

Comparação de técnicas de avaliação do colágeno em secções histológicas de ratos submetidos a radioterapia

Comparison of collagen evaluation techniques in histological sections of rats submitted to radiotherapy

Hortência Resende dos Santos Della Cella^{1*}, Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo²,
Gabriela Botelho Martins³

¹Cirurgiã-dentista formada pela Universidade Federal da Bahia – UFBA, Nutricionista formada pela Faculdade São Salvador – SEEB e Bacharela Interdisciplinar em Saúde pela Universidade Federal da Bahia – UFBA, Especialista em Alimentos Funcionais e Nutrigenômica: Implicações Práticas na Nutrição Clínica pela Universidade Estácio de Sá, Doutoranda do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia – UFBA; ²Cirurgiã-dentista formada pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Especialista em Odontologia Preventiva pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Doutora em Odontologia – Estomatologia Clínica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS; Professora Titular de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Chefe do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS; ³Cirurgiã-dentista formada pela Universidade Federal da Bahia – UFBA, Mestre em Odontologia pela Universidade Federal da Bahia – UFBA, Doutora em Odontologia – Estomatologia Clínica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Professora Associado do Instituto Multidisciplinar de Reabilitação e Saúde da Universidade Federal da Bahia – IMRS e do Programa de Pós-Graduação Processos Interativos de Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia – UFBA

Resumo

Introdução: o colágeno é uma proteína fibrosa que participa de diversos processos fisiológicos e patológicos. Dada sua importância, a avaliação desse componente tem sido de grande relevância em variadas pesquisas biológicas. **Objetivo:** verificar a concordância entre métodos quantitativos na análise do colágeno em secções teciduais histológicas. **Metodologia:** trata-se de estudo experimental, que utilizou secções teciduais coradas em Sirius Vermelho de 28 ratos *Wistar*, pertencentes a dois grupos experimentais, com animais submetidos à radioterapia, sem úlcera (G1) ou com úlcera (G2) produzida em dorso lingual para avaliação do reparo tecidual. Foram estabelecidos dois métodos para comparação das técnicas de avaliação do colágeno: morfometria por contagem manual de pontos com duas grades (320 e 588 pontos), e morfometria por segmentação de cor. Foram utilizados testes não paramétricos Mann Whitney, para as comparações entre os grupos, e Friedman e Nemenyi, para as comparações entre as técnicas. O teste de correlação de Pearson foi usado para avaliar a quantidade de colágeno entre os métodos. O nível de significância foi de 5%. **Resultados:** em ambos os grupos experimentais houve correlação significativa entre a quantidade de colágeno avaliada pela técnica de 320 e 588 pontos. Nos dois grupos, a porcentagem de colágeno foi significativamente maior quando avaliada pela técnica de 588 pontos do que pela técnica por segmentação por cor ($p < 0,05$). No grupo G2, houve correlação significativa entre a quantidade de colágeno avaliada pela técnica de 588 pontos e por segmentação por cor ($p < 0,05$). Pelas técnicas de 588 pontos e segmentação por cor, a quantidade de colágeno foi significativamente maior no grupo com lesão ($p < 0,05$). **Conclusão:** ainda que alguns resultados tenham se mostrado semelhantes entre as técnicas de contagem de pontos com grade de 588 pontos e segmentação por cor, os dados sugerem que a técnica de 588 pontos é mais eficaz na quantificação do colágeno.

Palavras-chave: Histologia; colágeno; *picrosirius red*; citometria por imagem; análise de imagem assistida por computador.

Abstract

Introduction: collagen is a fibrous protein that participates in several physiological and pathological processes. Given its importance, the evaluation of this component has been of great relevance in various biological research. **Objective:** to verify the agreement between quantitative methods in the analysis of collagen in histological tissue sections. **Methodology:** this is an experimental study which used tissue sections stained in Sirius Red from 28 *Wistar* rats belonging to two experimental groups, with animals submitted to radiotherapy, without ulcer (G1) or with an ulcer (G2) produced on the lingual dorsum for evaluation of the tissue repair. Two methods were established for comparing collagen evaluation techniques: morphometry by manually counting points with two grids (320 and 588 points) and morphometry by colour segmentation. Non-parametric Mann-Whitney tests were used for comparisons between groups, and Friedman and Nemenyi for comparisons between techniques. Pearson's correlation test assessed the amount of collagen between methods. The significance level was 5%. **Results:** in both experimental groups, there was a significant correlation between the amount of collagen evaluated by the technique of 320 and 588 points. In both groups, the percentage

