



Uma breve introdução à estereologia aplicada à articulação metatarsofalangeana e seus componentes estruturais: estimativa de erros de volume e área superficial

Violeta Bastos de Mattos Areosa¹, Vanda Santana Queiroz Dini², Lucas Castanhola Dias³, Antônio Luiz Boechat⁴, Jarbas Pereira de Paula⁵, Oscar Tadeu Ferreira da Costa⁶

RESUMO

A estereologia é o padrão ouro dos métodos quantitativos, cuja eficácia é justificada por sua rigorosa amostragem sistemática, uniforme e ao acaso em todos os níveis da análise quantitativa. Por possuir um robusto embasamento matemático e estatístico, esta técnica se utiliza de conceitos da teoria geométrica e de probabilidades o que possibilita a obtenção de informações 3-D a partir de seções 2-D, além de permitir sua utilização em diversos ramos da Ciência. O presente estudo apresenta um breve histórico da estereologia e a aplicação de três teoremas que a fundamentaram: princípios de Cavalieri, Delesse e Buffon. Através destas ideias podemos hoje determinar o volume, a densidade de volume e a área superficial, respectivamente, de qualquer estrutura, independentemente de sua forma e com resultados precisos e acurados. Neste estudo apresentamos os cálculos e os dados quantitativos obtidos para a 5ª articulação metatarsofalangeana (MTF) de um rato da linhagem Lewis com o intuito de demonstrar a eficácia da técnica na obtenção de valores detalhados da MTF, além de seu elevado potencial para validar hipóteses nos estudos quantitativos. O volume da articulação foi estimado em 0,86 mm³. O coeficiente de erro foi mantido abaixo de 5%. Do total, 48% são ocupados pela cápsula, 21% pelo osso subcondral, 21% pelo espaço sinovial, 9% por cartilagens e menos de 1% pela sinóvia. As áreas superficiais totais das cartilagens articulares e calcificadas foram estimadas em 12,52 e 8,03 mm², respectivamente. Em conclusão, a estereologia é precisa, acurada e eficiente, sua aplicação na 5ª MTF de um rato Lewis pode contribuir para um melhor entendimento de sua morfofisiologia.

Palavras-chave: Cavalieri, Delesse, Buffon, coeficiente de erro.

A brief introduction to the stereology applied to the metatarsophalangeal joint and its structural components: estimation of volume and surface area errors. Stereology is the gold standard of quantitative methods, the effectiveness of which is justified by their rigorous, systematic, uniform and random sampling at all levels of quantitative analysis. Because it has a robust mathematical and statistical basis, this technique uses concepts of geometric theory and probability, which allows the obtaining of 3-D information from 2-D sections, and allows its use in various branches of science. This study presents a brief history of stereology and the application of three theorems that underlie it: Cavalieri, Delesse and Buffon principles. Through these ideas we can today determine the volume, volume density and surface area, respectively, of any structure, regardless of its shape and with accurate and precise results. In this study, we present the calculations and quantitative data obtained for the 5th metatarsophalangeal joint (MTP) of a Lewis rat in order to demonstrate the efficacy of the technique in

¹ Mestranda em Imunologia Básica e Aplicada, UFAM, Manaus, AM, Brasil, violetareosa@hotmail.com

² Doutoranda em Imunologia Básica e Aplicada, UFAM, Manaus, AM, Brasil, vanda_santana@hotmail.com

³ Técnico Microscopia Eletrônica, Lab. Temático de Microscopia Eletrônica e Óptica, INPA, Manaus, AM, Brasil, lucas.castanhola@inpa.gov.br

⁴ Professor Adjunto Depto Parasitologia, ICB, UFAM, Manaus, AM, Brasil, antonioluiz.boechat@gmail.com

⁵ Professor Assistente Depto Morfologia, ICB, UFAM, Manaus, AM, Brasil, bionerk@yahoo.com.br

⁶ Professor Associado Depto Morfologia, ICB, UFAM, Manaus, AM, Brasil, oscarcostaufam@gmail.com (autor para correspondência)



obtaining detailed MTP values, as well as its high potential to validate hypotheses in quantitative studies. The joint volume was estimated at 0.86 mm^3 . The error coefficient was kept below 5%. Of the total, 48% are occupied by the capsule, 21% by the subchondral bone, 21% by the synovial space, 9% by cartilage and less than 1% by the synovium. Total surface areas of articular and calcified cartilages were estimated at 12.52 and 8.03 mm^2 , respectively. In conclusion, stereology is accurate, precise and efficient; its application in the 5th MTP of a Lewis rat may contribute to a better understanding of its morphophysiology.

Key-words: Cavalieri, Delesse, Buffon, volume, surface, coefficient error.

1. Introdução

O quanto há aqui? Talvez esta seja uma das questões mais básicas em qualquer estudo experimental independente da área de pesquisa. Responder a esta questão não é algo tão trivial como muitos pesquisadores poderiam supor. Diversos vieses (amostragem insatisfatória, fixação e desidratação incompletas, compressão das seções na microtomia, amostragem parcial de campos de vista, etc.) podem ser introduzidos nas seções histológicas tornando a conclusão de um estudo duvidosa ou tendenciosa (DORPH-PETERSEN *et al.*, 2001). Em análises por meio da microscopia de luz (campo claro, polarização, fluorescência, confocal, etc.) ou microscopia eletrônica de transmissão, estes erros sistemáticos podem se amplificar, tornando a análise quantitativa caótica. Vários estudos abordaram as consequências disto sobre a determinação de parâmetros como o volume, a área superficial, o comprimento e o número de células (WEIBEL, 1980; GUNDERSEN, HJ *et al.*, 1988; HOWARD e REED, 2005; MOUTON, 2011). A conclusão é clara: há a necessidade de padronização de métodos que mostrem ao pesquisador a magnitude do viés embutido no estudo e que, ao mesmo tempo, utilizem protocolos para minimizá-los, garantindo assim análises precisas e acuradas, além de permitir a quantificação de estruturas teciduais de interesse. Tal disciplina já existe e, para a surpresa de muitos, é sexagenária! Seu nome é estereologia, derivada do grego “*stereos*”, que é uma referência à análise de objetos em 3-D.

Em 1961, Hans Ellias (anatomista, histologista e matemático judeu alemão refugiado nos Estados Unidos) reuniu em Feldberg, na Floresta Negra (Baden-Württemberg, Alemanha) vários pesquisadores de diversas áreas do conhecimento (de Geociências à Biologia) para discutir e

compartilhar experiências sobre problemas em comum em quantificação na área biológica: (1) como quantificar objetos 3-D a partir de seções 2-D? (2) Por que a perda de uma dimensão poderia interferir tanto nos resultados? (3) Por que não há relação entre o número de células em uma seção e seu número no órgão todo? Um pequeno encontro com profundas repercussões até os dias atuais, cujos questionamentos levaram Hans Ellias a fundar a estereologia (HILDEBRANDT, 2012). No ano seguinte foi estabelecida a Sociedade Internacional para a Estereologia (*International Society for Stereology*, ISS) com encontros periódicos até hoje.

Por apresentar um robusto embasamento matemático e estatístico, utilizando-se de conceitos da teoria geométrica e de probabilidades, a estereologia possibilita a obtenção de informações 3-D a partir de seções 2-D (HOWARD e REED, 2005). Contudo, não se deve limitar a técnica apenas a um conjunto de protocolos, mas elevá-la a um status de ciência das relações geométricas entre a estrutura que existe em três dimensões e as seções dessa estrutura (perfis) que são fundamentalmente bidimensionais.

