

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP
RELATÓRIO DE CONSULTA

TÍTULO: “Análise da ativação glial após lesão da medula espinhal”

PESQUISADOR: Ricardo José de Almeida Leme

ORIENTADOR: Gerson Chadi

INSTITUIÇÃO: Instituto de Ciências Biomédicas – USP

FINALIDADE: Doutorado

PARTICIPANTES DA ENTREVISTA: Ricardo José de Almeida Leme

Gerson Chadi

Antonio Carlos Pedroso de Lima

Carmen Diva Saldiva

Caio Hiroshi Oshiro

Anderson Rezende Franco

DATA: 21/08/2001

FINALIDADE DA CONSULTA: Sugestões para a análise de dados

RELATÓRIO ELABORADO POR: Caio Hiroshi Oshiro

1. Introdução

As lesões no Sistema Nervoso Central (SNC) levam a uma resposta inflamatória no local da lesão, causada principalmente por glias (células formadas por microglias e astrócitos) e macrófagos. As glias são células secundárias cuja função é dar suporte aos neurônios; as microglias são células cujas funções são limpar restos celulares, lutar contra infecções do sistema nervoso central e secretar fatores neurotróficos; e os astrócitos são células do sistema nervoso central com funções de sustentação, de secreção de fatores neurotróficos e de modulação da neurotransmissão. Os macrófagos, por sua vez, circulam no sangue periférico e fazem parte dos glóbulos brancos.

As microglias e os astrócitos (e consequentemente as glias) tornam-se ativos após a lesão no SNC, sofrendo mudanças no formato e na função das células, que aumentam em tamanho e em quantidade.

Os astrócitos produzem uma densa rede de processos citoplasmáticos ao redor da área lesionada, sendo que a ativação microglial nos processos varia de acordo com o grau de ativação das células; isso explica, em parte, a reação glial que se desenvolve nas áreas mais afastadas da lesão.

No estudo, a ativação glial (resposta inflamatória devido a lesão, como aumento de tamanho) ocorrida dentro ou fora do local da lesão foi demonstrada em ratos com a medula espinhal lesionada. Para isso foi utilizada a análise de imagens digitalizadas das células pertencentes à região lesionada, em conjunto com técnicas imuno-histoquímicas.

O principal objetivo deste trabalho é avaliar o uso de análise de imagens – em que as alterações (aumento de tamanho e quantidade) nas microglias e astrócitos são avaliadas – como método para identificação e análise da ativação glial.

2. Descrição do Estudo

Foram utilizados doze ratos adultos da raça *Wistar*, pesando de 220 a 250 gramas, retirados do biotério da Universidade de São Paulo. Durante o estudo, os animais foram mantidos sob condições de temperatura, umidade e iluminação controladas.

Todos os doze ratos foram submetidos ao mesmo tipo de cirurgia: a laminectomia, que é a retirada do arco de certas vértebras. Sua realização em todos os ratos foi muito importante para que o nível de estresse cirúrgico dos ratos cujas medulas não seriam lesionadas fosse semelhante ao dos ratos cujas medulas seriam lesionadas: após a laminectomia, oito ratos sofreram lesão na medula e os outros quatro permaneceram com as suas medulas intactas (os ratos que sofreram lesão foram selecionados aleatoriamente).

Tanto os ratos com lesão quanto os ratos sem lesão foram divididos aleatoriamente em dois grupos, que foram sacrificados após 7 dias (quatro ratos com lesão e dois sem, sendo que um dos ratos com lesão morreu antes) ou 3 meses (quatro ratos com lesão e dois sem). Após os sacrifícios dos animais, as medulas foram cortadas em pedaços pequenos, orientados segundo o eixo rostro-caudal e congelados.

Para que a atividade das microglias e dos astrócitos (e consequentemente das glias) pudesse ser identificada na análise de imagens, foram utilizados dois anticorpos que, ao reagirem com as proteínas OX-42 (exclusiva das microglias) e GFAP (exclusiva dos astrócitos) destacam as microglias e astrócitos na imagem, realçando os valores de cinza (na imagem obtida das células, quanto mais fortes os tons de cinza em uma determinada área maior será o grau de ativação glial, pois os valores de cinza são proporcionais ao grau de ativação glial).