Correspondente/ Correponding: *Hortência Resende dos Santos Della Cella. – End: Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, 4º andar (sala 413). Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. CEP 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil. Tel.: (+55) (71) 3283-8891 / E-mail: hortencia_resende@hotmail.com

of collagen was significantly higher when evaluated using the 588-point technique than the colour segmentation technique ($p < 0.05$). In the G2 group, there was a significant correlation between the amount of collagen assessed by the 588-point technique and by segmentation by colour ($p < 0.05$). Using the 588-point technique and segmentation by colour, the amount of collagen was significantly higher in the group with lesions ($p < 0.05$). **Conclusion:** although some results are similar between the point counting techniques with a 588-point grid and colour segmentation, the data suggest that the 588-point technique is more effective in quantifying collagen. **Keywords:** Histology; collagen; picrosirius red; imaging cytometry; computer-assisted image analysis

INTRODUÇÃO

O tecido conjuntivo é caracterizado pela abundância de matriz extracelular, que consiste em diferentes combinações de fibras colágenas e de substância fundamental, e pela grande variedade de células, sendo os fibroblastos as mais presentes, com intensa atividade de síntese de proteínas diversas, colágeno e elastina. Atua no suporte de órgãos e células, na conexão entre os diversos tecidos, no transporte de nutrientes e resíduos, bem como na defesa contra patógenos¹⁻³. O colágeno é uma proteína fibrosa, considerada o componente mais importante do tecido conjuntivo. É constituído de 28 isoformas proteicas, e formado por cadeias peptídicas dos aminoácidos glicina, prolina, alanina, hidroxiprolina e hidroxilisina, sendo secretado pelos fibroblastos na forma de procolágeno solúvel⁴⁻⁶. Sua síntese ocorre tanto de forma intracelular quanto extracelular, gerando vários tipos de colágenos, com funções diferentes⁶⁻⁷.

Participa ainda, fortemente, do processo de reparo tecidual da maioria das lesões por meio da constante remodelação da matriz extracelular e da formação de tecido cicatricial⁸⁻¹¹, através da deposição do colágeno nos tecidos em torno das 24 horas subsequentes à injúria, com predomínio do colágeno tipo III, que é substituído por colágeno tipo I, após o tempo médio de sete dias. A partir do oitavo dia após a injúria, ocorre o pico da produção de colágeno, estimulada por citocinas fibrogênicas¹²⁻¹⁴.

A radioterapia é uma das formas de tratamento utilizada para as neoplasias malignas da região de cabeça e pescoço. Essa forma terapêutica se baseia na injúria das células neoplásicas pela radiação ionizante, através de danos diretos ao DNA, ou indiretamente pela formação de radicais livres. No entanto, ela também provoca alterações nos tecidos normais adjacentes ao tumor, em especial naqueles com alta taxa de renovação celular, como, por exemplo, a mucosa que reveste a cavidade bucal¹⁵⁻¹⁷.

As características do tecido pós-radioterapia podem mostrar modificações da resposta do tecido a outras injúrias, influenciando no reparo tecidual. A presença de qualquer alteração em uma das fases do reparo pode levar a respostas inadequadas à injúria, com consequentes mudanças no processo cicatricial e impactos expressivos na neoformação dos tecidos epitelial e conjuntivo, nos quais, conseqüentemente, além de provocar mudanças histológicas, podem ocasionar sequelas estruturais e funcionais nos tecidos de suporte¹⁸⁻²⁰.

A histopatologia é uma ciência antiga, que se utiliza da observação e da análise microscópica das alterações morfológicas que ocorrem nos órgãos, com intuito de

diagnosticar e investigar a patogênese de doenças²¹. Dentre as diversas colorações utilizadas para análise microscópica dos tecidos, a escolha e o emprego devem levar em consideração a localização anatômica e as características morfológicas que o tecido apresenta²²⁻²³. Em função de permitir o contraste entre o núcleo e o citoplasma, a coloração mais aplicada no processamento de rotina é a combinação de Hematoxilina, um corante básico que reage com os ácidos nucleicos e confere ao núcleo uma coloração azulada, a Eosina, um corante ácido, que fixa os componentes básicos do citoplasma, sendo a coloração popularmente conhecida como HE²⁴.

Para a análise do tecido conjuntivo, em especial no estudo das fibras colágenas presentes, embora as colorações de Mallory e van Giesen sejam bastante utilizadas²⁵, elas possuem uma fragilidade na densidade da cor produzida, se mostrando insuficientes para corar outras estruturas contendo colágeno, a exemplo das fibras de reticulina e membranas basais²⁵. Por isso, atualmente, as colorações mais empregadas para esse fim são Tricrômico de Masson e *Picrosirius*, ou *Sirius Vermelho*²⁶. O Tricrômico de Masson favorece a segmentação de diferentes fibras e demais estruturas dérmicas, além de ser bastante usado para visualização de fibrose²⁷. No entanto, apresenta uma grande tendência ao desbotamento²⁷.

Assim, pela facilidade de execução da técnica e do baixo custo, a coloração mais utilizada para avaliação do colágeno é o *Picrosirius* ou *Sirius Vermelho*, pois permite uma análise qualitativa das fibras, e a diferenciação de seus tipos, em especial os tipos I e III, quando observadas sob microscópio de luz polarizada, pela sua capacidade de realce da birrefringência, bem como de análise quantitativa da rede de colágeno²⁸⁻³¹.