Sob uma perspectiva histórica, a morfometria (métodos quantitativos utilizando medidas diretas das estruturas e produzindo somente informações bidimensionais sem conhecimento da magnitude do viés introduzido na análise) antecede a estereologia. Esta por sua vez baseia-se na contagem de eventos (pontos, interseções, perfis) quando um sistema teste de contagem (*grid*) é sobreposto de forma aleatória nas imagens do objeto de estudo; quando os olhos do observador treinado detectam o encontro entre o parâmetro (categoria) buscado e o evento específico, procede-se a contagem (HOWARD e REED, 2005). O resultado da análise da imagem, sendo ela direto no

Ciências Biológicas

microscópio ou em um software de análise, resume-se em um somatório de pontos, interseções ou perfis, dependendo se o objetivo é determinar o volume, a área superficial, o comprimento ou o número de estruturas, como exemplificado na Figura 1. O passo seguinte é a transformação dessas contagens em valores absolutos através de equações bem estabelecidas e fixas tendo como referência o volume do órgão (3D).

Parâmetro	Volume	Superfície	Comprimento	Número
Sondas	+	∩		
Eventos contáveis	Ponto	Intercepto	Perfis	Perfis
Dimensão	3D	2D	1D	0D

Figura 1. Os dados estereológicos são obtidos por contagem de eventos quando estes tocam/interceptam ou estão contidos em sondas pertencentes a sistemas de contagem (*grids* sobrepostos ao acaso sobre as seções 2D de objetos 3D). Os parâmetros obtidos dependem da sonda utilizada. O pesquisador decide que parâmetro é importante para responder a sua pergunta ou se quiser pode obter todos os parâmetros a partir das mesmas seções histológicas.

Visto que a análise depende estritamente de seções sistemáticas (de 6 a 12/órgão), uniformes e aleatórias, fica estabelecido que a estereologia lida com amostragens rigorosas e, portanto, fornece estimativas precisas e acuradas (GUNDERSEN e ØSTERBY, 1981; GUNDERSEN e JENSEN, 1987; GUNDERSEN, HJ et al., 1988). Para tal, qualquer categoria dentro da estrutura de interesse (órgão/tecido) deve ter a mesma probabilidade de ser amostrado durante a contagem (WEIBEL et al., 2007). Visto que a distribuição de estruturas como vasos, ductos, tipos celulares, entre outros, pode variar dependendo da região do órgão (ser homogênea ou heterogênea) e que dependendo do plano de corte pode-se favorecer ou dificultar o encontro destes componentes, faz-se o seguinte questionamento: como prever se uma estrutura possui uma distribuição espacial totalmente aleatória (isotrópica) ou segue um padrão previsível (anisotrópica)? Estudos mostram que não é possível este tipo de previsão. A solução é introduzir isotropia nas estruturas

anisotrópicas (com uma orientação preferencial) através de protocolos que as rotacionem aleatoriamente em relação a um eixo preferencial antes da microtomia (GUNDERSEN, HJG et al., 1988; HOWARD e REED, 2005). Dentre os protocolos mais utilizados encontram-se: (1) o *Orientalor* (MATTFELDT et al., 1990), técnica que consiste em rotacionar a estrutura a ser cortada sobre um sistema de ângulos escolhidos ao acaso, produzindo assim seções IUR (*isotropic uniform random sections*); (2) o *Isector* (NYENGAARD e GUNDERSEN, 1992), destinado a estruturas com tamanho reduzido e difíceis de manipular; (3) para estruturas compostas por camadas (estratos) foi proposta a geração de seções verticais, VUR (*vertical uniform random sections*) que consiste em rotacionar a estrutura em torno de seu próprio eixo como um peão (BADDELEY et al., 1986) e (4) o *Proporcionator* (KELLER et al., 2013), tido como a técnica mais eficiente para a geração de seções aleatórias e que vem sendo empregado em vários estudos.

1.1 Determinação do volume

Em um estudo experimental a alteração no volume do órgão é o primeiro parâmetro a ser observado, mesmo a olho nu. Este parâmetro é tão essencial em estereologia que é referido como “volume de referência” (*reference volume*) (MOUTON, 2011), sendo uma das mais importantes regras desta técnica e um alerta ao pesquisador: *nunca deixe de medir o volume de referência!* Pena para tal falha: total incerteza de seus resultados e conclusões equivocadas.

Algumas abordagens muito comuns têm sido utilizadas para aferir o volume. Uma delas é a aplicação do princípio de Arquimedes (287-212 B.C.), também conhecida por deslocamento de fluido, que consiste em mergulhar por inteiro o órgão em um recipiente de volume inicial conhecido e o fluido deslocado equivale ao volume do órgão imerso (Figura 2A). Esta técnica, apesar de ultrapassada, ainda é utilizada nos dias atuais em vários laboratórios de patologia e sua limitação está na imprecisão das medidas, bem como na total ineficácia quando se trata de volumes de grandeza reduzida como os órgãos dos animais experimentais (ratos,

camundongos, coelhos, etc.). Neste caso, a introdução de uma balança analítica, onde o órgão é suspenso e imerso em um recipiente contendo uma solução de densidade conhecida, é mais adequada (Figura 2B). Essa técnica foi proposta por Scherle (1970) e descrita pela seguinte equação: $V = \frac{W}{\rho}$, onde V , volume do órgão; W , peso do órgão imerso e ρ é a densidade do fluido (solução salina isotônica = 1,0048 g/cm³). As limitações desta técnica estão no fato de que estruturas complexas formadas por minúsculas projeções superficiais (e.g. brânquias, mucosa gástrica, sulcos cerebrais, etc.) serão supervalorizadas, pois a solução irá penetrar nas reentrâncias incrementando o volume a cada determinação.

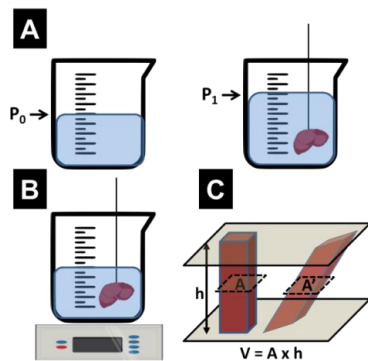


Figura 2. Determinação do volume através de diferentes técnicas. **A.** Princípio de Arquimedes por deslocamento de fluido. O volume do órgão imerso pode ser obtido pela equação $V = P_1 - P_0$ considerando a água ou solução salina como fluido. **B.** Com o uso de uma balança digital o volume pode ser obtido diretamente no visor após imersão total do órgão em solução salina. Ambas técnicas guardam certa incerteza nas medidas devido as reentrâncias nos órgãos que maximizam o volume. **C.** Princípio de Cavalieri aplicado a sólidos geométricos. Os dois sólidos apresentam a mesma altura (h) e a mesma área seccionada ($A=A'$), então a relação $V = A \times h$ é válida. Essa ideia é hoje o cerne da determinação de volume de qualquer objeto independente de sua forma.