Após a correção eletrônica dos tons da imagem obtida pela análise de imagens, foram medidos o valor médio de cinza do *background* (bgMGV) e o respectivo erro padrão (ep), das substâncias cinza e branca da medula espinhal. Assim, foi definida a variável “valor médio específico de cinza” (spMGV) como a diferença entre bgMGV e o valor médio de cinza das áreas em que esse valor superava $bgMGV - 3 \times ep$.

3. Descrição das Variáveis

Foram analisadas as seguintes variáveis:

- Local: indica de qual parte da coluna a medula lesionada foi retirada (coluna lombar, torácica e cervical);
- Substância: regiões da célula em que houve lesão (Branca ou Cinza);
- Tempo: indica o tempo que o animal permaneceu vivo, antes de ser sacrificado, após a lesão (7 dias ou 3 meses);
- Área-IR: área de imunoreatividade ou área das células que reagiram à lesão aumentando de tamanho e ficando mais escuras (um²);
- spMGV: índice de coloração (sem unidade). Mede a intensidade de cor, após o tratamento de imagens, das células que reagiram à lesão aumentando de tamanho e ficando mais escuras, sendo obtida diretamente da análise de imagens.

4. Situação do Projeto

Todos os dados já foram coletados e armazenados em planilha eletrônica.

5. Sugestões do CEA

Pontos identificados como aberrantes devem ser analisados individualmente para verificar se os seus valores foram corretamente registrados. A ocorrência de tais pontos pode ser um indicativo de assimetria da distribuição dos dados. No presente estudo, é importante detectar e identificar pontos que são aberrantes quando observamos as variáveis área de imunoreatividade (Área-IR) e valor médio de cinza (spMGV) ao mesmo tempo: esses pontos influenciam a análise dos dados, que pode fornecer resultados não verdadeiros ou sem sentido real se não for utilizada a modelagem

adequada. Para a detecção de pontos aberrantes multivariados podem ser utilizadas técnicas de análise de agrupamentos, como o método das K-médias (ver, por exemplo, Bussab et al, 1990).

Os dados foram agrupados pelo método das K-médias em 3, 4, 5, 6 e 7 grupos. Alguns dos resultados obtidos são apresentados na Parte II do Apêndice. Quando os dados são divididos em mais de quatro grupos, um grupo se destaca pelo fato de que as distâncias entre ele e os demais são bem maiores do que as distâncias entre os outros grupos (Tabelas 1 a 5). Já através do Gráfico 2 e da Tabela 7, definimos o número ideal de grupos como cinco, pois a soma de quadrados residual tende a se estabilizar a partir desse número de grupos. Assim, os pontos com valores de Área-IR maiores do que 10,75 μm^2 (pertencentes ao Grupo 4) precisam ser melhor estudados para verificar se são aberrantes ou se ocorreram devido à distribuição dos dados.

Para o entendimento da relação entre Área-IR com spMGV inicialmente podem ser utilizados os métodos da correlação de Spearman (ver, por exemplo, Conover, 1980) e de Pearson (ver, por exemplo, Bussab e Morettin, 1987) em conjunto com os gráficos de dispersão construídos com as escalas ajustadas para cada situação avaliada (local, substância, tempo e anticorpo), desconsiderando-se os pontos tidos como aberrantes. Os dois métodos de correlação fornecem coeficientes que assumem valores entre -1 e 1 ; quanto mais próximos de 1 ou de -1 forem os valores dos coeficientes, mais forte será a associação entre as variáveis, e para valores perto de zero não existe associação. O coeficiente de correlação de Spearman é melhor quando a distribuição conjunta das duas variáveis é desconhecida.

A fim de melhor visualizar possíveis relações entre Área-IR e spMGV, pode-se utilizar uma técnica de suavização dos dados como, por exemplo, o método Lowess (ver, por exemplo, Cleveland, 1985).

No Apêndice ilustramos os procedimentos descritos acima para o anticorpo GFAP, medido na substância branca da medula retirada da região lombar, 3 meses após a lesão.

6. Conclusão

Os métodos sugeridos nesse relatório permitem a realização de uma análise exploratória através de técnicas descritivas. Para uma análise mais detalhada, sugere-se o encaminhamento do presente projeto para o processo de triagem de trabalhos a serem analisados no 1º semestre de 2002.

