.9	0.86	3.66
2 fotografias 40x	10	2.14	0.92	1.2	4.06
3 fotografias a 100x	10	2.15	0.68	1.07	3.06
4 fotografias a 200x	10	2.17	0.7	1.05	3.54

Ao analisarem-se os resultados demonstrados nas figuras 22, 23 e 24 para analisar o grau de correlação entre as diferentes metodologias, chegou-se à conclusão que existia uma correlação significativa e maior entre os resultados obtidos na fotografia total e as duas fotografias a 40x ($r = 0,963$; $p < 0,001$) quando comparadas com o coeficiente de correlação (r) das restantes ampliações (para as três fotografias a 100x $r = 0,664$ $p = 0,036$ e para as a 200x $r = 0,766$; $p = 0,01$)



Figuras 22, 23 e 24 – Gráficos de dispersão representativos dos resultados obtidos para a correlação entre os diferentes resultados a 40x, 100x e 200x respectivamente.

5.2. Resultados fibrose miocárdio

5.2.1 Validação da macro

De maneira a proceder-se à validação de uma macro para a medição automática de fibrose em miocárdio de murganho, numa primeira fase, compararam-se os resultados obtidos através do uso da macro com os resultados obtidos medindo manualmente com o auxílio do *Color threshold*. Ao aferir-se sobre os resultados presentes na tabela 3 e tabela 4, é de notar que os valores das médias, desvio padrão, máximos e mínimos são bastante semelhantes. Algo que foi corroborado pelo facto de não se encontrarem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. ($p>0,05$)

Tabela 3 Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos para a medição da fibrose de miocárdio através da utilização da macro

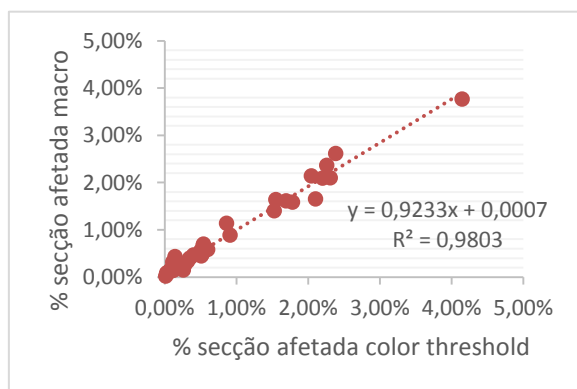
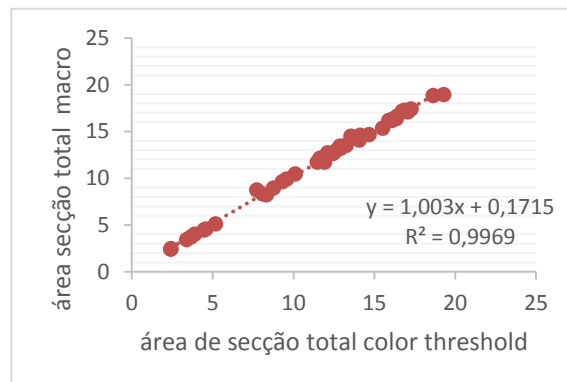
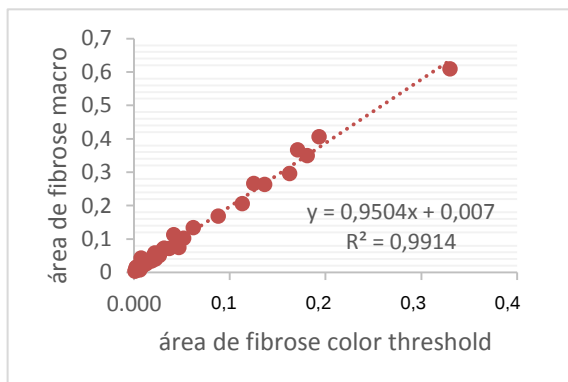
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Macro - Área de fibrose (mm2)	45	0.09	0,14	0,002	0,66
Macro – Área total (mm2)	45	11,75	4,69	2.42	19.3
Macro – Percentagem afetada (%)	45	0.74	0.92	0.015	4.15

Tabela 4 Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos para a medição manual através do *Color Threshold* da fibrose de miocárdio

	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
Color Threshold Área de fibrose (mm2)	45	0,10	0,13	0,003	0,61	P
Color Threshold Área total (mm2)	45	11,95	4,71	2.42	18,94	ara
Color Threshold Percentagem afetada (%)	45	0,76	0,87	0,02	3,77	este

caso, os resultados demonstrados nas figuras 25, 26 e 27 representativos sobre o grau de correlação entre os diferentes resultados obtidos através da macro e através da medição com o *Color*

Threshold, permitem concluir que existia uma forte correlação significativa entre ambos os métodos, para as 3 grandezas medidas. ($r=0,976$; $p<0,001$ para a área de fibrose; $r=0,997$ $p<0,001$ para a área total; e $r=0,954$; $p>0,001$ para as percentagens obtidas)



Figuras 25, 26 e 27 – Gráficos de dispersão representativos dos resultados obtidos para a correlação entre os diferentes resultados obtidos pela macro e pelo *Color Threshold* para as três grandezas medidas

5.2.2. Validação da macro em relação à variabilidade inter-observador

Na segunda fase da validação da macro efectuo-se a comparação de resultados obtidos por quatro operadores diferentes através do uso da macro e do método manual. Como se pode verificar ao compararem-se as tabelas 5 e 6, no que toca à medição das áreas de fibrose existe uma vez mais uma proximidade evidente entre os resultados obtidos através da macro e os resultados através do método manual. É de salientar também, uma maior congruência quando se comparam os resultados obtidos pelos 4 observadores com a macro e uma maior variabilidade nos resultados obtidos manualmente (variações de décimas/centésimas). Contudo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre grupos. ($p>0,05$)

Tabela 5 Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos por diferentes observadores para a medição da fibrose de miocárdio através da utilização da macro

Medição de fibrose com a Macro (mm2)					
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Operador 1	6	0,23	0,25	0,014	0,66
Operador 2	6	0,25	0,28	0,009	0,72
Operador 3	6	0,22	0,26	0,009	0,68
Operador 4	6	0,21	0,25	0,009	0,67

Tabela 6 Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos por diferentes observadores para a medição da fibrose de miocárdio através da medição manual com o *Color Threshold*

Medição de fibrose através do <i>Color Threshold</i> (mm2)					
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Operador 1	6	0,21	0,23	0,017	0,61
Operador 2	6	0,24	0,24	0,029	0,60
Operador 3	6	0,18	0,18	0,022	0,46
Operador 4	6	0,18	0,20	0,014	0,51