Pode parecer surpreendente, mas a solução para a estimativa do volume de qualquer objeto, independentemente de sua forma, já havia sido proposta há mais de 380 anos pelo matemático Francesco Bonaventura Cavalieri (1598–1647), discípulo de Galileu Galilei. Segundo Cavalieri, os volumes de dois objetos da mesma altura são iguais se as áreas

de suas correspondentes seções transversais forem iguais. Na Figura 2C essa ideia original foi demonstrada em dois sólidos que possuem áreas seccionais idênticas ($A=A'$). Visto que as estruturas biológicas não se comportam como sólidos geométricos, o que faz com que a determinação da área seccional seja um fator comprometedor para a análise, a introdução dos sistemas de contagem contendo retas (ROSIWAL, 1898) e, finalmente, pontos (THOMSON, 1930; GLAGOLEV, 1955) foi essencial para a solução deste impasse. Isto porque ao se juntar ao princípio de Cavalieri a utilização de *grids* (sistemas de contagem) ficou evidente que há uma relação direta entre o número de eventos (pontos, etc.) que tocam o espaço de referência (órgão de estudo) e o volume fracional de um objeto. Atualmente a obtenção do volume de qualquer objeto é uma tarefa fácil, rápida e de custo insignificante, visto que o sistema de contagem pode ser impresso ou desenhado em uma transparência com dimensões proporcionais à magnitude das seções obtidas (de um corte transversal de uma tibia de camundongo ao fêmur fossilizado de um saurópode!).

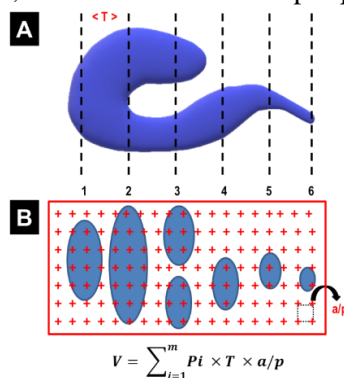
Em uma demonstração prática podemos imaginar um objeto cortado de forma serial sendo a distância entre cada fatia, T , fixa (Figura 3A). A somatória dos pontos que tocam as fatias multiplicada por T e pela área associada a cada ponto (a/p) será uma determinação precisa do volume do objeto (Figura 3B). O princípio de Cavalieri, tido como o precursor do cálculo integral, é considerado o mais preciso e acurado estimador de volume livre de viés, sendo o cerne dos métodos estereológicos (STERIO, 1984).

1.2 Densidade de volume

O volume de um órgão é o resultado do volume de seus componentes. Porém, como estimar o volume de algo dentro de outro volume? Em 1848, um geólogo francês chamado Achille Ernest Oscar Joseph Delesse, demonstrou que a área ocupada por determinado mineral em um paredão rochoso é diretamente proporcional ao volume fracional daquele componente, $A_A = V_V$ (DELESSE, 1848). Com isto, Delesse pôde prever se valeria a pena investir recursos na exploração de determinada jazida. Esse princípio, quando

Ciências Biológicas

aplicado a estruturas biológicas, produz resultados espetaculares quanto à composição dos componentes no interior de uma estrutura. Na prática, com o auxílio de uma lupa, os campos de vista a serem analisados em uma determinada seção histológica são determinados seguindo o critério *SURS* (*systematic uniform random sampling*), um tipo de amostragem sistemática, uniforme e aleatória. Nesta etapa da estereologia não há a necessidade de se fotografar toda a seção, mas há a necessidade de amostrá-la de forma imparcial, sem a interferência do pesquisador.



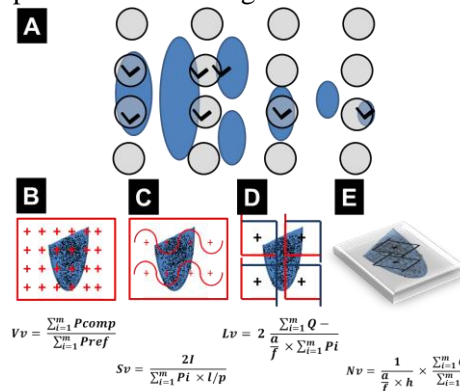
$$V = \sum_{i=1}^m P_i \times T \times a/p$$

Figura 3. Aplicação do princípio de Cavalieri em um objeto sem forma definida. **A.** Um objeto é seccionado de forma serial (6 seções) com distância fixa T entre as seções definida de forma aleatória. **B.** As seções são dispostas sobre uma superfície plana e um sistema teste de contagem (*grid*) é sobreposto totalmente ao acaso sobre as mesmas. Os pontos que tocam as fatias (espaço de referência/objeto) são contados (ΣP), sendo está a única atividade a ser executada sobre as mesmas. Para a aplicação do princípio de Cavalieri, além do ΣP , precisa-se saber a distância entre cada fatia (T), e a relação área do *grid* por número de pontos (a/p). Este último parâmetro é de obtenção simples, bastando à medida direta da área delimitada por quatro cruzeiros no *grid*.

A Figura 4A demonstra uma amostragem feita nas seções de Cavalieri para a obtenção de fragmentos que serão usados para a estimativa dos demais parâmetros estereológicos, inclusive para a estimativa do volume fracional segundo Delesse.

Uma aplicação direta do princípio de Delesse é apresentada a seguir na articulação diartrodial entre o metacarpo e a falange (metacarpofalangeana, MTF) que flexiona e estende o dedo por meio de músculos e tendões. Se dissecarmos cuidadosamente essa região iremos revelar a cápsula articular, estrutura

constituída por tecido conjuntivo fibroso. Internamente, ela é revestida por uma membrana sinovial que, além de limitar o espaço sinovial lateralmente, apresenta tipos celulares especializados conhecidos como sinoviócitos (tipo I e II). Sua função é lubrificar o espaço sinovial por meio da secreção de líquido sinovial contendo ácido hialurônico, glicoproteínas e uma pequena quantidade de leucócitos (principalmente monócitos), o que permite uma melhor movimentação entre as cartilagens articulares do metacarpo e da falange proximal. Por sua vez, os condrócitos presentes na cartilagem articular sintetizam colágeno, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, substâncias responsáveis por fornecer resistência à compressão, principal propriedade das cartilagens hialinas.



$$Vv = \frac{\sum_{i=1}^m P_{comp}}{\sum_{i=1}^m P_{ref}}$$

$$Lv = 2 \frac{\sum_{i=1}^m Q -}{\bar{a} \times \sum_{i=1}^m P_i}$$

$$Sv = \frac{2l}{\sum_{i=1}^m P_i \times l/p}$$

$$Nv = \frac{1}{\bar{a} \times h} \times \frac{\sum_{i=1}^m Q -}{\sum_{i=1}^m P_i}$$

Figura 4. Demonstração de uma amostragem de fragmentos para a estimativa de parâmetros estereológicos. **A.** As mesmas fatias ou seções usadas para o Cavalieri são sobrepostas com um *grid* contendo regiões circulares vazadas para permitir a amostragem de fragmentos (7 fragmentos são indicados) que serão processados histologicamente e analisados para a estimativa do **(B)** volume de seus componentes (Vv), **(C)**, área superficial (Sv), **(D)**, comprimento (Lv) e **(E)**, número de células (Nv). Portanto, um único conjunto de imagens (que pode variar de 30-50/órgão) será utilizado para a obtenção de todos os parâmetros. Vale salientar que para cada parâmetro há uma equação específica.

Em condições patológicas qualquer um dos componentes citados acima pode apresentar alterações, por exemplo, a hiperplasia de um tipo celular, perda de tecido ou até mesmo infiltração de células imunes no espaço sinovial (RALPHS e BENJAMIN, 1994). Pelo princípio de Delesse é possível estimar a porcentagem de cada componente ao microscópio (daí o termo densidade de volume ou volume fracional),



Ciências Biológicas

tanto em seu estado normal quanto patológico, e transformá-lo em valor absoluto ao ser multiplicado pelo volume do órgão (Cavalieri ou equivalente). Assim, os componentes serão reportados em relação ao volume do órgão (3-D) e não mais em relação à área do campo de vista microscópico (2-D), forma pela qual a morfometria convencional reporta. Vale salientar que nesta etapa utilizam-se aumentos que podem variar de 200 a 400, enquanto aumentos mais baixos são usados na estimativa de volume segundo Cavalieri (10 ou 40).