7. Referências Bibliográficas

BUSSAB, W. O. e MORETTIN, P. A. (1987). **Estatística Básica**. São Paulo: Atual. 321p.

BUSSAB, W. O., MIAZAKI, E. S. e ANDRADE, D. F. (1990). **Introdução à Análise de Agrupamentos**. 9º Simpósio Brasileiro de Probabilidade e Estatística. São Paulo: ABE. 105p.

CLEVELAND, W. S. (1985). **The Elements of Graphing Data**. California: Wadsworth Advanced Books and Software. 323p.

CONOVER, W. J. (1980). **Practical Nonparametric Statistics**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons. 493p.

8. Programas Utilizados

Microsoft Excel 97 for Windows

Microsoft Word 97 for Windows

Minitab Release 13.0

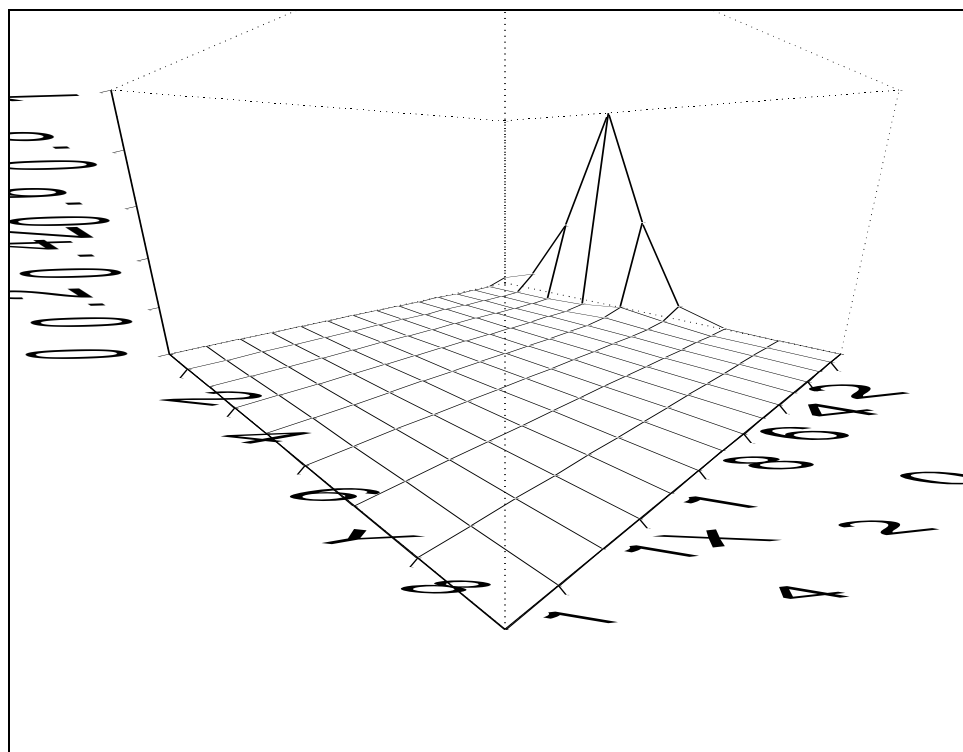
S-Plus 2000

Apêndice

Parte I – Estudo do comportamento conjunto das variáveis Área-IR e spMGV

O Gráfico 1, referente às variáveis Área-IR e spMGV, foi construído com o auxílio do aplicativo S-Plus, e pode ser interpretado como um histograma bivariado: a maioria dos valores de área estão concentrados entre 0 e 2 (eixo X); já os valores de spMGV concentram-se entre 3 e 5 (eixo Y).

Gráfico 1: “Histograma” das variáveis Área-IR e spMGV



A seguir mostramos os gráficos de dispersão das variáveis Área-IR e spMGV e as curvas de Lowess ajustadas com e sem os pontos do Grupo 4 (Gráficos 2 a 5). A correlação de Pearson vale 0,310 e a correlação de Spearman vale 0,441 (com os pontos do Grupo 4); sem os pontos do Grupo 4, a correlação de Pearson vale 0,349 e a correlação de Spearman vale 0,434. Observando os valores das correlações e os Gráficos 3 a 6, constatamos que a associação entre Área-IR e spMGV não é forte com ou sem os pontos do Grupo 4.