Ao analisarem-se as tabelas 7 e 8, onde estão os resultados obtidos para a área total da secção, continua a verificar-se a semelhança entre os resultados obtidos através dos 2 métodos e entre os 4 observadores. Neste caso, a variabilidade de resultados dentro de cada grupo é quase idêntica nos dois casos. Não foram, mais uma vez, encontradas diferenças estatisticamente significativas entre grupos. ($p>0,05$)

Tabela 7 Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos por diferentes observadores para a medição da área total de secção de coração através da utilização da macro

Medição da área total da secção com a Macro (mm2)					
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Operador 1	6	11,82	5,04	2,42	16,43
Operador 2	6	12,34	5,31	2,63	17,22
Operador 3	6	11,73	4,95	2,51	16,31
Operador 4	6	11,61	4,90	2,46	15,91

Tabela 8 Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos por diferentes observadores para a medição da área total de secção de coração através da medição manual com o *Color Threshold*

Medição da área total de secção através do <i>Color Threshold</i> (mm2)					
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Operador 1	6	12,06	5,14	2,42	16,65
Operador 2	6	12,71	5,29	2,70	17,56
Operador 3	6	12,02	4,94	2,60	16,27
Operador 4	6	11,89	4,95	2,53	16,30

Ao aferir-se sobre os resultados presentes nas tabelas 9 e 10, onde se apresentam os resultados obtidos para as percentagens de secção afetada, observa-se mais uma vez, que os resultados são semelhantes quando se comparam os 2 métodos e entre os 4 observadores. Neste caso, a variabilidade de resultados dentro de cada grupo parece ser um pouco maior nas medições manuais, mas não foram, tal como nos outros casos, encontradas diferenças estatisticamente significativas entre grupos. ($p>0,05$)

Tabela 9 Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos por diferentes observadores para a percentagem de secção afectada através da utilização da macro

Medição da percentagem de secção afectada com a Macro (%)					
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Operador 1	6	1,72	1,43	0,12	4,15
Operador 2	6	1,77	1,52	0,07	4,22
Operador 3	6	1,62	1,55	0,08	4,29
Operador 4	6	1,58	1,50	0,08	4,21

Tabela 10 Resultados da análise estatística descritiva dos resultados obtidos por diferentes observadores para a percentagem de secção afectada através da medição manual com o *Color Threshold*

Medição da percentagem de secção afectada através do <i>Color Threshold</i> (%)					
	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Operador 1	6	1,59	1,28	0,15	3,77
Operador 2	6	1,68	1,29	0,25	3,60
Operador 3	6	1,31	1,05	0,19	2,93
Operador 4	6	1,33	1,23	0,28	3,28

Os resultados presentes nas tabelas 11 e 12 demonstram que existe uma forte correlação entre os resultados obtidos pelos diferentes observadores através das diferentes metodologias no que toca à área de fibrose, havendo, contudo, casos onde esta correlação é mais baixa quando utilizado o *Color Threshold*. Para todos os casos as correlações foram significativas ($p < 0,05$)

Tabelas 11 e 12 – Comparação dos coeficientes de correlação obtidos entre as medições dos diferentes operadores para a área de fibrose, com a utilização da macro e recorrendo apenas ao *Color Threshold*, respectivamente

Área de fibrose Macro					Área de fibrose <i>Color Threshold</i>				
	Operador 1	Operador 2	Operador 3	Operador 4		Operador 1	Operador 2	Operador 3	Operador 4
Operador 1	1	0,997	0,999	0,998	Operador 1	1	0,982	0,989	0,913
Operador 2	0,997	1	0,996	0,993	Operador 2	0,982	1	0,995	0,875
Operador 3	0,999	0,996	1	0,999	Operador 3	0,989	0,995	1	0,916
Operador 4	0,998	0,993	0,999	1	Operador 4	0,913	0,875	0,916	1

As tabelas 13 e 14 voltam a assinalar uma forte correlação entre os resultados obtidos pelos diferentes observadores através das duas metodologias no que toca à área de secção total, sendo que desta vez, esta correlação é igualmente forte para todos os casos. As correlações foram significativas para todos os resultados ($p < 0,05$)

Tabela 13 e 14 Comparação dos coeficientes de correlação obtidos entre as medições da área total de secção dos diferentes operadores, com a utilização da macro e recorrendo apenas ao *Color Threshold*, respectivamente

Área total de secção Macro					Área total de secção <i>Color Threshold</i>				
	Operador 1	Operador 2	Operador 3	Operador 4		Operador 1	Operador 2	Operador 3	Operador 4
Operador 1	1	0,994	0,998	0,999	Operador 1	1	0,992	0,998	0,998
Operador 2	0,994	1	0,996	0,997	Operador 2	0,992	1	0,999	0,999
Operador 3	0,998	0,996	1	0,999	Operador 3	0,998	0,999	1	0,999
Operador 4	0,999	0,997	0,999	1	Operador 4	0,998	0,999	0,999	1

Por fim, ao analisar as tabelas 15 e 16 os resultados obtidos pelos diferentes observadores através das duas metodologias no que toca à percentagem de secção afetada apresentam, mais uma vez, uma forte correlação, mas são de salientar casos na tabela do *Color Threshold* em que esta correlação é mais baixa e variável entre observadores quando comparada com o mesmo tipo de correlação quando se utilizou a Macro. As correlações foram significativas para todos os resultados mais uma vez ($p < 0,05$).

Tabela 15 e 16 Comparação dos coeficientes de correlação obtidos entre as medições dos diferentes operadores, para a percentagem de secção afetada com a utilização da macro e recorrendo apenas ao *Color Threshold*, respectivamente

Percentagem de secção afetada Macro					Percentagem de secção afetada Color Threshold				
	Operador 1	Operador 2	Operador 3	Operador 4		Operador 1	Operador 2	Operador 3	Operador 4
Operador 1	1	0,993	0,989	0,991	Operador 1	1	0,967	0,971	0,848
Operador 2	0,993	1	0,993	0,991	Operador 2	0,967	1	0,992	0,857
Operador 3	0,989	0,993	1	0,999	Operador 3	0,971	0,992	1	0,895
Operador 4	0,991	0,991	0,999	1	Operador 4	0,848	0,857	0,895	1

6. Discussão

Quantificar uma imagem com fins comparativos nem sempre é uma tarefa fácil, podendo muitas das vezes transformar-se em algo moroso, trabalhoso e dar origem a valores díspares entre observadores. Tentou-se com este trabalho, oferecer ferramentas para contornar estas dificuldades.