Dada a importância do colágeno nos diversos processos fisiológicos e (ou) patológicos, a avaliação qualitativa e quantitativa desse componente tem sido de grande relevância em variadas pesquisas médicas e biológicas, sob diversas técnicas metodológicas.

No estudo de Lima et al.⁵ (2022), com o objetivo de aferir a área do colágeno em um modelo experimental de cicatrização cutânea *in vivo*, sob a ação da fotobiomodulação laser, com a coloração de *Sirius Vermelho*, os autores analisaram comparativamente dois métodos de análise de fibras colágenas, que compreenderam, respectivamente, análise semiquantitativa, categorizando por escores, e morfometria pelo *software ImageJ*, e encontraram resultados semelhantes entre os métodos utilizados.

Lima et al.³² (2020), para quantificar tipos I e III do colágeno presente em lesões de pele de pacientes portadores de hanseníase, também utilizaram cortes

histológicos corados por *Picrosirius*, através do *software ImageJ*, em microscópio de luz polarizada, onde foi possível perceber que as lesões na fase inicial e polares da hanseníase apresentam diferenças na quantidade de fibras colágenas tipo I e III, em decorrência do processo inflamatório persistente.

Bedoya et al. (2019)³³, com cortes histológicos corados com *Picrosirius* e analisados em microscópio sob luz polarizada, ao compararem a quantificação histomorfométrica de colágeno em pele equina por contagem de pontos (grade 792 pontos) e pela segmentação de cor a partir *software ImageJ*, concluíram que as duas técnicas demonstraram resultados equivalentes. Resultado semelhante foi observado por Amenábar et al.³⁴ (2006), ao compararem a concordância entre a contagem manual de 320 pontos e a segmentação das fibras colágenas no *software Image-Pro Plus* versão 4.0, em língua de ratos, coradas em *Picrosirius* e contracoradas com verde de metila.

Embora diversos métodos semiquantitativos e quantitativos sejam utilizados de forma rotineira na avaliação do colágeno tecidual, não há uma padronização nas técnicas. Dessa forma, este trabalho teve o objetivo de verificar a concordância entre métodos quantitativos na análise do colágeno em secções teciduais histológicas de ratos submetidos à radioterapia, em uma tentativa de validar a escolha de métodos distintos pelos pesquisadores e que possam demonstrar resultados semelhantes entre si.

METODOLOGIA

Tratou-se de um estudo experimental comparativo, que foi conduzido no Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde (ICS, UFBA).

A amostra foi constituída por 28 lâminas histológicas de arquivo, contendo secções teciduais com 4 µm de espessura, coradas com Sirius Vermelho, coloração específica para o estudo do colágeno total. As secções foram obtidas a partir de animais de experimento anterior, executado após aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), sob protocolo número 0053/03, sendo o novo projeto submetido em 2023 e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do ICS/UFBA sob o número 6707080523.

Os animais eram ratos machos adultos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*. Todos foram submetidos à radioterapia em região de cabeça, sendo a dose total de radiação aplicada de 6000 cGy ao final do tratamento, fracionada em doses de 200 cGy/dia, durante seis semanas, cinco vezes por semana, totalizando 30 sessões. O aparelho empregado no tratamento radioterápico foi o Theraton, modelo Phoenix 61, unidade de teleterapia rotacional por Cobalto 60, com energia de 1,25 MeV. O grupo 01 (G1) foi constituído por 15 animais que não tiveram úlcera produzida em dorso de língua, e o grupo 02 (G2) foi formado com 13 animais que tiveram lesão ulcerada produzida no dorso da língua com um *punch* descartável de 5 mm de diâmetro, na terceira semana de radioterapia. Ao final do experimento, após a morte

dos animais, as línguas foram removidas e encaminhadas para processamento histológico de rotina, sendo coradas também com Sirius vermelho.

A partir das secções teciduais coradas, foram capturadas fotomicrografias correspondentes a três campos da área de interesse, a saber: úlcera ou centro do dorso lingual, a depender do grupo de trabalho, e bordas direita e esquerda, na objetiva de 10x.

A calibração do examinador para uso do *Software Motic Images Plus 2.0* (Motic Asia, Hong Kong, China), do *Software ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, Md) e do microscópio de luz Quimis BA410 (Quimis, São Paulo, Brasil), acoplado à câmera Moticom 5.0, ocorreu no Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde (ICS, UFBA). A análise ocorreu de forma cega para os grupos de trabalho.

Avaliação do Colágeno

Foram estabelecidos dois métodos para comparação de técnicas de avaliação do colágeno total correspondente à lâmina própria no grupo sem lesão (G1) e da região de reparo tecidual no grupo com lesão (G2), a saber: morfometria por contagem manual de pontos, com uso de duas grades (320 e 588 pontos), e morfometria por segmentação de cor.