Nos Gráficos 2 a 5 observamos, ainda, que parece haver um limite superior para a variável spMGV, em torno de 70 e 75 unidades.

Gráfico 2: Gráfico de dispersão: spMGV X Área-IR com todas as observações

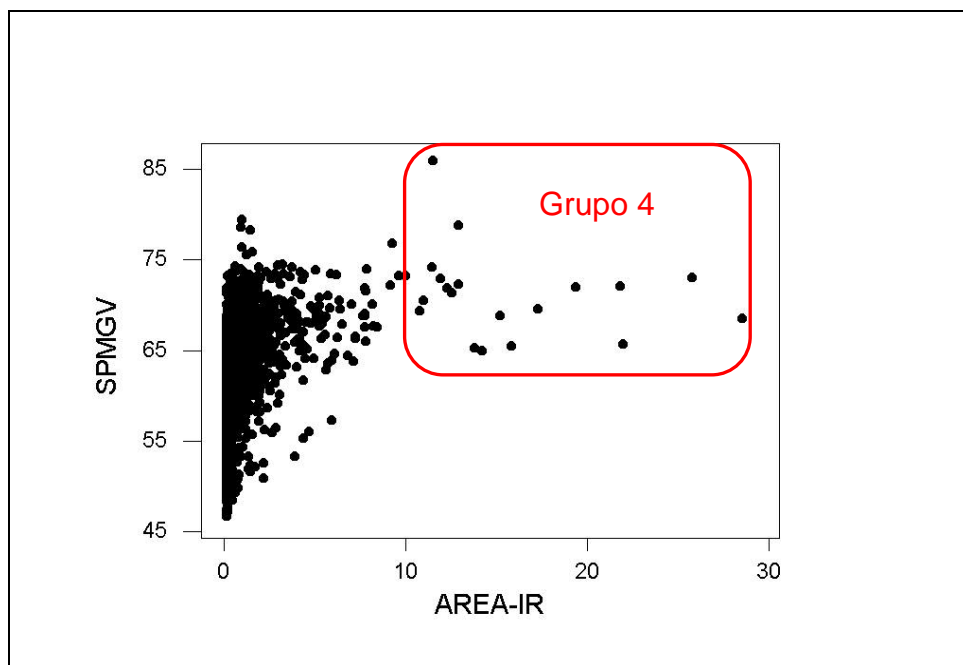


Gráfico 3: Curva de Lowess ajustada para spMGV em função de Área-IR com todas as observações