Fibrose hepática

No que se refere à quantificação de fibrose em fígados, na literatura a metodologia varia bastante, sendo o mais normal a quantificação através de um certo número de imagens tiradas de maneira aleatória a ampliações diferentes. (Amin *et al* 2016; Tong, Z *et al* 2009). O que levanta um problema, pois ao ser aleatório pode, em certos casos não ser representativo e levar a resultados errados. Tendo isto em conta, uma imagem completa de uma secção é vista como o ponto de comparação em termos de representatividade da

mesma, com as contrapartidas da sua obtenção e quantificação a partir dela serem morosas e complicadas. Com isto em mente, neste trabalho tentou-se descobrir se menos fotografias a ampliações diferentes seriam ou não representativas dessa mesma secção. Com base nos resultados da análise estatística, quando comparado com as medições obtidas na secção inteira, duas fotografias a 40x, três fotografias a 100x e 200x não apresentam diferenças estatisticamente significativas. No entanto, quando se analisam os coeficientes de correlação, observa-se que esta é consideravelmente maior entre a percentagem obtida na fotografia total e as duas fotografias a 40x do que com as restantes ampliações. Isto, aliado ao facto de se ter uma amostra pequena ($n=10$) permite uma mais fácil análise caso a caso, sendo possível determinar os casos em que as medições obtidas as 100x e 200x são díspares quando comparadas com as da secção total. (marcados na tabela 2 nos resultados). Este fenómeno pode ter acontecido pois, ao tirarem-se as fotografias de maneira aleatória a ampliações tão altas, foram tiradas fotos a zonas fortemente afetadas ou zonas quase não afetadas, o que em casos com percentagens baixas de fibrose pode levar a uma sobrevalorização/subvalorização do real valor. O facto de não existirem casos tão díspares entre os dois primeiros grupos de resultados, poderá estar relacionada o facto de as fotos não terem sido tiradas totalmente de maneira aleatória e a ampliação não ser tão alta, tornando mais difícil o fenómeno de sobrevalorização/subvalorização.

Por essa razão é necessário abordar algumas limitações deste estudo. O facto da amostra, apesar de seguir uma distribuição normal, ser pequena ($n=10$) e de apresentar sempre resultados baixo de áreas afetadas (o máximo observado foi de 3,66%, em casos de cirrose pode ir até perto de 30%) (Amin *et al* 2016) pode induzir que casos onde variações de apenas 1% tenham um impacto maior que o verdadeiro. Seria interessante verificar como esta variação se comportava em amostras fortemente afetadas. No presente trabalho, a explicação para uma amostra reduzida, prende-se pelo facto de para efectuar esta comparação dinâmica entre quatro métodos diferentes para 10 amostras, tiveram que ser retiradas 151 fotografias que posteriormente tiveram que ser individualmente analisadas e manipuladas. Tem, sem dúvida, interesse aprofundar o tipo de estudo individualmente para cada ampliação e com uma amostra maior. Apesar de tudo isto, tendo em conta os resultados obtidos, pode-se afirmar que em casos como o de fibrose hepática causada por CCl_4 , onde a lesão segue um padrão, duas fotografias da zona mais central do fígado traduzem-se em resultados representativos da secção correspondente. Três fotografias aleatórias a 100x ou a 200x em casos de fígado pouco afetados, apesar de estatisticamente não existirem diferenças de médias significativas, podem dar origem a casos onde a variação é considerável quando comparada com a secção total. Esta comparação, caso a

caso, faz sentido na óptica do autor, pois normalmente os grupos de animais são pequenos e, por vezes, basta um ou dois animais apresentarem variações pequenas para levar a que todo o objetivo de uma investigação não chegue a bom porto, daí a necessidade da maior precisão possível.

Por fim, o aumento de número de fotografias, indo um pouco de encontro ao estudo de Amin *et al* 2016, de maneira a abranger uma maior área e diluir o efeito de uma foto sobre o total é, sem dúvida, algo a ter em conta, mas poderá não fazer sentido aumentar muito esse número pois pode, em termos de trabalho, em certos casos quase equiparar-se ao realizar-se as medições na secção total. No caso do estudo referido, foram utilizadas 10 fotografias aleatórias a 200x como representativas do fígado no geral. A comparação destes resultados com a bibliografia é complexa, pois existem muitos estudos publicados sobre fibrose hepática, mas poucos sobre a representatibilidade das lesões em secções do fígado, sendo que quando o fazem tentam correlacionar com sistemas de gradação (Amin *et al* 2016). Na maior parte dos casos a quantificação de fibrose é feita para permitir abordar outras temáticas, como a influência das células estreladas na progressão de doença ou estudos fundamentais na descoberta dos mecanismos moleculares da deposição de fibrose e não aferir sobre como se deve efectuar a mais correcta medição. (Goodman, Z *et al* 2007; Carpino, G *et al* 2005). Os únicos estudos encontrados que abordavam de forma crítica a maneira como se fazem quantificações de fibrose no fígado eram em amostras de biópsia de fígados humanos (Wang, Y., Hou, J. 2015 & Standish, R.A. *et al* 2006) o que complica um pouco a comparação, pois numa biópsia a questão da representatividade coloca-se de forma um pouco diferente. Algo também notado durante a comparação com a bibliografia, é que em vários os estudos em vez do TM, utilizavam o *sirius red* como coloração diferencial e utilizavam metodologias de quantificação mais complexas, como a utilização de microscopia polarizada, algo que pode sem dúvida facilitar o processo, mas exige instrumentos mais especializados. (ex: Goodman, Z *et al* 2007 & Tong, Z *et al* 2009). Um tipo de estudo que poderá ter interesse no futuro será averiguar qual a correlação entre os resultados obtidos numa fotografia da secção total a 40x com imagens da secção total obtidas em digitalizadores de lâminas. (ex: Hamamtsu Nanosizer-SQ Digital Slide Scanner D12140-01)

Fibrose miocárdio

O uso da segmentação de cor (*Color Thresholding*) encontra-se bem descrito como método para quantificar fibrose em miocárdio (Teekakirikul. P. *et al* 2010). O uso de macros

para o mesmo fim está também descrito, bem como a sua validação em relação ao tempo poupado e aos resultados obtidos com outras metodologias, mas em amostras coradas com *sirius red*. (Hadi, A.W. *et al* 2011) (Ellims, A.H. *et al* 2015). Neste trabalho, as amostras utilizadas foram coradas com TM e por isso decidiu-se tentar criar uma macro que facilitasse este tipo de trabalho e que fosse validada em relação à fiabilidade dos resultados.