1.3 Área superficial

Em vários estudos é importante entender qual a capacidade de uma estrutura em trocar gases ou nutrientes através de uma superfície. Medir essa superfície não é algo tão intuitivo como o volume. O pesquisador pode achar que o perímetro de uma superfície seja equivalente à sua área superficial, mas não é! Neste caso, a orientação do órgão em relação à navalha do micrótomo faz toda a diferença, então a solução é inserir isotropia na estrutura, como já explicado anteriormente, e sobrepor as seções com sistema teste de contagem contendo retas ou curvas (Figura 4C). A interceptação das sondas com a borda da estrutura de interesse, por exemplo, a cartilagem articular, irá fornecer uma estimativa da área. Esta ideia só foi possível graças ao matemático George Leclerc, também conhecido como Conde de Buffon, que há 240 anos apresentou a solução para “o problema das agulhas” à Academia Real de Ciências da França. Este foi um fato fundamental para a criação da teoria estatística, não somente para a estimativa da área superficial, mas também para o comprimento de objetos de forma precisa e acurada. Brevemente, se agulhas forem dispostas ao acaso sobre uma superfície plana contendo linhas paralelas separadas por distâncias fixas (como as pautas de um caderno), como seria possível estimar o comprimento de todas as agulhas ali dispostas sem ter que medi-las uma a uma? Buffon encontrou que a resposta está na forte relação entre a interseção das linhas com as agulhas (BUFFON, 1777).

Mais uma vez, uma aplicação desse princípio pode ser observada na MTF. A sinóvia (membrana sinovial) é uma região da articulação particularmente sensível à

inflamação, portanto, sua análise é obrigatória quando se investiga artrite experimental. Para quantificar a área superficial o pesquisador deverá sobrepor a região com um *grid* contendo pontos e curvas (imagine as curvas uma derivação matemática das linhas de Buffon). Cada vez que um ponto tocar a sinóvia ele será contado, o mesmo irá ocorrer cada vez que uma curva a interceptar. Os dados obtidos são aplicados em equações padrões (sem fator de correção) e o resultado é uma estimativa da área (valor relativo) (Figura 4C). O valor absoluto de qualquer parâmetro será obtido após a multiplicação de seu valor relativo/fracional (V_v , S_v , L_v ou N_v) pelo volume de Cavalieri ou equivalente. No presente exemplo, $S_{\text{sinóvia}} \times \text{Volume da articulação} = \text{Área superficial total}_{\text{sinóvia}}$.

O objetivo do presente estudo é apresentar a aplicação prática da estereologia e suas equações para a determinação do volume e da área superficial de componentes da articulação sinovial. Este artigo não se propõe em abordar profundamente os aspectos geométricos das equações apresentadas, em vez disso nos propomos a apresentar soluções práticas para o processamento da estrutura, orientação ao acaso, microtomia, contagem e obtenção dos valores absolutos para cada parâmetro investigado. Lembrando que este aspecto é de extrema importância visto que a estereologia reporta os resultados em relação ao volume (3-D) do órgão.

2. Material e Métodos

2.1 Processamento histológico e estereologia

A 5ª MTF da pata posterior (fixador = GTA 2,5%) de um rato Lewis macho, idade de 8 semanas (CEUA/UFAM 018/2010), foi removida, descalcificada, desidratada e infiltrada em resina plástica de hidroxietilmetacrilato (Technovit 7100, Kúlzer-Heraeus, Alemanha). O bloco cilíndrico contendo o material foi então rotacionado para a produção de seções verticais (BADDELEY et al., 1986). Brevemente, o bloco foi posicionado verticalmente em relação a um relógio graduado com ângulos e um número foi sorteado ao acaso para a rotação do mesmo em relação ao plano de corte, gerando assim seções isotrópicas. Uma marcação foi feita no bloco para indicar a direção vertical (Figura 5A). O bloco foi então

cortado com o auxílio de um micrótomo (Leica RM2125RT, Alemanha) gerando 10 seções histológicas (5 μm) que foram coradas com fucsina e azul de toluidina. As seções foram fotografadas em sua totalidade (aumento 8) com o uso de um estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha) e sobre as imagens foi projetado um sistema teste de contagem contendo cruzes geradas pelo programa Imod (versão 4.7/sterology) (KREMER et al., 1996). Cada vez que o ponto central das cruzes tocava a área de referência (articulação MTF, incluindo

a região periarticular) uma unidade era contada (Figura 5B). A área da articulação avaliada neste estudo compreendeu os limites do osso subcondral, tanto da falange como do metatarso (Figura 5C). O volume da MTF foi calculado como:

$$V_{MTF} (mm^3) = \sum_{i=1}^m P_i \times T \times \frac{a}{p}, \text{ onde,}$$

V_{MTF} é o volume absoluto (Cavalieri) da articulação; a/p é área ocupada por cada ponto central (11.867,38 μm^2) e T (25 μm) é a distância entre cada seção.

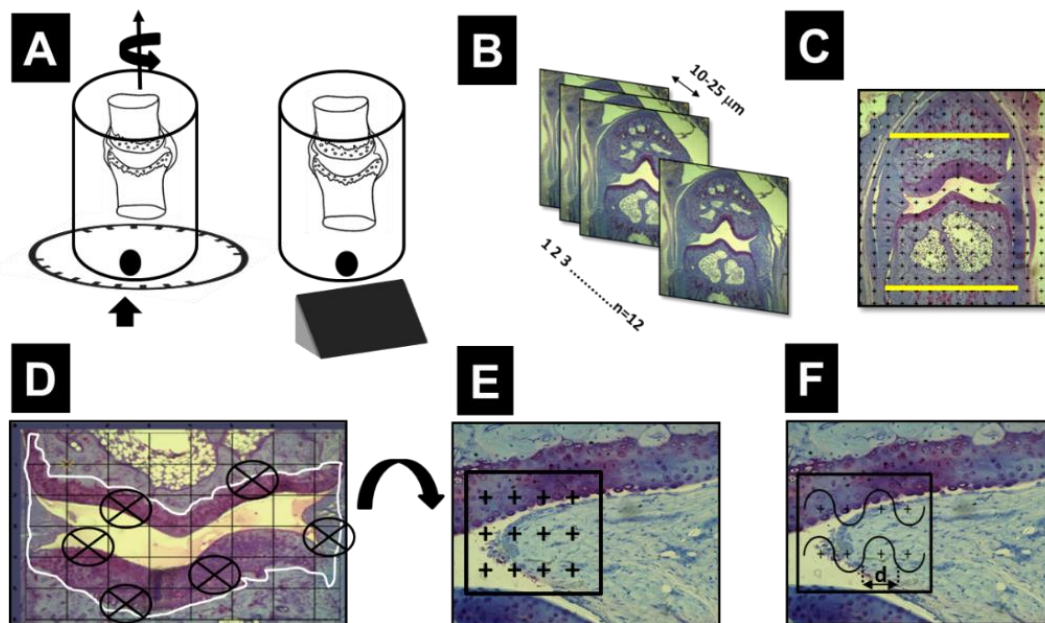


Figura 5. Aplicação da estereologia em uma articulação diarthrodial. **A.** Geração de seções verticais a partir do bloco de resina. A seta indica um ângulo sorteado ao acaso e a marcação indica a posição do bloco no micrótomo em relação à navalha. A partir deste ponto foram geradas 12 seções seriais ao longo da articulação com espaçamento fixo(T). **B.** Sequência de imagens na ordem em que foram obtidas evidenciando os componentes da articulação (aumento de 8 na lupa). **C.** Sobre cada imagem foi sobreposto um *grid* de pontos para de terminação do volume de Cavalieri e para amostragem de campos a serem vistos e analisados em aumento médio (400). **D.** As imagens obtidas (6 por articulação) em aumento médio foram sobrepostas com dois tipos de *grids* em momentos diferentes: **(E)** pontos (Delesse) para a quantificação de componentes em detalhes e **(F)** curvas (Buffon) para a área superficial da membrana sinovial e cartilagem. Para o cálculo da área superficial é necessário obter o diâmetro (d) da curva (d=115,48 μm) e dividi-lo pelo número de pontos associados para obter l/p (=57,74 μm). SM, osso sesamoide; MT, metatarso; FP, falange proximal.