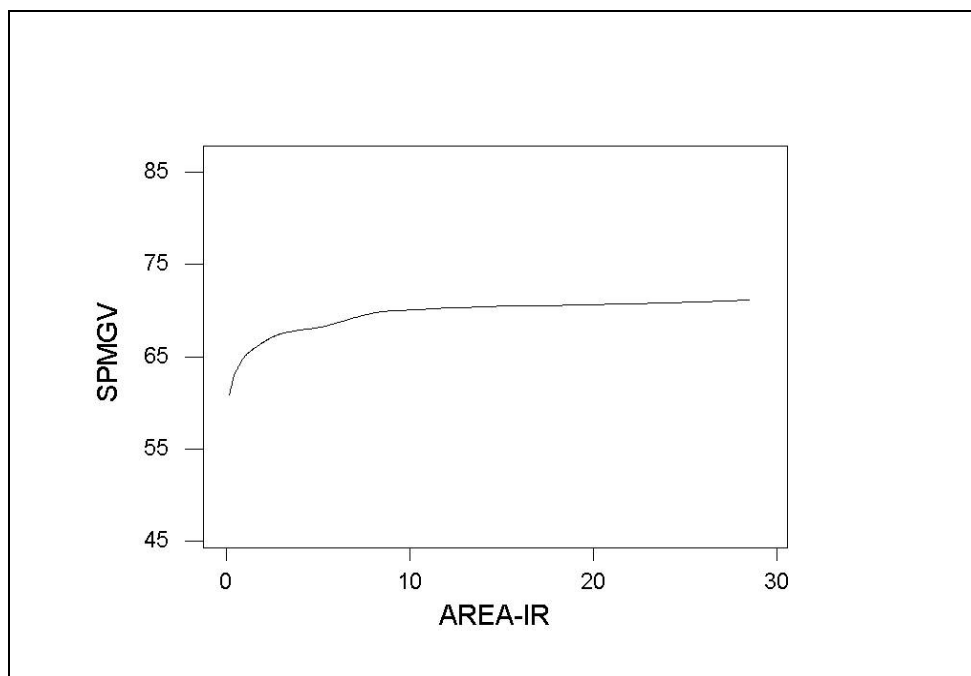


Gráfico 4: Gráfico de dispersão: spMGV X Área-IR sem as observações do Grupo 4

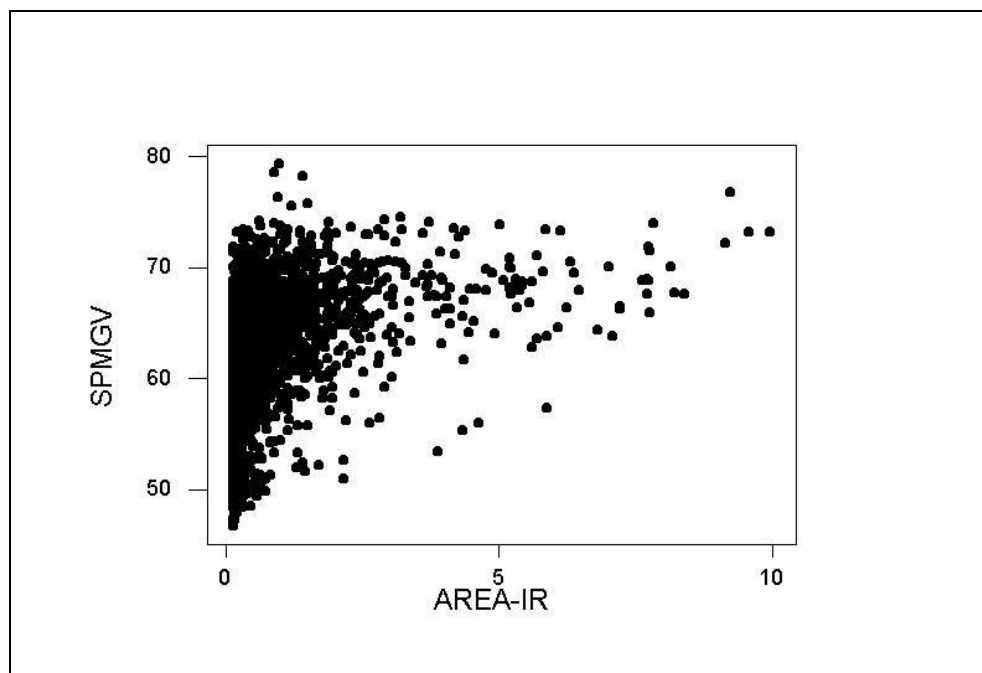
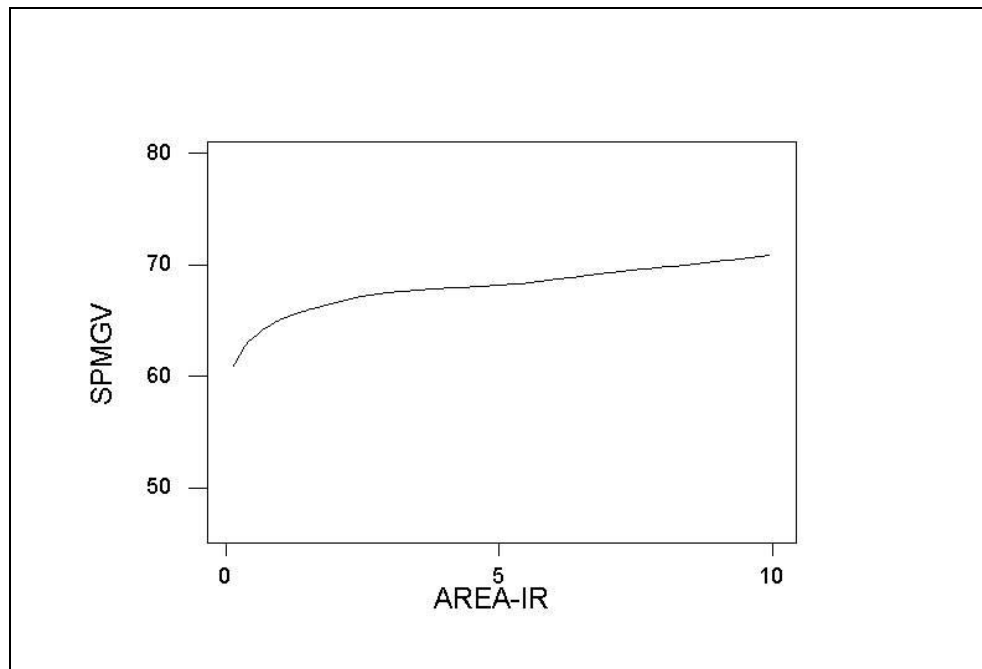