Os resultados da análise estatística, ao não serem encontradas diferenças significativas entre as médias dos resultados obtidos medindo à mão (método ideal para comparar pois têm-se a certeza do que se está a medir em tempo real) e a macro em conjunto com a forte correlação demonstrada para todas as medições, corroboram a permissão que esta macro é viável para quantificar fibrose nas condições controladas de trabalho encontradas. Contudo, há que apontar que neste caso os resultados não seguiam uma distribuição normal, o que levou a realização de testes não paramétricos (Mann-Whitney) para se chegar a alguma conclusão. Esta não normalidade é explicada pela grande quantidade de amostras com muito baixa quantidade de fibrose (menor que 1%) e de poucas amostras com percentagens mais altas (2-4%). É de salientar também que a amostra neste caso é considerável (n=45).

Foi também testada a variabilidade inter-observador e qual a relação entre esta, a macro e a medição à mão. Mais uma vez com base nos resultados estatísticos (neste ponto as amostras já seguiam uma distribuição normal, pois foram escolhidas de maneira a formarem grupos, descritos anteriormente) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as medições obtidas entre os diferentes observadores nem com a macro, nem medindo manualmente. Contudo, esta segunda apresentava indicadores de variância mais elevados que a macro e em certos casos coeficientes de correlação mais baixos. Esta variabilidade é mais marcada quando se trata de medir grandezas muito pequenas como as áreas de fibrose e consequentes percentagens. No caso das áreas totais esta diferença, devido ao maior tamanho do que estava a ser medido, é menos demarcada. Tudo isto indica no sentido em que a utilização de macros é uma ferramenta válida e que de acordo com o descrito na bibliografia permite poupar-se tempo, reduzirem-se tarefas repetitivas a meros cliques e dar origem a resultados menos variáveis entre observadores. (Hadi, A.W. *et al* 2011) (Ellims, A.H. *et al* 2015).

O facto de a fibrose ser medida na secção toda é, na opinião do autor, uma mais valia. Em comparação com o descrito, (ex: por Wolf, C.M *et al* 2005 & Ellims, A.H. *et al* 2015) muitas das vezes a fibrose é quantificada em fotografias tiradas de forma aleatória a

ampliações muito altas (ex: trinta imagens a 100x), o que é mais laborioso que ser feito de uma só vez após se ter tirado apenas uma fotografia a uma secção inteira, sendo que teoricamente os resultados serão mais representativos quando comparado com os resultados de várias fotos aleatórias.

É também interessante referir que, de acordo, com um estudo de Daunoravicius *et al* 2014 onde são comparados os resultados obtidos por diferentes metodologias digitais de quantificação de fibrose (estereologia e métodos colorimétricos) e os resultados obtidos por gradação visual entre patologistas experientes foi demonstrado que a quantificação digital é mais precisa e menos variável em comparação com a gradação visual algo que permite entender a importância deste tipo de métodos como auxílio à obtenção de dados precisos e invariáveis.

Contudo, este estudo apresenta algumas limitações sendo a principal o número baixo de amostras que os diferentes operadores mediram. O ideal seria que, pelo menos, as 45 amostras fossem repetidas na íntegra, mas isso obrigaria os observadores a um trabalho bastante intenso e moroso algo que o autor deste trabalho não achava correcto visto que os três trabalharam nisto por pura cortesia. Outra limitação é que os operadores, apesar de sempre apoiados e a maior parte das suas decisões terem sido validadas por um patologista, não eram patologistas, mas estudantes do 6º ano do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona.

7. Conclusão

Existem algumas conclusões que podem ser tiradas após a realização deste trabalho.

No caso da quantificação de fibrose hepática e qual a maneira que origina resultados mais representativos da secção analisada, pode afirmar-se que duas fotografias a 40x são representativas e as que ao autor oferecem mais confiança para darem resultados fidedignos repetidamente. O ideal será no futuro repetir-se este tipo de trabalho e tentar correlaciona-o com, por exemplo, sistemas de gradação. Com isto, este trabalho ao responder ao que é representativo por secção, que sirva como ponto de partida para se

chegar um dia ao que é representativo da lâmina, para depois ao que é representativo do órgão.

No caso da quantificação de fibrose do miocárdio, a metodologia apresentada é válida para as condições descritas do ponto de vista da repetibilidade, precisão e diminuição da quantidade de trabalho. Tendo em conta que se trata de um ficheiro editável, pode ser facilmente adaptado para ir de encontro a outras necessidades em condições de trabalho distintas (ex: diferentes microscópios). Como ideia de trabalho futuro, a repetição de medições por mais operadores diferentes com um maior número de amostras tem, sem dúvida, interesse.

8. Bibliografia

Amin et al (2016) – *Assessment of Hepatic Fibrosis by Image Analysis Software in relation to physiological markers*. International Journal of Advanced Research, Vol 4, Issue 4, 1676-1688

Borthwick, L.A., Wynn T.A., Fisher, A.J. (2014) – *Cytokine mediated tissue fibrosis*. Biochim.Biophys. Acta. Jul; 1832(7): 1049-1060

Brooks, W.W & Conrad, C.H (2009) – *Isoproterenol-Induced Myocardial Injury and Diastolic Dysfunction in Mice: Structural and Functional Correlates*, Comp Med. 2009 Aug; 59 (4):339-343

Carpino, G et al (2005) – *Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation*. Digestive and Liver Disease 37: 349-356

Ciaramella, P., et al (2017) - *Analysis of histological and immunohistochemical patterns of benign and malignant adrenocortical tumors by computerized morphometry*. Pathol. Res. Pract Mar 9 (16) 30242-4

Collins, T.J. (2007) – *ImageJ for Microscopy*. BioTechniques 43: S25-S30

Daunoravicius, D et al (2014) – *Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology*. Diagnostic Pathology. 9:114

Di Ieva, A et al (2012) – *Computer-assisted and fractal based morphometric assessment of microvasculature in histological specimens of gliomas*, Scientific Reports 2, Article number: 429, doi:10.1038/srep00429

Ellims, A.H. et al (2015) – *A comprehensive evaluation of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy with cardiac magnetic resonance imaging: linking genotype with fibrotic phenotype*. European Heart Journal. Cardiovascular imaging 15, 1108-1116.

Ferreira, T. & Rasband, W. (2012) – *ImageJ User Guide 1.46 revised edition*. – Acedido em 31/5/2017 em <http://imagej.nih.gov/ij>

Friedman, S.L. (2008) – *Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver*. *Physiol Rev.* Jan; 88 (1): 125-172

Fritsch S., Grimm H., (1969) - *Methodical studies of ultrastructural morphometry using leukemic cells as models*. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 3(2):127-36.

Fontollet-Girardier C. (1972) - *Morphology and morphometry of toxic adenomas of the thyroid gland*. *Virchows Arch A. Pathol Pathol Anat.* 355(3):253-63.