As análises foram realizadas através de fotomicrografias obtidas através do *Software Motic Images Plus 2.0*, com captura de três áreas distintas de cada uma das secções teciduais, como foi mencionado anteriormente.

Para tanto, na análise por contagem manual de pontos, foram incluídas, no momento da captura das imagens, duas grades sobrepostas nas secções de forma individual, com 320 e 588 pontos de interseção. A determinação da quantidade de pontos se baseou nos protocolos indicados nas metodologias de Amenábar et al.³⁴ (2006) e Bedoya et al.³³ (2019), respectivamente.

Já a análise morfométrica por segmentação de cor do percentual de colágeno em relação à área total (39.277,4 µm²) do tecido foi realizada pelo *Software ImageJ*, na imagem capturada previamente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas análises de correlação de Pearson entre as quantidades de colágeno avaliadas pelos dois métodos. A interpretação dos coeficientes de correlação foi realizada de acordo com Mukaka³⁵ (2012). As análises descritivas e exploratórias dos dados de colágeno foram realizadas para as comparações entre as técnicas e entre os grupos. Foram utilizados os testes não paramétricos de Mann Whitney para as comparações entre os grupos, e de Friedman e Nemenyi para as comparações entre as técnicas. Como são variáveis em escalas diferentes, as comparações entre as técnicas foram possíveis para as porcentagens. Todas as análises foram realizadas no programa R (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Como demonstra a Tabela 1, que traz as comparações entre os grupos, quanto aos valores brutos do colágeno para cada um dos métodos aplicados, pôde-se observar que houve diferença significativa na quantidade de colágeno entre os grupos sem (G1) e com lesão (G2), quando avaliados pela técnica dos 588 pontos e por segmentação por cor, sendo significativamente menor no grupo G1 ($p < 0,05$).

Já a Tabela 2, que apresenta o resultado das análises de correlação dos métodos utilizados para a avaliação do colágeno, revela que só não houve correlação significativa entre a avaliação por segmentação de cor e as avaliações com 320 e 588 pontos, no grupo G1 ($p > 0,05$).

Nos demais casos, houve correlação positiva significativa ($p < 0,05$). Nos dois grupos, houve correlação significativa positiva forte entre as avaliações com 320 e 588 pontos ($p < 0,05$). No grupo G2, houve correlação

significativa positiva moderada entre a avaliação com 588 pontos e por segmentação de cor ($p < 0,05$), e correlação significativa positiva fraca entre a avaliação de 320 pontos e por segmentação de cor ($p < 0,05$).

Na Tabela 3 e na Figura 1, são apresentados os resultados das comparações entre as técnicas e os grupos quanto à porcentagem de colágeno. Observa-se que a porcentagem com colágeno foi significativamente menor no grupo G1 do que no G2, quando avaliados pela técnica dos 588 pontos e por segmentação por cor ($p < 0,05$). Além disso, nos dois grupos, a porcentagem de colágeno foi significativamente maior quando utilizada a técnica dos 588 pontos do que quando utilizada a técnica de segmentação por cor ($p < 0,05$). No G1, a porcentagem de colágeno foi também significativamente maior quando utilizada a técnica dos 320 pontos do que quando utilizada a técnica de segmentação por cor ($p < 0,05$).

Tabela 1 – Comparações entre os grupos sem (G1) e com lesão (G2), quanto aos resultados de avaliação de colágeno (valores brutos) pelas três técnicas de avaliação.

Técnica	Unidade de medida	Grupo				p-valor
		G1		G2		
		Média (desvio padrão)	Mediana (valor mínimo e máximo)	Média (desvio padrão)	Mediana (valor mínimo e máximo)	
320 pontos	pontos	68,62 (14,85)	64,33 (52,00; 100,67) A	68,64 (25,67)	55,67 (32,67; 119,67) A	0,6124
588 pontos	pontos	117,29 (27,62)	112,00 (68,67; 177,00) B	155,92 (52,12)	145,67 (70,33; 240,00) A	0,0166
Segmentação por cor	µm	5539,94 (1818,40)	5606,16 (2712,73; 9176,67) B	7581,99 (2459,83)	8160,50 (4291,73; 11577,60) A	0,0255

Letras distintas na horizontal indicam que há diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Laboratório de Bioquímica Oral ICS/UFBA, 2023.

Tabela 2 – Resultado das análises de correlação dos resultados dos três métodos de avaliação do colágeno.