A porcentagem de cada componente dentro da articulação MTF foi obtida pelo princípio de Delesse (DELESSE, 1866). Para tal, campos de vista microscópicos no interior da MTF foram amostrados de forma sistemática, uniforme e aleatória (aumento 200) (Figura 5D). A porcentagem de volume ocupado por cada componente em relação ao espaço de referência (articulação) foi calculado

como: $V_v = \frac{\sum_{i=1}^m P_{comp}}{\sum_{i=1}^m P_{ref}}$, onde V_v é a densidade de volume de determinado componente (cápsula, espaço sinovial, cartilagem articular e calcificada, sinóvia e osso subcondral) e P_{ref} é a somatória de pontos que tocam o espaço de referência (região articular) (HOWARD e REED, 2010). Os dados percentuais obtidos para cada componente foram transformados em



Ciências Biológicas

absolutos ao serem multiplicados pelo volume de Cavalieri da articulação:

$$\text{Volume absoluto (mm}^3\text{)} = Vv \times \text{Volume Cavalieri}$$

A densidade de superfície (S_v) foi estimada a partir da contagem das interseções que interceptavam as cartilagens articulares e calcificadas. O resultado obtido desta primeira contagem também é conhecido como relação superfície-volume (S_v): $S_v \text{ (mm}^{-1}\text{)} = \frac{2I}{\sum_{i=1}^m P_i \times l/p}$, onde I é o número de interseções entre as curvas teste e a borda das respectivas cartilagens, P_i é a somatória de pontos que tocam as cartilagens e l/p é o comprimento da curva teste por ponto (23,35 μm , equivalente ao raio da curva no *grid*). A área superficial total foi obtida através da equação:

$$\text{Área superficial (mm}^{-1}\text{)} = S_v \times \text{Volume Cavalieri}$$

2.2 Estatística

A variância foi expressa como o coeficiente de erro (CE) para cada parâmetro avaliado (V , Vv e S_v). A precisão da estimativa do volume de Cavalieri foi determinada de acordo com (Cruz-Orive, 1999):

$$CE = \left[0,0724 \times \frac{B}{\sqrt{A}} \times \frac{\sqrt{n}}{(\sum_{i=1}^m P_i)^{\frac{3}{2}}} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Onde: CE indica o coeficiente de erro para

a determinação do volume; $\frac{B}{\sqrt{A}}$ indica a variância na contagem sobre as seções (*shape coefficient*) e depende da complexidade morfológica da estrutura; n representa o número de seções avaliadas e $\sum_{i=1}^m P_i$ é o número de pontos contados sobre as seções.

O CE da relação superfície-volume (S_v) e da densidade de volume (Vv) foram estimados de acordo com Cruz-Orive (1980) usando a equação:

$$CE = \left[\frac{k}{k-1} \left\{ \frac{\sum u^2}{\sum u \sum u} + \frac{\sum v^2}{\sum v \sum v} - 2 \frac{\sum uv}{\sum u \sum v} \right\} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Onde: CE indica o coeficiente de erro; k representa o número de imagens analisadas e u e v são as contagens de interseções e pontos (área superficial) ou pontos sobre os componentes (u) e pontos sobre o espaço de referência (v).

3. Resultados

A Tabela 1 apresenta os cálculos para a obtenção dos parâmetros estereológicos deste estudo. O volume de Cavalieri da MTF foi estimado em 0,858 mm^3 ($8,58 \times 10^8 \mu\text{m}^3$). Para tal, 2892 pontos foram contados sobre a MTF utilizando-se 10 seções histológicas. A imprecisão na contagem dos pontos que tocavam a MTF foi de 2,75%, enquanto somente 0,6% de erro foi cometido durante o seccionamento da estrutura durante a microtomia.

A Figura 6A apresenta o efeito causado pelo número de seções (esforço) sobre a estimativa do volume e seus respectivos erros (coeficiente de erro). Após dez seções há a estabilização do volume (início de um platô) e o CE permanece abaixo do que é estatisticamente aceitável (5%).

A Tabela 2 apresenta os cálculos para a estimativa dos componentes da MTF (Delesse). Essa estimativa é feita em maior aumento e em campos de vista *SURS*. O volume absoluto é apresentado em mm^3 e equivale a porcentagem representada por cada componente da MTF em relação ao volume de Cavalieri. Com exceção da sinóvia, que apresentou CE acima de 10%, os demais componentes apresentaram valores dentro do esperado em função do somatório de pontos obtidos (acima de 200). Nesta etapa foram contados 4330 pontos que após analisados produziram os seguintes resultados: a cápsula é o componente mais abundante da MTF, seguida pelo espaço sinovial, cartilagem articular, cartilagem calcificada e sinóvia (Figura 6B). O mesmo padrão quantitativo é observado quando o Vv é transformado em absoluto (Tabela 1).

A Tabela 3 apresenta a estimativa da área superficial das cartilagens articular e calcificada. Um total de 769 pontos foi contado nas cartilagens, sendo 279 na articular e 490 na calcificada. Na mesma contagem foram contabilizadas 131 interseções na cartilagem articular e 84 na calcificada. A cartilagem



Ciências Biológicas

articular apresentou maior relação superfície-volume ($S_v = 5,90 \text{ mm}^{-1}$) quando comparado à calcificada ($S_v = 3,78 \text{ mm}^{-1}$). As áreas superficiais totais das cartilagens articulares e calcificadas foram estimadas em 5,06 e 3,25 mm^2 , respectivamente.

4. Discussão

As MTF são articulações diartrodiais (sinoviais) caracterizadas por uma separação completa entre as extremidades articulares e a presença de um espaço sinovial. Devido ao design das superfícies que se articulam (côncavo-convexo), as MTF são

subclassificadas como condiloides (PEARLE et al., 2005; MCINNES e SCHETT, 2011; FIRESTEIN et al., 2012). A aplicação da estereologia no estudo das articulações tem contribuído para o maior conhecimento das alterações morfológicas provocadas pela osteoartrose (BONDE et al., 2005; KLOSE-JENSEN et al., 2015; HARTLEV et al., 2018) e artrite reumatoide (ARTACHO-PÉRULA et al., 1994; SAVNIK et al., 2002; BARCK et al., 2004; KELLER et al., 2010; WANG et al., 2011; KELLER et al., 2012; KELLER et al., 2013; KELLER et al., 2014).

Tabela 1. Cálculo para a estimativa do volume de Cavalieri e do coeficiente de erro (CE) associado.