Goodman, Z et al (2007) – *Progression of Fibrosis in advanced chronic hepatitis C: Evaluation by morphometric image analysis*. *Hepatology* 45: 886-894

Hadi, A.W. et al (2011) – *Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis*. *Cell oncol.* 34:343-354

Huang, Y. et al (2006) - *Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl₄ induced hepatic fibrosis in rats*. *World J Gastroenterol.* Mar 7; 12 (9): 1386-1391.

Ishak, K. et al (1995) – *Histological grading and staging of chronic hepatitis*. *Journal of Hepatology.* 22; 696-699

Justice, M.J. & Dhillon, P. (2016) – *Using the mouse to model human disease: Increasing validity and reproductibility*. *Dis.Model Mech-* Feb 1; 9 (2): 101-103.

Kumar, P. et al (2014) - *Adiponectin Agonist ADP355 Attenuates CCl₄-Induced Liver Fibrosis in Mice*, *Plos One*; 9 (10): e110405

Mc.Naughton, A. (2010) – *Measuring Area Using Thresholds*. *Otago Center for Confocal Microscopy* – acedido em 30/5/2017 em <http://occm.otago.ac.nz/resources/ImageJ-Thresholding.pdf>

Mutterer, J. & Rasband, W. (2012) – *ImageJ Macro Language Programmer's Reference Guide v1.46d* – acedido em 30/5/2017 em <http://imagej.nih.gov/ij>

Papadopoulos, F. et al (2007) – *Common Tasks in Microscopic and Ultrastructural Image Analysis Using ImageJ*. *Ultrastructural Pathology*, 31:401-407

Rahman SM, Itakura H. (1996) *Morphometry in histopathology. An image analysis workstation for the pathology laboratory*. Anal Quant Cytol Histol. Dec;18(6):471-80.

Rathore A.S., et al (2017) - *Redefining epithelial characterization in oral submucous fibrosis using morphometric analysis*. J Oral Maxillofac Pathol. Jan-Apr;21(1):36-40.

Rosenthal, N. & Brown, S. (2007) - The mouse ascending: Perspectives for human-disease models. Nature Cell Biology. September (9):993-999

Schofield, P.N., Ward, J.M. & Sundberg, J.P. (2016) – *Show and tell: disclosure and data sharing in experimental pathology*. Dis Model Mech. Jun 1;9(6): 601-605

Scudamore, C.L. et al (2016) – *Recommendations for minimum information for publication of experimental pathology data: MINPEPA guidelines*. J Pathol. 238: 359-367

Seamons A., Treuting P.M., Brabb T., Maggio-Price L. (2013) - Characterization of Dextran Sodium Sulfate-Induced Inflammation and Colonic Tumorigenesis in Smad3^{-/-} Mice with Dysregulated TGFβ. PLoS One. Nov 11;8(11):e79182.

Seok, J. et al (2013) – *Genomic Responses In mouse models poorly mimic human inflammatory diseases*. Proc Natl Acad Sci USA. Feb 26; 110 (9): 3507-12

Soreide K., et al (2009) - *Endoscopy, morphology, morphometry and molecular markers: predicting cancer risk in colorectal adenoma*. Expert Rev Mol Diagn. 2009 Mar; 9 (2): 125-37. doi: 10.1586/14737159.9.2.125.

Standish, R.A. et al (2006) – *An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis*. Gut; 55: 569-578

Teekakirikul. P. et al (2010) – *Cardiac Fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf-beta*. The journal of clinical investigation. Vol 120 nº10

Tong, Z et al (2009) – *Susceptibility to liver fibrosis in mice expressing a connective tissue growth factor transgene in hepatocytes*. Hepatology, September; 50 (3): 939-947

Wang, Y., Hou, J. (2015) – *Current Strategies for quantitating fibrosis in liver biopsy*. Chin Med J. Jan 20; 128 (2): 252-258

Wynn, T.A & Thirumalai R.R (2012) – *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease*. Nature Medicine Jul (18): 1028-1040

Wolf, C.M *et al* (2005) – *Somatic events modify hypertrophic cardiomyopathy pathology and like hypertrophy to arrhythmia*. PNAS, vol 102. No50 18123-18128

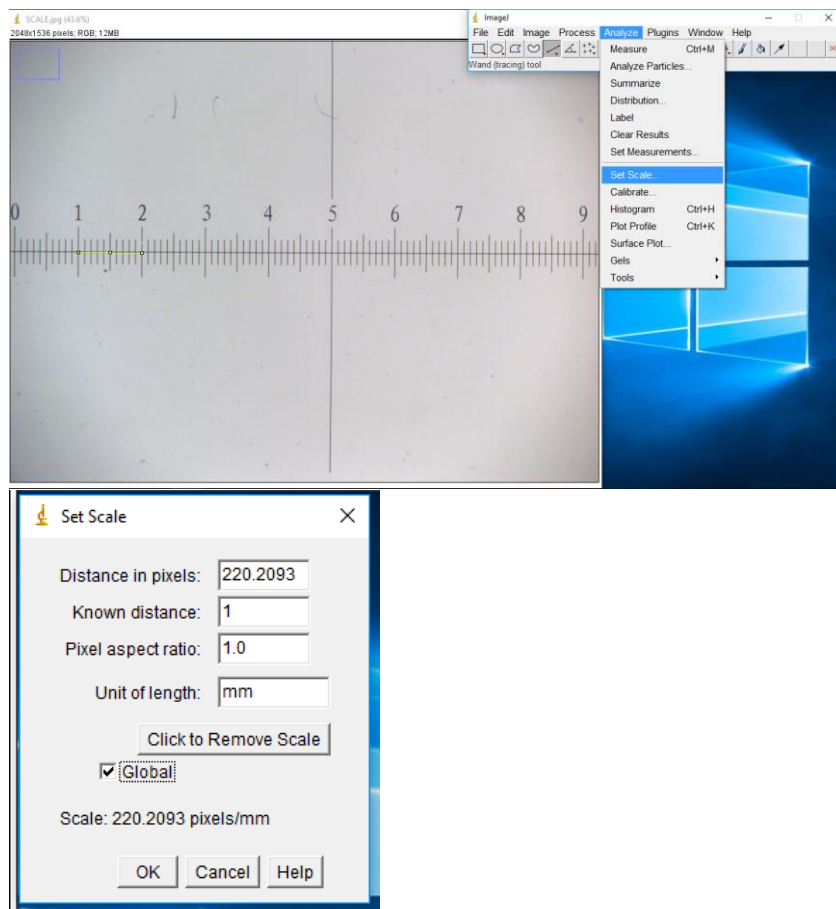
Zhou, W., Zhang, Q., Qiao L. (2014) – *Pathogenesis of Liver cirrhosis*. World J Gastroenterol. Jun 21; 20 (23): 7312-7324