Grupo	Métodos	Coefficiente de correlação (r)	p-valor
G1	320 x 588 pontos	0,73	<0,0001
	320 pontos x segmentação de cor	0,25	0,1000
	588 pontos x segmentação de cor	0,09	0,5417
G2	320 x 588 pontos	0,78	<0,0001
	320 pontos x segmentação de cor	0,46	0,0028
	588 pontos x segmentação de cor	0,61	<0,0001
Amostra total (G1 + G2)	320 x 588 pontos	0,73	<0,0001
	320 pontos x segmentação de cor	0,37	0,0005
	588 pontos x segmentação de cor	0,48	<0,0001

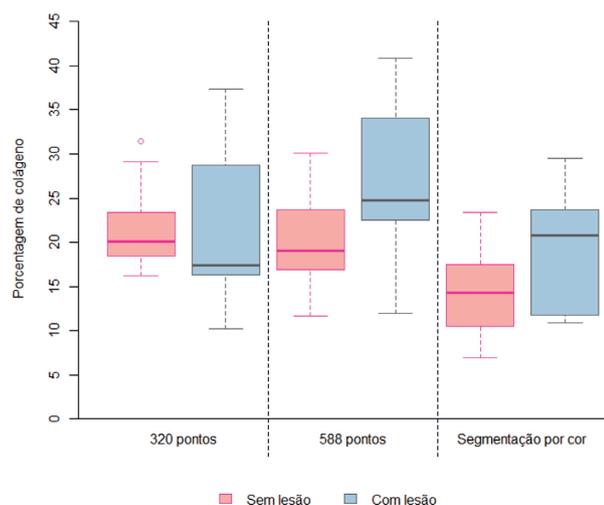
Fonte: Laboratório de Bioquímica Oral ICS/UFBA, 2023.

Tabela 3 – Comparações entre os grupos sem lesão (G1) e com lesão (G2) e entre técnicas quanto aos resultados de avaliação de colágeno (valores em porcentagem).

Técnica	Unidade de medida	Grupo				p-valor
		G1		G2		
		Média (desvio padrão)	Mediana (valor mínimo e máximo)	Média (desvio padrão)	Mediana (valor mínimo e máximo)	
320 pontos	pontos	21,4 (4,6)	20,1 (16,3; 31,5) Aa	21,5 (8,0)	17,4 (10,2; 37,4) Aab	0,6124
588 pontos	pontos	19,9 (4,7)	19,1 (11,7; 30,1) Ba	26,5 (8,9)	24,8 (12,0; 40,8) Aa	0,0166
Segmentação por cor	µm	14,1 (4,6)	14,3 (6,9; 23,4) Bb	19,3 (6,3)	20,8 (10,9; 29,5) Ab	0,0255
p-valor			0,0004		0,0079	

Letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Fonte: Laboratório de Bioquímica Oral ICS/UFBA, 2023.

Figura 1 – Box plot da porcentagem de colágeno em função do método e do grupo.

Fonte: Laboratório de Bioquímica Oral ICS/UFBA, 2023.

DISCUSSÃO

Métodos morfométricos têm sido empregados em várias áreas do conhecimento biológico, inclusive na histologia oral, pelo fato de se basearem em análises quantitativas, o que acaba por fornecer dados essenciais no estudo de tecidos^{36,37}, que normalmente se baseia em análises subjetivas. Conforme é relatado no estudo de Bedoya et al.³³ (2019), a utilização de *softwares* especializados possibilita a realização célere e automatizada de análises em imagens histológicas. Isso resulta em dados que podem ser processados estatisticamente, diminuindo a subjetividade e aumentando a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, esses *softwares* são amplamente acessíveis e, muitas vezes, disponibilizados gratuitamente, além de serem configurados de acordo com o tipo de análise desejada, como mensuração das estruturas, morfometria baseada em contagem de pontos e segmentação de cor, adaptando-se às características específicas dos tecidos a serem estudados³³.

A partir dessa percepção, este trabalho teve o objetivo de verificar semelhanças ou discrepâncias nos resultados entre dois métodos quantitativos de análise de colágeno em dorso de língua de animais tratados em um protocolo de radioterapia, com intuito de fornecer um melhor conhecimento para a adoção de um método.

A justificativa para o uso de dois grupos experimentais distintos está no intuito de investigar se as técnicas eram capazes de diferenciar o quantitativo de colágeno presente, visto que um grupo apresentaria alterações discretas, causadas apenas pela radioterapia (G1), enquanto o outro grupo apresentaria alterações acrescidas pela injúria da radioterapia e da lesão ulcerada produzida (G2). No grupo G1, há uma quantidade de colágeno reduzida, mais próxima de um padrão organização normal. Uma análise qualitativa poderia auxiliar na determinação das

diferenças entre os padrões de espessura de organização das fibras presentes em cada um dos grupos. Todavia, o trabalho objetivou utilizar métodos quantitativos de análise.

Como foi visto, os resultados foram capazes de confirmar essa precisão na diferenciação da quantidade de colágeno total presente, já que os métodos de contagem manual com 588 pontos e segmentação de cor conseguiram detectar essa variação entre os grupos. Em contrapartida, o método de contagem manual com 320 pontos não foi sensível o suficiente em detectar diferença entre os dois grupos. Isso pode ser justificado pelo fato de que uma maior distância entre os pontos de interseções em uma imagem de tamanho padrão interfere na sensibilidade do teste, logo, um maior número de pontos é capaz de estabelecer maior precisão, pois diminui os intervalos entre os pontos. O coeficiente de correlação aplicado, neste caso, além de avaliar as variações dos valores quantitativos de colágeno entre os grupos, foi importante para determinar como as variáveis se relacionavam entre si, no sentido de perceber se elas convergiam para a mesma direção de resultados³⁵.