Número da seção	Pi	Pi.Pi	Pi.Pi+1	Pi.Pi+2
1	424	179776	195040	125504
2	460	211600	136160	133860
3	296	87616	86136	91168
4	291	84681	89628	75660
5	308	94864	80080	80080
6	260	67600	67600	66040
7	260	67600	66040	62400
8	254	64516	60960	25146
9	240	57600	23760	0
10	99	9801	0	0
	ΣPi	A	B	C
	2892	925654	805404	659858
	(a/p) μm^2	T (μm)	"Shape"	n
	11867,38	25	6	10
Volume (μm^3)	8,58 x 10 ⁸			
Volume (mm^3)	0,86			

Cálculo do CE do volume

$$CE = \left[0,0724 \times \frac{B}{\sqrt{A}} \times \frac{\sqrt{n}}{(\sum_{i=1}^n Pi)^{\frac{3}{2}}} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Origem:	%	CE	%
Contagem de pontos	7,58 x 10 ⁻⁴	95,45	2,75
Microtomia	3,61 x 10 ⁻⁵	4,55	0,60
Total	7,94 x 10 ⁻⁴	0,03	2,82

Dez seções foram usadas para a obtenção do volume. Pi, número de pontos que tocavam a estrutura de interesse; T, distância entre as seções; a/p, área por ponto no grid; A, B e C são fatores de cálculo do erro, "Shape" é o fator de complexidade da estrutura.

O presente estudo aplicou um protocolo estereológico na 5ª MTF de ratos Lewis e concluiu que as medidas de uma pequena articulação podem contribuir para um melhor

entendimento de sua morfofisiologia. O volume da 5ª MTF foi estimado em 0,86 mm^3 , sendo que 48% deste são ocupados pela cápsula, 21% pelo osso subcondral, 21% pelo espaço sinovial,

9% por cartilagens e menos de 1% pela sinóvia. Esses resultados demonstram claramente a importância de se identificar em detalhes uma articulação que, embora esteja entre os primeiros sítios a serem alterados nas inflamações das articulações, tem sido pouco investigada. Pastoureau et al. (2010b), sugerem certos parâmetros histomorfométricos aplicáveis a estudos de osteoartrite induzida em vários modelos animais, contudo somente grandes articulações como as tibiotarsal, tibiofemoral e temporomandibular são discutidas. Não há evidências na literatura quanto à determinação do volume da 5ª MTF

em ratos que possamos usar comparativamente. Um possível motivo para tal seja a imprecisão quanto aos limites da cápsula numa articulação tão pequena, o que contribui para a falta de dados desta estrutura. A região capsular se estende além dos limites do espaço sinovial, áreas não investigadas no presente estudo. Se considerarmos o volume da pata de um rato adulto Lewis sendo ~ 1 mL (10^3 mm^3), a 5ª MTF representaria 0,08% do total. Pouco representativa, mas o local de início de processos inflamatórios que podem ter efeitos sistêmicos.

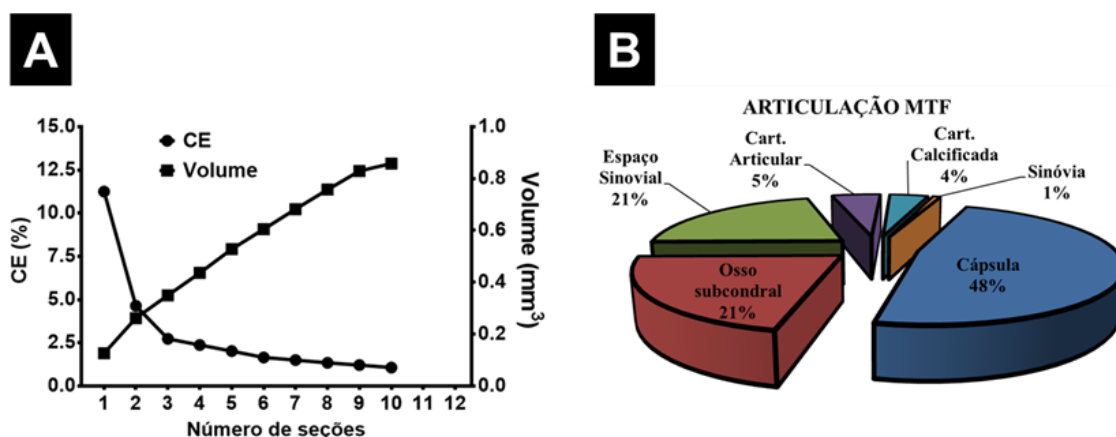


Figura 6. A. Relação entre o coeficiente de erro (CE), volume de Cavalieri e o número de seções obtidas. **B.** Distribuição dos componentes estruturais na MTF obtida através da contagem de pontos em campos de vista selecionados ao acaso.

Tabela 2. Cálculo para a estimativa da porcentagem dos componentes da MTF.

Estrutura	Número de imagens (k)	ΣP_{comp}	ΣP_{pref}	Vv	Vv (%)	Volume (mm ³)	CE (%)
Cápsula	21	2637	5499	0,48	47,95	0,41	2,03
Osso subcondral	21	1169	5499	0,21	21,26	0,18	2,45
Espaço Sinovial	21	1159	5499	0,21	21,08	0,18	8,19
Cart. Articular	21	274	5499	0,05	4,98	0,04	7,25
Cart. Calcificada	21	218	5499	0,04	3,96	0,03	6,74
Sinóvia	21	42	5499	0,01	0,76	0,01	12,75
5499							

Cálculo do CE da densidade de volume

$$CE = \left[\frac{k}{k-1} \left\{ \frac{\Sigma u^2}{\Sigma u \Sigma u} + \frac{\Sigma v^2}{\Sigma v \Sigma v} - 2 \frac{\Sigma uv}{\Sigma u \Sigma v} \right\} \right]^{\frac{1}{2}}$$



Tabela 3. Cálculo para a estimativa da área superficial das cartilagens na MTF.

Superfícies	I	Pi	l/p (mm)	l/p xΣPi (mm)	Sv CA (mm ⁻¹)	Sv CC (mm ⁻¹)	S CA (mm ²)	S CC (mm ²)
CA	131	279	0,06	44,40	5,90	3,78	5,06	3,25
CC	84	490						
ΣPi		769						

I, interseções entre as linhas do *grid* e a borda da superfície da cartilagem articular (CA) ou calcificada (CC). Sv, densidade de superfície; S, área superficial total.

A obtenção de seções seriais e a aplicação do princípio de Cavalieri para a determinação do volume é o procedimento de rotina em estereologia (GUNDERSEN, HJ et al., 1988). A utilização de softwares para a segmentação e quantificação de áreas de interesse (ROIs, *Region of interest*) e posterior determinação do volume, embora com excessivo consumo de tempo, tem sido empregada em vários estudos (COHEN et al., 1999; HODGSON et al., 2008). Apesar disso, a utilização de equações matemáticas e análises estatísticas bem fundamentadas aliadas a uma rigorosa amostragem, permite a obtenção de dados quantitativos precisos e acurados, com o mínimo de viés possível. Outro fator favorável para a utilização da estereologia é o seu baixo custo financeiro, visto que o pesquisador necessita de um laboratório com a rotina histológica (comum em muitos Institutos de Ensino Superior), um fotomicroscópio, os softwares com os sistemas de contagem (*grids*) e as planilhas do Excel® para a tradução das contagens em parâmetros geométricos (volume, área, comprimento e número). Vale ressaltar que valiosas informações quantitativas também podem ser obtidas no nível macroscópico, necessitando apenas da sobreposição dos *grids* às fatias do órgão a ser trabalhado, sempre lembrando que a obtenção do volume é a primeira e imprescindível etapa em qualquer estudo estereológico.