Apêndices

Apêndice I – Descrição do método manual de medição de fibrose através do uso do *Color Threshold*

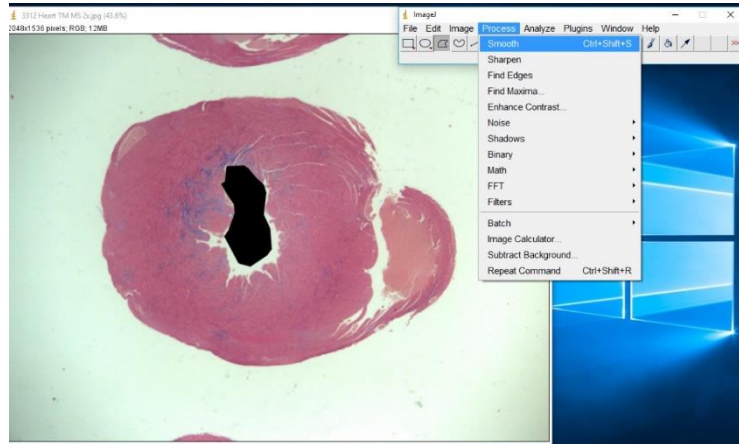
- 1) Começar por designar a escala. Para fotografias a 2x na lupa existe esta fotografia. Para fotografias no microscópio Leica LEICA DMLB2 noutras ampliações, existem já as escalas predefinidas

Toolbar – analyze – set scale



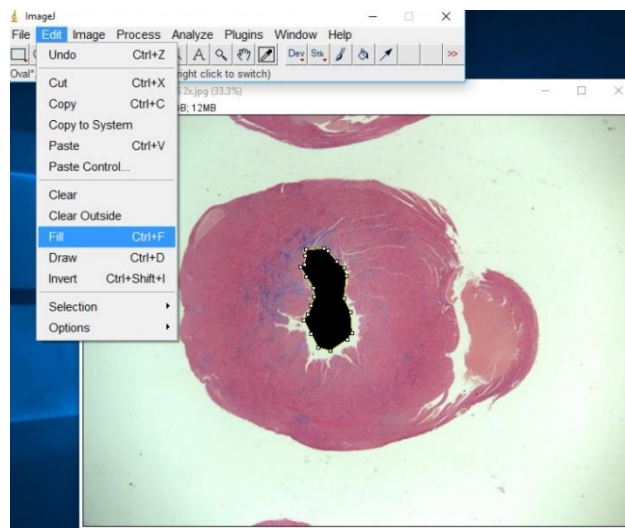
- 2) Para “melhorar” um pouco a qualidade da imagem, especialmente em imagens de lupa pode efectuar-se o *smooth* – sobreposição de pixéis. Isto torna a lesão “mais maciça” ao tornar a imagem menos pixelada

Toolbar – process – smooth

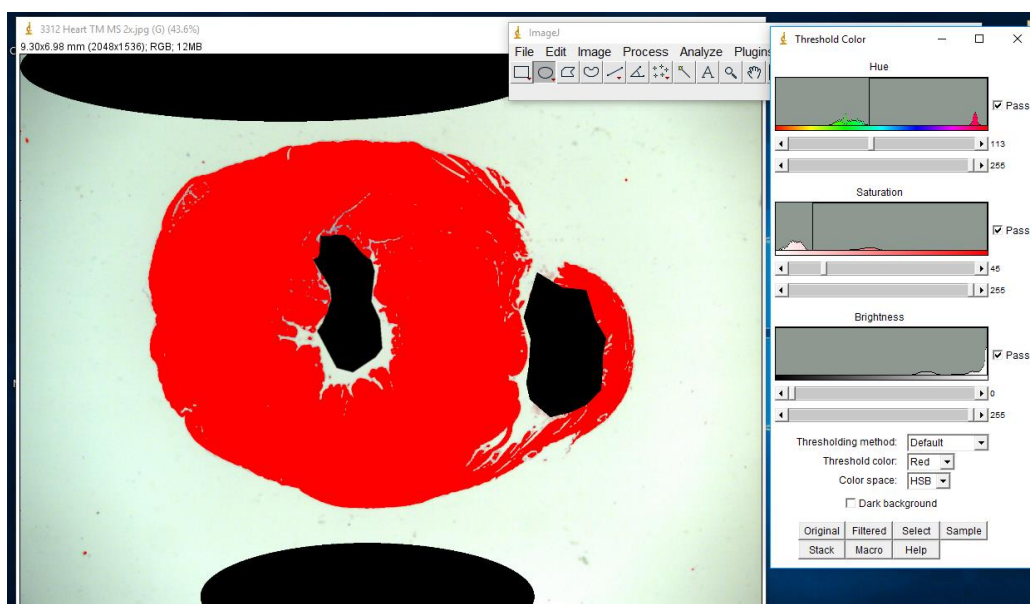


- 3) Para medir a área total do coração, em certos casos tem que se pintar de negro/branco restos de sangue que ficaram dentro dos ventrículos / secções adjacentes que aparecem na foto. Este passo permite que “artefactos” cujos canais de cores sejam parecidos ou iguais aos objectos de interesse sejam ignorados nas medições.

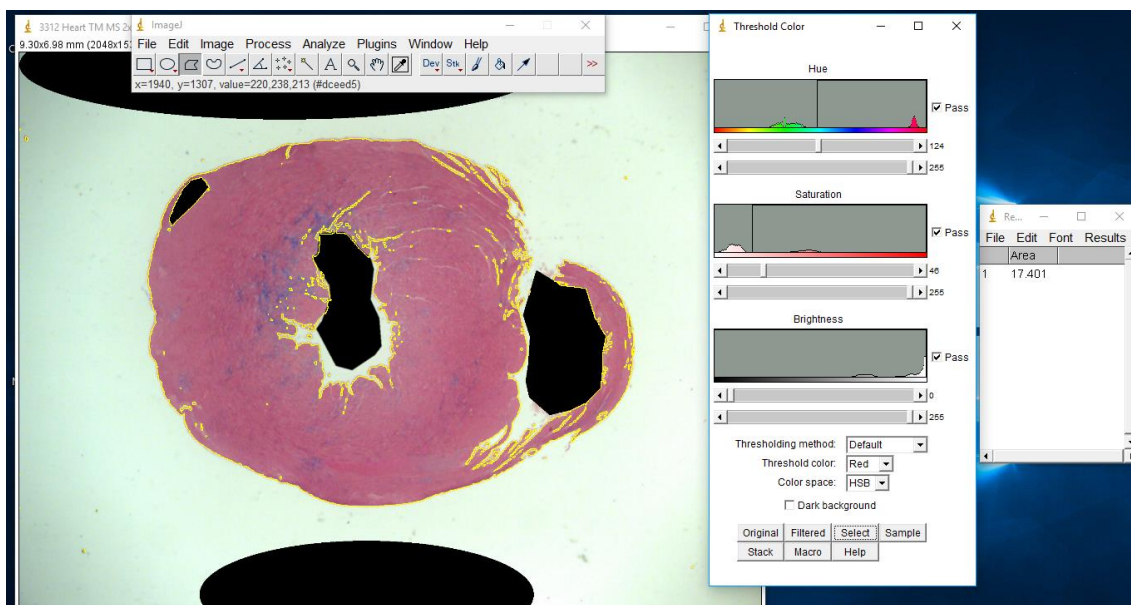
Para pintar as áreas que não interessam – **Toolbar – ferramenta de selecção desejada (sugestão: polígono) – seleccionar o que não interessa – carregar no F / toolbar – edit – fill**