Gráfico 5: Curva de Lowess ajustada para spMGV em função de Área-IR sem as observações do Grupo 4



Parte II – Análise de Agrupamentos

Tabela 1: Matriz de distâncias entre os Grupos 1, 2 e 3, pelo método das K-médias

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1	0,00	6,55	5,92
Grupo 2	6,55	0,00	1,54
Grupo 3	5,92	1,54	0,00

Tabela 2: Matriz de distâncias entre os Grupos 1, 2, 3 e 4, pelo método das K-médias

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Grupo 1	0,00	2,74	1,31	7,34
Grupo 2	2,74	0,00	1,51	8,56
Grupo 3	1,31	1,51	0,00	8,09
Grupo 4	7,34	8,56	8,09	0,00

Tabela 3: Matriz de distâncias entre os Grupos 1, 2, 3, 4 e 5, pelo método das K-médias

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Grupo 1	0,00	4,37	3,49	7,52	2,91
Grupo 2	4,37	0,00	1,51	11,29	2,69
Grupo 3	3,49	1,51	0,00	10,87	1,19
Grupo 4	7,52	11,29	10,87	0,00	10,43
Grupo 5	2,91	2,69	1,19	10,43	0,00

Tabela 4: Matriz de distâncias entre os Grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, pelo método das K-médias

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Grupo 1	0,00	3,97	3,57	7,22	3,01	4,90
Grupo 2	3,97	0,00	0,93	10,99	1,98	1,54
Grupo 3	3,57	0,93	0,00	10,75	1,08	2,46
Grupo 4	7,22	10,99	10,75	0,00	10,23	11,45
Grupo 5	3,01	1,98	1,08	10,23	0,00	3,49
Grupo 6	4,90	1,54	2,46	11,45	3,49	0,00

Tabela 5: Matriz de distâncias entre os Grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, pelo método das K-médias

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7
Grupo 1	0,00	2,31	1,69	9,61	2,78	3,62	1,34
Grupo 2	2,31	0,00	0,91	11,42	4,77	1,55	1,92
Grupo 3	1,69	0,91	0,00	11,18	4,39	2,46	1,02
Grupo 4	9,61	11,42	11,18	0,00	6,83	11,87	10,91
Grupo 5	2,78	4,77	4,39	6,83	0,00	5,61	4,08
Grupo 6	3,62	1,55	2,46	11,87	5,61	0,00	3,47
Grupo 7	1,34	1,92	1,02	10,91	4,08	3,47	0,00

Tabela 6: Quantidade de pontos em cada grupo, por número total de grupos

Grupo	Número de Grupos				
	3	4	5	6	7
1	68	990	110	90	203
2	1.643	701	587	1.261	1.177
3	2.261	2.242	2.078	1.612	1.572
4	-	39	19	19	17
5	-	-	1.178	685	56
6	-	-	-	305	277
7	-	-	-	-	670
Total	3.972	3.972	3.972	3.972	3.972

Tabela 7: Soma de quadrados residual de cada grupo, por número total de grupos

Grupo	Número de Grupos				
	3	4	5	6	7
1	889,403	907,327	221,342	164,689	149,764
2	953,269	385,404	288,743	206,565	183,038
3	1.324,519	449,197	391,628	232,021	191,796
4	-	562,079	258,640	258,640	231,951
5	-	-	484,518	332,696	96,103
6	-	-	-	112,972	86,852
7	-	-	-	-	180,073
Total	3.167,191	2.304,007	1.644,871	1.307,583	1.119,577

Gráfico 6: Soma de Quadrados Residual X Número de Grupos