O próximo passo é a subamostragem nas seções seriais, principal característica da segunda etapa da análise estereológica (princípio de Delesse). Embora exija mais esforço do pesquisador (grande número de imagens a serem analisadas, algo entre 30-50 imagens), é nessa etapa que os componentes de um órgão/estrutura podem ser observados em detalhes, revelando assim a contribuição de cada um na estrutura estudada. Essa informação

é essencial quando da avaliação do efeito (benéfico ou tóxico) de substâncias em um grupo controle e um experimental.

No presente estudo o volume da cartilagem (articular + calcificada) foi de 0,07 mm³ com uma área superficial de 8,31 mm². A cartilagem articular é um tecido altamente especializado cuja principal função é fornecer uma superfície lisa e lubrificada para a articulação e facilitar a transmissão de cargas com baixo coeficiente de atrito (FIRESTEIN et al., 2012). Já a cartilagem calcificada apresenta uma importante interface com o osso subcondral, atua na regulação da transmissão de força entre essas regiões e limita a difusão do osso para as camadas mais profundas da cartilagem (HUNZIKER, 2007). As alterações estruturais nas cartilagens precedem as deformidades ósseas nos processos inflamatórios nas MTFs (COHEN et al., 1999; PAP et al., 2000).

As cartilagens articulares são separadas pelo espaço sinovial, cujo volume foi estimado, no presente estudo, em 0,18 mm³. Num estudo não-estereológico utilizando imagens de ressonância magnética, Beckmann et al. (1998) determinaram o volume do espaço sinovial na 3º MTF de ratos DA (151 g) em ~ 0,9 mm³ e ~ 0,2 mm³ para o espaço entre a falange proximal e média, respectivamente. Em patologias como a artrite reumatoide, o espaço sinovial é reduzido e caracterizado pela infiltração de células inflamatórias (PEARSON, 1963; RALPHS e BENJAMIN, 1994; LANDEWÉ et al., 2015). Esse espaço é preenchido com fluido sinovial, produzido pelos sinoviócitos da sinóvia cuja função é a de lubrificar e evitar o contato direto entre as duas superfícies articulares. Em nosso estudo, o volume da sinóvia foi de 0,007 mm³. A sinóvia nutre e permite a oxigenação dos condrócitos, células altamente ativas que residem em um ambiente avascular (LEVICK et al., 1996).



Ciências Biológicas

Independente da articulação a ser avaliada, recomenda-se proceder à geração de seções verticais, visto tratar-se de uma estrutura em camadas (BADDELEY et al., 1986). Para tal, sugerimos dispor o membro ou dígito em posição perpendicular em relação ao plano horizontal da mesa de trabalho. Em seguida, com o uso de um transferidor de graus deve-se sortear um ângulo ao acaso que irá representar a direção em que a navalha do micrótomo cortará as seções (Figura 5A), denominadas agora de seções verticais (BADDELEY et al., 1986). Diferente de outros órgãos, onde o início e o fim podem ser facilmente visualizados, os componentes articulares estão escondidos no interior de uma cápsula, da qual precisamos obter 10-12 seções equidistantes abrangendo o início do aparecimento do espaço sinovial (o ponto de referência/estrutura estudada) até seu desaparecimento. Para as MTFs murinas, recomendamos o corte exaustivo do bloco de resina a intervalos de 25 μ m e a indicação do número de ordem de cada seção (sec 1, sec 2, sec 3... etc.). Ao final, o pesquisador irá perceber que várias seções iniciais e finais serão desprezadas por não apresentar o espaço sinovial. Será sobre as seções válidas (com o espaço sinovial visível) que toda a análise estereológica deverá ser realizada.

Por último, recomenda-se atenção na contagem dos pontos que deve ser específica para cada componente. Neste momento a principal regra é: somente se conta o que se reconhece! Sendo assim, é de extrema importância um mergulho profundo na histologia da estrutura investigada. Esses aspectos da imprecisão na estereologia devido ao reconhecimento e a microtomia são bem discutidos (GUNDERSEN, 1986; GUNDERSEN e JENSEN, 1987; CRUZ-ORIVE, 1999). Em nosso estudo, o $CE_{Cavalieri}$ foi de 2,75% e 2,82% devido a imprecisão na contagem de pontos e a microtomia, respectivamente. Lembrando que na estereologia o CE é sensível tanto ao número de seções utilizadas (6-12) quanto à quantidade de pontos contados (100-200).

5. Conclusão

A aplicação da estereologia fornece informações quantitativas detalhadas dos

microcomponentes da articulação MTF que podem ser utilizadas para um maior entendimento da anatomia e da fisiologia dessas estruturas flexoras complexas. Ao traduzir as informações qualitativas das seções histológicas em valores em função do volume da articulação foi possível trazer a tona o cenário mais realístico da quantificação em pequenas estruturas. Recomendamos que os estudos quantitativos, independente da estrutura a ser avaliada, utilizem a estereologia como ferramenta padrão de análise.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada pelo apoio institucional aos autores; A CAPES e FAPEAM pelas bolsas de pós-graduação concedidas a VBMA e a VSQD, respectivamente. À assistência técnica da Sra. Eriene Santos do Carmo no processamento histológico

Divulgação

Este artigo é inédito. Os autores não relataram qualquer conflito de interesse durante a revisão. Logo, a revista Scientia Amazonia detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

6. Referências

- ARTACHO-PÉRULA, E. et al. Stereological analysis of the synovial membrane in rheumatic disorders: diagnostic value of volume-weighted mean nuclear volume estimation. **Histopathology**, v. 25, n. 4, p. 357-363, 1994. ISSN 1365-2559.
- BADDELEY, A.; GUNDERSEN, H.-J. G.; CRUZ-ORIVE, L. M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of microscopy**, v. 142, n. 3, p. 259-276, 1986. ISSN 1365-2818.
- BARCK, K. H. et al. Quantification of cortical bone loss and repair for therapeutic evaluation in collagen-induced arthritis, by micro-computed tomography and automated image analysis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 10, p. 3377-3386, 2004. ISSN 1529-0131.