- 4) Após todas as áreas a desprezar estarem pintadas de negro, pode efectuar-se a medição da área do total da secção do coração. Para isso **Toolbar – Image – Adjust Color Threshold**. Para medir a área total, no canal HUE – mexer ligeiramente o intervalo à esquerda (1ª barra de selecção por baixo do histograma de cores) para ele ignorar as partes a preto. Ajustar ligeiramente a 2ª barra de modo a garantir que o intervalo alberga todos os picos de cores de interesse presentes na fotografia. No canal da saturação, manipular a 1ª barra de modo a retirar o pico de saturação branco – isto leva a que o programa ignore o fundo branco. Se após manipulação do canal de saturação nenhuma zona do fundo estiver seleccionada, normalmente o intervalo do canal de brilho pode ser seleccionado por inteiro de modo a permitir um “enchimento” total das áreas seleccionadas.

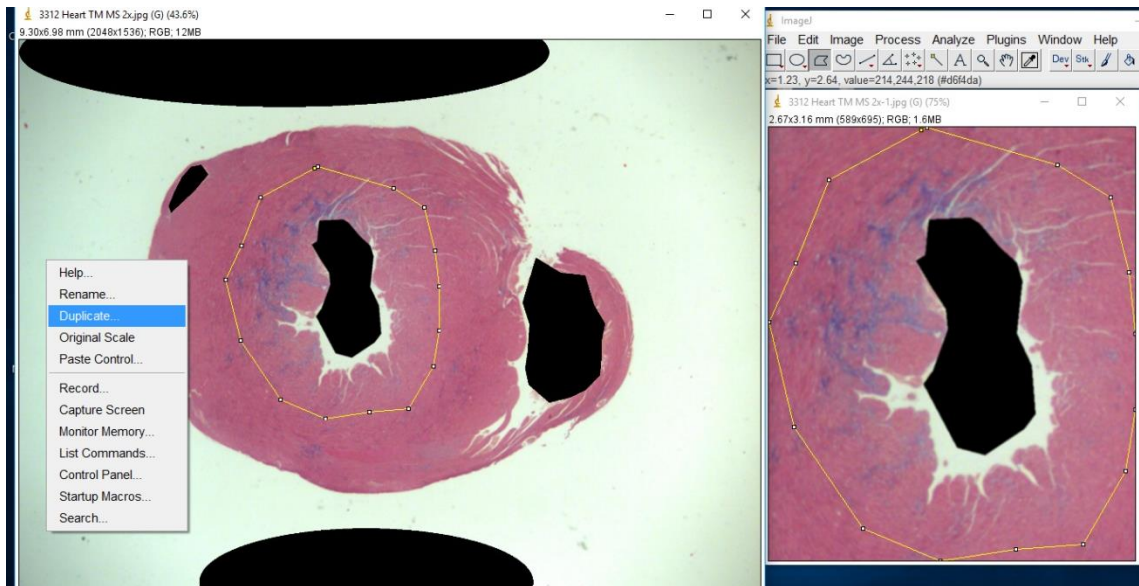


Após ajuste e confirmação de que toda a área está seleccionada, clicar no **botão select + tecla M** para a medição da área total.

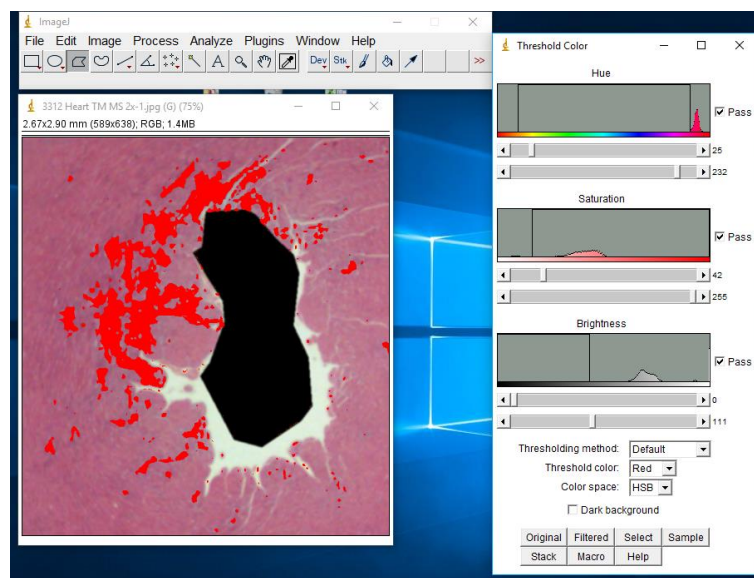


- 5) Finalmente para medir a fibrose, começar por através de uma ferramenta de selecção, seleccionar a zona que só tenha fibrose e efectuar um duplicado dessa mesma zona.