Em concordância a esses achados, Bedoya et al.³³ (2019), com os resultados obtidos a partir da morfometria por contagem manual de pontos utilizando grades de 391, 588 e 792 pontos, identificaram que, na avaliação do colágeno tipo I, as grades de maior número de interseções não mostraram diferenças entre si (588 e 792 pontos), enquanto, para o colágeno tipo III, houve diferença, verificando-se, que a grade que melhor contabilizou o colágeno presente foi a de 792 pontos, se mostrando mais sensível.

Com base nos resultados da amostra total, independentemente dos grupos, as técnicas de contagem manual de 320 e 588 pontos relacionaram-se fortemente entre si, ao tempo que as análises entre 320 pontos e segmentação de cor e 588 pontos e segmentação de cor demonstraram correlação fraca sem relevância estatística, e fraca com significância estatística, respectivamente. Logo, infere-se, com base na amostra aqui analisada, que a técnica de segmentação de cor não se correlaciona com a técnica de 320 pontos, ou seja, elas estão em discordância.

Considerando que a interpretação dos resultados depende da magnitude das variáveis, no presente trabalho, apesar de terem sido observadas correlações fortes, moderadas e fracas entre as técnicas avaliadas, quando comparados os resultados intragrupos nem todos foram estatisticamente significantes.

Ao contrário dos resultados aqui expostos, Lima et al.⁵ (2022), quando compararam os resultados de dois tipos de análise acerca da presença de fibras colágenas na matriz extracelular, durante a cicatrização cutânea, em ferimentos fotobiomodulados, constataram que, independentemente do método de análise utilizado, seja semiquantitativo ou histomorfométrico, os resultados encontrados, em ambas as análises, demonstraram simi-

laridade. Ainda no estudo de Amenábar et al.³⁴ (2006), que utilizou tecido com tamanho de área semelhante ao do estudo aqui apresentado, os autores também evidenciaram que a técnica de segmentação de cor produziu resultados similares aos da contagem manual de pontos, que, nesse caso, utilizou uma grade com 320 pontos. Essas discrepâncias dos resultados desses autores em relação à presente pesquisa podem ser justificadas pela diferença no tamanho da amostra dos estudos.

No que se refere à adoção do melhor método, diferentemente de Bedoya et al.³³ (2019), segundo os quais, na segmentação de cor, é possível extrair a parcialidade da visão humana e a experiência do observador, no contexto da presente análise, percebeu-se, durante a execução da técnica, que houve uma dificuldade no estabelecimento de um padrão da análise da segmentação de cor. Durante a coleta dos dados, notou-se que, por vezes, o *software* apresentava demarcação errônea na determinação das áreas do colágeno, mostrando-se com baixa sensibilidade, enquanto que a técnica de contagem manual de pontos, por ser mais objetiva, pareceu ser mais eficaz em detectar esses locais, embora necessitasse de atenção e maior tempo para ser realizada. Ainda de acordo com Bedoya et al.³³ (2019), a padronização das configurações e a adaptação dos *softwares* utilizados são fundamentais para garantir a consistência e confiabilidade dos resultados obtidos.

De acordo com Amenábar et al.³⁷ (2003), os cálculos para determinação do quantitativo dos pontos de interseção das grades são importantes, pois reduzem o tempo de trabalho, a quantidade de imagens e proporciona uma boa confiabilidade dos resultados. Neste estudo, embora não tenham sido feitos os cálculos, a determinação de pontos foi baseada nos protocolos de Amenábar et al.³⁴ (2006) e Bedoya et al.³³ (2019). Outro fator crucial a ser considerado é a qualidade das fotomicrografias, uma vez que a presença de vieses pode prejudicar as análises. É importante garantir que as imagens estejam livres de dobras, artefatos indesejados e birrefringência dos pelos³³.

Importa destacar que o presente estudo possui algumas limitações, já que, embora calibrado, houve apenas um avaliador único, o que pode aumentar a subjetividade. Além disso, houve limitação no número das secções histológicas, utilizando-se material de arquivo de experimento anterior. Essa última limitação, entretanto, está em conformidade a Lei 11.794³⁸, que estabelece as regras de uso científico de animais em experimentação, no que diz respeito ao melhor aproveitamento da amostra animal já obtida anteriormente.

Considerando que a morfometria por contagem manual de pontos é amplamente reconhecida como um método padrão para a quantificação de estruturas, e que a segmentação de cor é uma ferramenta de análise de imagem simples e rápida³³, a seleção das técnicas deve levar em conta a disponibilidade do *software*, a experiência e a calibração do observador, bem como o tempo disponível para as análises. É importante desta-

car que todas essas técnicas geralmente proporcionam resultados satisfatórios na maioria dos casos.