Ciências Biológicas

- BECKMANN, N. et al. Effects of Sandimmune neoral on collagen-induced arthritis in DA rats: characterization by high resolution three-dimensional magnetic resonance imaging and by histology. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 131, n. 1, p. 8-16, 1998. ISSN 1090-7807.
- BONDE, H.; TALMAN, M.; KOFOED, H. The area of the tidemark in osteoarthritis—a three-dimensional stereological study in 21 patients. **Apmis**, v. 113, n. 5, p. 349-352, 2005. ISSN 1600-0463.
- BUFFON, G. L. L., COMTE DE **Essai d'arithmétique morale. In Supplément à l'Historie Naturelle**. 1777. 103 p.
- COHEN, Z. A. et al. Knee cartilage topography, thickness, and contact areas from MRI: in-vitro calibration and in-vivo measurements. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 7, n. 1, p. 95-109, 1999. ISSN 1063-4584.
- CRUZ-ORIVE, L. M. On the estimation of particle number. **Journal of microscopy**, v. 120, n. 1, p. 15-27, 1980. ISSN 1365-2818.
- _____. Precision of Cavalieri sections and slices with local errors. **Journal of microscopy**, v. 193, n. 3, p. 182-198, 1999. ISSN 1365-2818.
- DELESSE, A. E. O. J. Procède mécanique pour déterminer la composition des roches. **Ann Min**, v. 13, p. 379-388, 1848 1848.
- DORPH-PETERSEN, K. A.; NYENGAARD, J.; GUNDERSEN, H. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. **Journal of microscopy**, v. 204, n. 3, p. 232-246, 2001. ISSN 0022-2720.
- FIRESTEIN, G. S. et al. **Kelley's Textbook of Rheumatology: Expert Consult Premium Edition: Enhanced Online Features**. Elsevier Health Sciences, 2012. ISBN 1455737674.
- GLAGOLEV, A. A. **On geometrical methods of quantitative mineralogical analysis of Rocks**. Atomic Energy Research Establishment, 1955.
- GUNDERSEN, H.-J. G. Stereology of arbitrary particles. **Journal of microscopy**, v. 143, n. 1, p. 3-45, 1986. ISSN 1365-2818.
- GUNDERSEN, H. et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 96, n. 5, p. 379-394, 1988. ISSN 0903-4641.
- GUNDERSEN, H. et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Apmis**, v. 96, n. 1-6, p. 379-394, 1988. ISSN 1600-0463.
- GUNDERSEN, H.; JENSEN, E. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction*. **Journal of microscopy**, v. 147, n. 3, p. 229-263, 1987. ISSN 1365-2818.
- GUNDERSEN, H.; ØSTERBY, R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'Do more less well!'. **Journal of microscopy**, v. 121, n. 1, p. 65-73, 1981. ISSN 1365-2818.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.; RYAN, P. Paleontological statistics software: package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, n. 4, 2001. ISSN 1935-3952.
- HARTLEV, L. B. et al. Thickness of the bone-cartilage unit in relation to osteoarthritis severity in the human hip joint. **RMD open**, v. 4, n. 2, p. e000747, 2018. ISSN 2056-5933.
- HILDEBRANDT, S. The anatomist Hans Elias: A Jewish German in exile. **Clinical Anatomy**, v. 25, n. 3, p. 284-294, 2012. ISSN 0897-3806.
- HODGSON, R.; O'CONNOR, P.; MOOTS, R. MRI of rheumatoid arthritis—image quantitation for the assessment of disease activity, progression and response to therapy. **Rheumatology**, v. 47, n. 1, p. 13-21, 2008. ISSN 1462-0324.
- HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy**. 2nd. New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2005.
- HOWARD, V.; REED, M. G. **Unbiased stereology**. 2010.
- HUNZIKER, E. B. Cartilage histomorphometry. In: (Ed.). **Arthritis research**: Springer, 2007. p.147-166. ISBN 1588293440.
- KELLER, K. K. et al. Improving efficiency in stereology: a study applying the proportionator and the autodisector on virtual slides. **Journal of microscopy**, v. 251, n. 1, p. 68-76, 2013. ISSN 1365-2818.
- KELLER, K. K. et al. Histological changes in chronic autoimmune SKG-arthritis evaluated by



quantitative three-dimensional stereological estimators. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 29, n. 3, p. 536-543, 2010. ISSN 0392-856X.

KELLER, K. K. et al. Bone formation and resorption are both increased in experimental autoimmune arthritis. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e53034, 2012. ISSN 1932-6203.

KELLER, K. K. et al. Systemic but no local effects of combined zoledronate and parathyroid hormone treatment in experimental autoimmune arthritis. **PloS one**, v. 9, n. 3, 2014. ISSN 1932-6203.

KLOSE-JENSEN, R. et al. Subchondral bone turnover, but not bone volume, is increased in early stage osteoarthritic lesions in the human hip joint. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 23, n. 12, p. 2167-2173, 2015. ISSN 1063-4584.

KREMER, J. R.; MASTRONARDE, D. N.; MCINTOSH, J. R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. **Journal of structural biology**, v. 116, n. 1, p. 71-76, 1996. ISSN 1047-8477.

LANDEWÉ, R. et al. Existing joint erosions increase the risk of joint space narrowing independently of clinical synovitis in patients with early rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 17, n. 1, p. 133, 2015. ISSN 1478-6354.

LEVICK, J. R.; PRICE, F. M.; MASON, R. M. 11 Synovial Matrix-Synovial Fluid System of Joints. **Extracellular matrix**, v. 1, p. 328, 1996. ISSN 3718658429.

MATTFELDT, T. et al. Estimation of surface area and length with the orientator. **Journal of microscopy**, v. 159, n. 3, p. 301-317, 1990. ISSN 1365-2818.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 23, p. 2205-2219, 2011. ISSN 0028-4793.

MOUTON, P. R. **Unbiased stereology: a concise guide**. JHU Press, 2011. ISBN 0801899850.

NYENGAARD, J. R.; GUNDERSEN, H. J. G. The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens. **Journal of microscopy**, v. 165, n. 3, p. 427-431, 1992. ISSN 0022-2720.

PAP, T. et al. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res**, v. 2, n. 5, p. 361-367, 2000. ISSN 1465-9905.

PASTOUREAU, P.; HUNZIKER, E.; PELLETIER, J.-P. Cartilage, bone and synovial histomorphometry in animal models of osteoarthritis. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 18, p. S106-S112, 2010a. ISSN 1063-4584.

PASTOUREAU, P.; HUNZIKER, E. B.; PELLETIER, J.-P. Cartilage, bone and synovial histomorphometry in animal models of osteoarthritis. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 18, p. S106-S112, 2010b. ISSN 1063-4584.

PEARLE, A. D.; WARREN, R. F.; RODEO, S. A. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. **Clinics in sports medicine**, v. 24, n. 1, p. 1-12, 2005. ISSN 0278-5919.

PEARSON, C. M. Experimental joint disease: Observations on adjuvant-induced arthritis. **Journal of chronic diseases**, v. 16, n. 8, p. 863-874, 1963. ISSN 0021-9681.

RALPHS, J.; BENJAMIN, M. The joint capsule: structure, composition, ageing and disease. **Journal of anatomy**, v. 184, n. Pt 3, p. 503, 1994.

ROSIWAL, A. Über geometrische Gesteinsanalysen. Ein einfacher Weg zur ziffermässigen Feststellung des Quantitätsverhältnisses der Mineralbestandtheile gemengter Gesteine. **Verhandl. der KK Geol.(Reichsanstalt, 1898)**, 1898.

SAVNIK, A. et al. MRI of the arthritic finger joints: synovial membrane volume determination, a manual vs a stereologic method. **European radiology**, v. 12, n. 1, p. 94-98, 2002. ISSN 0938-7994.

SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie**, v. 26, n. 1, p. 57, 1970. ISSN 0026-3702.

STERIO, D. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. **Journal of microscopy**, v. 134, n. 2, p. 127-136, 1984. ISSN 0022-2720.

THOMSON, E. Quantitative microscopic analysis. **The Journal of Geology**, v. 38, n. 3, p. 193-222, 1930. ISSN 0022-1376.



Ciências Biológicas

WANG, S. X.; ARSENAULT, L.; HUNZIKER, E. B. Stereologic analysis of tibial-plateau cartilage and femoral cancellous bone in guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. **Clinical Orthopaedics and Related Research®**, v. 469, n. 10, p. 2796-2805, 2011. ISSN 0009-921X.

WEIBEL, E. R. **Stereological Methods: Theoretical Foundations. Vol. 2.** Academic Press, London, 1980.

WEIBEL, E. R.; HSIA, C. C.; OCHS, M. How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry. **Journal of applied physiology**, v. 102, n. 1, p. 459-467, 2007. ISSN 8750-7587.