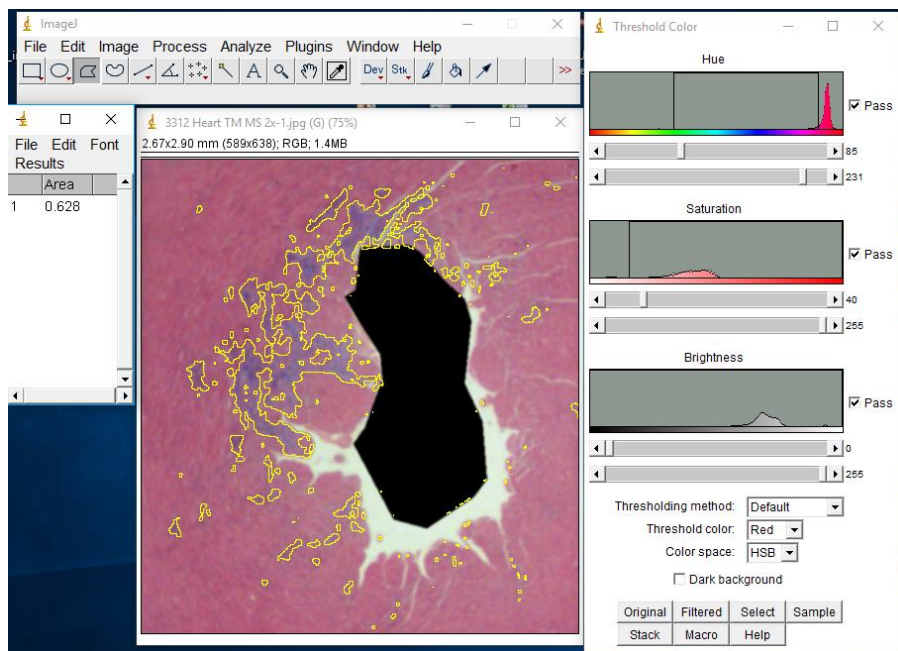
Toolbar – ferramenta de selecção (sugestão: polígono) – seleccionar área de interesse – click direito no rato– duplicate.



- 6) Aplicar ao duplicado o **color threshold**, desta vez **retirando todos os canais de cor para além do azul**. Tentar que o intervalo da direita (2ª toolbar abaixo do canal HUE) esteja o mais próximo do pico de vermelhos. Ajustar de maneira a seleccionar da melhor maneira as áreas de interesse. Os canais de saturação e brilho devem ser ajustados consoante visualização.



Após ajuste e confirmação de que toda a área está selecionada, **click no botão select + tecla M** para a medição da área total



Apêndice II – Macro para medir a área total de secção de coração

```
Macro area total 2.ijm
File Edit Font Examples Macros Debug
run("Smooth");
run("Smooth");
run("Color Threshold...");
// Color Threshold 1.50i
// Autogenerated macro, single images only!
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=146;
max[0]=255;
filter[0]="pass";
min[1]=44;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
min[2]=0;
max[2]=255;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
  selectWindow(""+i);
  setThreshold(min[i], max[i]);
  run("Convert to Mask");
  if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for (i=0;i<3;i++){
  selectWindow(""+i);
  close();
  selectWindow("Result of 0");
  close();
  selectWindow("Result of Result of 0");
  rename(a);
  // Colour Thresholding-----
  run("8-bit");
  setAutoThreshold("Default");
  //run("Threshold...");
  setOption("BlackBackground", false);
  run("Convert to Mask");
  run("Analyze Particles...", " show=Masks display summarize");
```

Apêndice III – Macro para medir a área de fibrose de secção de coração

```
Macro fibrose 2.ijm
File Edit Font Examples Macros Debug
run("Smooth");
run("Smooth");
run("Color Threshold...");

// Color Thresholder 1.50i
// Autogenerated macro, single images only!
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=135;
max[0]=226;
filter[0]="pass";
min[1]=28;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
min[2]=0;
max[2]=203;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0", "1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0", "2");
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);
// Colour Thresholding-----
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", " show=Masks display summarize");
```

Apêndice IV – Protocolo do Tricrómico de Masson utilizado para corar as amostras utilizadas neste trabalho

Kits especiais NovaUltra

Descrição: Este método é usado para a detecção de fibras de colagénio em tecidos como pele, coração, etc. em seções fixadas em formalina, embebidas em parafina e também podem ser usadas para seções congeladas. As fibras de colagénio serão coradas de azul e os núcleos de preto e o fundo é vermelho.

Fixação: formalina a 10% ou solução de Bouin

Seção: seções de parafina em 3-5 µm.

Soluções e Reagentes:

Solução de Bouin:

Ácido Picrico (saturado) ----- 75 ml

Formaldeído (37-40%) ----- 25 ml

Ácido acético glacial ----- 5 ml

Solução de Hematoxilina Ferrica de Weigert:

Solução A Stock:

Hematoxilina ----- 1 g

95% de álcool ----- 100 ml

Solução B:

29% cloreto férrico em água ----- 4 ml

Água destilada ----- 95 ml

Ácido clorídrico, concentrado ---- 1 ml
Solução de Trabalho de Hematoxilina Ferrica de Weigert:

Misture partes iguais das soluções de estoque A e B. Esta solução de trabalho é estável por 3 meses (perde qualidade após 4 meses)

Solução Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin:

Biebrich escarlate, 1% aquoso ----- 90 ml

Fucsina ácida, 1% aquosa ----- 10 ml

Ácido acético, glacial ----- 1 ml

Solução de ácido fosfomolibdico-fosfotungstico:

5% de ácido fosfomolibico ----- 25 ml

5% de ácido fosfotungstico ----- 25 ml

Solução Blue Aniline:

Anilina azul ----- 2,5 g

Ácido acético, glacial ----- 2 ml

Água destilada ----- 100 ml

1% de solução de ácido acético:

Ácido acético, glacial ----- 1 ml

Água destilada ----- 99 ml

Procedimento:

1. Desparafinar e re-hidratar com álcool 100%, álcool 95% e álcool a 70%.
2. Lavar em água destilada.
3. Para o tecido fixado em formalina, re-fixar na solução de Bouin durante 1 hora a 56 ° C para melhorar a qualidade da coloração, embora este passo não seja absolutamente necessário.

4. Enxaguar a água da torneira por 5-10 minutos para remover a cor amarela.
3. Core na solução de trabalho de hematoxilina de Ferro da Weigert por 10 minutos.
4. Enxágue com água quente da torneira durante 10 minutos.
5. Lavar em água destilada.
6. Core na solução de Scarlet-acid fuchsin de Biebrich por 10 a 15 minutos. A solução pode ser guardada para uso futuro.
7. Lavar em água destilada.
8. Diferenciar a solução de ácido fosfomolibdico-fosfotungstico por 10 a 15 minutos ou até que o colágeno não seja vermelho.
9. Transfira as seções diretamente (sem enxaguar) para solução anilina azul e core por 5-10 minutos. Enxaguar brevemente em água destilada e diferenciar em 1% de solução de ácido acético durante 2-5 minutos.
10. Lavar em água destilada.
11. Desidratar muito rapidamente através de álcool etílico a 95%, álcool etílico absoluto (estes passos limparão a coloração de Scarlet-acid fuchsin de Biebrich) e limpar em xileno.
12. Monte com meio de montagem resinoso.

Resultados:

Colágeno ----- azul

Núcleos ----- preto

Músculo, citoplasma, queratina ----- vermelho