CONCLUSÃO

Neste estudo, os achados destacam as correlações entre diferentes técnicas de avaliação de colágeno, especialmente entre a quantidade de colágeno avaliada pela técnica de contagem manual de 320 e 588 pontos, e indicam que a presença de lesão altera a quantidade de colágeno no tecido, sendo observado maior depósito no grupo com lesão, como era esperado.

Ainda que alguns resultados tenham se mostrado semelhantes entre as técnicas de 588 pontos e segmentação de cor, os dados mostram que a técnica de contagem manual com 588 pontos foi mais precisa na quantificação do colágeno em comparação com a segmentação por cor e pela técnica de contagem manual com 320 pontos, na análise de mucosa de ratos submetidos a radioterapia, e submetidos ou não à lesão ulcerada. Essas conclusões enfatizam a importância de serem selecionadas técnicas de avaliação do colágeno apropriadas, com base no contexto específico do experimento realizado, a fim de diminuir a subjetividade dos resultados.

REFERÊNCIAS

1. Kamrani P, Marston G, Arbor TC, Jan A. Anatomy, Connective Tissue. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls; 2023 [cited 2023 Jun 28]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538534/>
2. Marini G, Rinaldi JC, Damasceno DC, Felisbino SL, Rudge MVC. Alterações da matriz extracelular causadas pelo diabetes: o impacto sobre a continência urinária. Rev Bras Ginecol Obstet. 2014;36(7):328-33. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/SO100-720320140005014>
3. Hynes RO. Extracellular matrix: not just pretty fibrils. Science. 2009;27;326(5957):1216-9. doi:10.1126/science.1176009
4. Carvalho GM, Monteiro LFC, Wanderley RA, Nunes YCC, Silva JPB, Silva E. Suplementação oral de colágeno e seus efeitos na pele. Res Soc Dev. 2023;12(2):1-6. doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v12i2.40231>
5. Lima SS, Braitenbach BPF, Lima FQ, Marchionni AMT, Mendes CMC, Medrado ARAP. Análise quanti e semiquantitativa do colágeno no reparo tecidual – um estudo comparativo. Rev Ciênc Méd Biol. 2022;21(3):644-9. doi: <https://doi.org/10.9771/cmbio.v21i3.51916>
6. Wu M, Cronin K, Crane JS. Biochemistry, Collagen Synthesis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls; 2023 [cited 2023 Jun 29]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507709/>
7. Oliveira VM, Cunha MNCC, Nascimento TP, Assis CRD, Bezerra RS, Porto ALF. Colágeno: características gerais e produção de peptídeos bioativos – uma revisão com ênfase nos subprodutos do pescado. ActaFish. 2017;5(2):56-68. doi: 10.2312/ActaFish.2017.5.2.56-68
8. Bedoya SAO, Conceição LG, Vilorio MIV, Loures FH, Valente FL, Amorim RL, et al. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. Arq Bras Med Vet Zootec. 2016;68 (1):147-54. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-848>
9. Ruh AC, Fernandes D, Artoni RF, Favero GM. Inflamação: entre a

- regeneração e a cicatrização. *Ci Biol Saúde*. 2013;19(1):11-19. doi: 10.5212/Publ.Biologicas.v.19i1.0002
10. Oliveira IVP de, Dias RVC. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. *Acta Vet Brasilica*. 2012;6(4):267-71.
11. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Braz J Pharm Sci*. 2005;41(1):27-51
12. Ferreira ACD, Batista ALA, Catão MHCV. A atuação da laserterapia na angiogênese e no reparo tecidual. *Res Soc Dev*. 2021;10(3): e34610313334. doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13334>
13. Chhabra S, Chhabra N, Kaur A, Gupta N. Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS. *J Maxillofac Oral Surg*. 2017;16(4):403-23. doi: 10.1007/s12663-016-0880-z
14. Isaac C, Ladeira PRS, Rêgo FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Rev Med*. 2010;89(3/4):125-31.
15. Conceição TC, Sanches ACB, Freire TFC, Martins GB, Marques MVC, Dantas JBL. Acute Oral Manifestations in Patients Submitted to Radiotherapy in the Head and Neck Region: Literature Narrative Review. *J Health Sci*. 2021;23(1):92-8. doi: <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2021v23n2p92-98>
16. Souza ACL, Dantas JBL, Martins GB, Sanches ACB, Carrera M, Medrado ARAP. Prevalence of Fatigue in Patients with Head and Neck Cancer Submitted to Radio-Chemotherapeutic Treatment: Systematic Review. *Rev Bras Cancerol*. 2021;67(3): e-061202. doi: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2021v67n3.1202>
17. Silva JKMC, Rios TLB, Guedes CCFV. Cuidados odontológicos para pacientes submetidos a tratamentos antineoplásicos. *Res Soc Dev*. 2021;10(12): e99101220231. doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20231>
18. Bontempo PSM, Ciol MA, Meneses AG, Simino GPR, Ferreira EB, Reis PED. Radiodermatite aguda em pacientes com câncer: estimativa de incidência e severidade*. *Rev Esc Enferm USP*. 2021;55:e03676.
19. Ando SM, Fonseca EKUN, Frassei JS, Farias LPG, Neves YCS, Chate RCC, et al. O papel do radiologista na avaliação das alterações torácicas após radioterapia. *Radiol Bras*. 2021;54(4):265-9. doi: <https://doi.org/10.1590/0100-3984.2020.0070>
20. Floriano DF, Ribeiro PFA, Maragno AC, Rossi K, Simões PWTA. Complicações orais em pacientes tratados com radioterapia ou quimioterapia em um Hospital de Santa Catarina. *Rev Odontol Univ Cid*. 2017;29(3):230-6. doi: https://doi.org/10.26843/ro_unicidv2932017p230-236
21. Barros CSL, Rissi DR. Down the rabbit hole: a quick guide for histopathology description. *Pesq Vet Bras*. 2021;41:e06927. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-6927
22. Braz PH, Silva NR, Centenaro JR, Grunitzky L. Citopatologia: uma forma de diagnóstico em casos de tumores de pele. *Braz J Anim Environ Res*. 2020;3(2):334-44.
23. Brammer SP, Toniazzo C, Poersch LB. Corantes comumente empregados na citogenética vegetal. *Arq Inst Biol*. 2015;82:1-8. doi: 10.1590/1808-1657000192013
24. Quintana SBS, Carvalho FL, Silva GR, Campos MBT, Maia MCS, Araújo Júnior MLC, et al. Avaliação comparativa da qualidade da coloração de Papanicolaou em diferentes tempos de fixação em álcool etílico a 96%. *J Bras Patol Med Lab*. 2019;55(1): 44-56. doi: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20190006>
25. Montes GS, Junqueira LCU. The use of the picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86:1-11.
26. Street JM, Souza AC, Alvarez-Prats A, Horino T, Hu X, Yuen OS, et al. Automated quantification of renal fibrosis with Sirius Red and polarization contrast microscopy. *Physiol Rep*. 2014;2(7):1-9. doi: 10.14814/phy2.12088
27. Costa GM, Araújo SL, Xavier Júnior FAF, Morais GB, Silveira JAM, Viana DA, et al. Picosirius red and Masson's Trichrome staining techniques as tools for detection of collagen fibers in the skin of dogs with endocrine dermatopathologies. *Cienc Anim Bras*. 2019;20:1-10. doi: 10.1590/1089-6891v20e-55398
28. Santos FS, Ikeda FH, Barros MD, Duprat AC. Efeito da aplicação de cola de fibrina na cicatrização de pregas vocais após manipulação cirúrgica em coelhos. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2022;88(Suppl 1):S102-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjorlp.2022.10.014>
29. Coelho PGB, Conceição LG, Bedoya SAO, Souza MV, Vitoria MIV. Evaluation of dermal collagen stained with picosirius red and examined under polarized light microscopy. *An Bras Dermatol*. 2018;93(3):415-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20187544>
30. Ribeiro FAQ, Carvalho MFP, Pereira CSB, Tateno DA. Análise da concentração de colágeno tipo I e III presente no reparo de feridas tratadas com Mitomicina C em ratos. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo*. 2015;60:22-6.
31. Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, et al. Picosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem*. 2014;62(10):751-8. doi: 10.1369/0022155414545787
32. Lima IC, Wu SV, Silva LM, Freitas JJS, Carneiro FRO, Oliveira FRT. Quantificação de colágeno tipos I e III em lesões de pele de pacientes portadores de hanseníase. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2020;11: e202000259. doi: <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223202000259>
33. Bedoya SAO, Souza MV, Conceição LG, Vitoria MIV, Valente FL, Loures FH, et al. Quantificação do colágeno dérmico equino por duas técnicas morfométricas: contagem de pontos e segmentação de cor. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2019;71(3):761-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10487>
34. Amenábar JM, Martins GB, Cherubini K, Figueiredo MAZ. Comparison between semi-automated segmentation and manual point-counting methods for quantitative analysis of histological sections. *J Oral Sci*. 2006;48(3):139-43. doi: 10.2334/josnusd.48.139
35. Mukaka. Statistics corner: a guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J*. 2012;24(3):69-71.
36. Leite EP, Bombonato PP, Carneiro e Silva FO, Benedicto HG, Santana MIS. Morfometria do tecido conjuntivo do coração de equinos PSI. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2004;41:162-8.
37. Amenábar JM, Padilha DMP, Hugo FN, Fossati ACM. Uso da estereologia como método na pesquisa histológica. *R Fac Odontol*. 2003;44(1):62-5.
38. Brasil. Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. *Diário Oficial da União*. 2008 out 9;(196 Seção 1):1-4.

Submetido em: 13/11/2023

Aceito em: 19/11/2023