

A MORFOMETRIA GEOMÉTRICA E A “REVOLUÇÃO NA MORFOMETRIA” LOCALIZANDO E VISUALIZANDO MUDANÇAS NA FORMA DOS ORGANISMOS

Diego Astúa de Moraes

Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências
Universidade de São Paulo
dmoraes@ib.usp.br

Introdução

Desde o início do desenvolvimento da História Natural e, sobretudo depois do estabelecimento das idéias de Darwin, um dos principais focos da curiosidade científica está relacionado às variações de forma e tamanho observadas nos organismos na Natureza. Por que algumas folhas têm uma forma mais alongada que outras? Em que as conchas de determinados caramujos são mais arredondadas que as de outros? Como varia a forma do crânio entre um mamífero jovem e um adulto? Estas perguntas estão intimamente relacionadas às mais variadas questões, que vão desde o entendimento da ecologia e distribuição dos diferentes grupos taxonômicos até os processos evolutivos envolvidos no surgimento de espécies, passando pelos processos fisiológicos e energéticos próprios a cada uma destas. O naturalista sempre tentou encontrar formas de medir e quantificar estas diferenças na forma e no tamanho dos organismos e suas estruturas. A morfometria de um modo geral pode então ser definida como o estudo da forma e do tamanho, e de como estas duas variáveis se relacionam entre si. Assim, constitui uma ferramenta para entender a relação destas com diversas outras variáveis, como, por exemplo, a idade, o sexo, ou as relações históricas entre os organismos estudados. A idéia de “revolução na morfometria”, expressão “emprestada” de um artigo de F.J. Rohlf e L.F. Marcus do início da década de 90, está ligada a maneira de medir estas variações. A morfometria geométrica se propõe a ser uma metodologia que não somente permite a análise e a quantificação desta variação, mas permite também a visualização de forma gráfica e clara destas diferenças, ao contrário de diversos métodos morfométricos já estabelecidos e amplamente usados, agrupados aqui sob o nome de morfometria tradicional.

Morfometria tradicional e morfometria geométrica

O que se entende por morfometria tradicional é o estudo da variação e covariação de medidas de distância, sejam estas entre pares de pontos anatomicamente homólogos, ou entre pontos de tangência ou extremos de estruturas. Ou seja, é o estudo de como e quanto estas medidas variam, e de como e quanto estão relacionadas entre si. Os primórdios da biometria, de certa forma, se confundem com o início do desenvolvimento da estatística, através dos trabalhos de Karl Pearson (1857-1936), Francis

Galton (1822-1911), W.F.R. Weldon (1860-1906) e Ronald Fisher (1890-1962), por exemplo. Inicialmente, as primeiras abordagens ao estudo da variação da forma eram feitas através de comparações de várias medidas, uma a uma. Porém, notou-se que mesmo várias medidas que descreviam qualquer estrutura não eram suficientes para descrever a forma como um todo, já que os organismos são multidimensionais. Foi desta necessidade que surgiram todos os métodos multivariados usados atualmente, que levam em consideração, simultaneamente, os diferentes níveis de variação e covariação entre as medidas. Devido à crescente facilidade de acesso às técnicas computacionais, as técnicas multivariadas tradicionais já são amplamente usadas em estudos de ecologia, sistemática e evolução, e incluem técnicas bem estabelecidas, como Análise de Componentes Principais, Análise de Fatores, Regressões Múltiplas e Análises Discriminantes, entre outras.

O problema destes métodos tradicionais usando distâncias lineares é que, geralmente, não capturam muita informação sobre a forma do organismo como um todo, apesar de descreverem o padrão de covariação do todo das medidas, inclusive podendo identificar regiões com maior ou menor grau de covariação. Além disso, não levam em consideração o padrão de localização dos pontos no espaço. Muitas vezes estas medidas concentram-se em umas poucas dimensões ou direções e este grande número inicial de medidas é reduzido a umas poucas, que concentram a maior parte da variação existente. Geralmente, não é possível reconstruir a forma das espécies estudadas após as diferentes análises multivariadas. Ou seja, apesar de evidenciarem que existem diferenças por vezes significativas, não é possível uma representação gráfica da localização destas diferenças que são deduzidas das análises das matrizes geradas pelos métodos multivariados.

Uma nova abordagem morfométrica surgiu a partir do início dos anos 90. Esta nova metodologia, chamada de morfometria geométrica, abrange uma série de técnicas que visam descrever e representar a geometria das formas estudadas. Enquanto nas abordagens tradicionais a variação da forma é estudada através da covariação entre pares de medidas lineares, a morfometria geométrica é capaz de descrever e localizar mais claramente as regiões de mudanças na forma e sobretudo, de construir e reconstituir graficamente estas diferenças. Esta descrição pode ser feita através do estabelecimento de pontos anatômicos de referência em estruturas homólogas, ou ainda através da

análise do contorno de estruturas. Nas análises baseadas em pontos de referência, as coordenadas destes pontos, sejam em duas ou três dimensões, são as variáveis que capturam as informações sobre a geometria das estruturas estudadas. A vantagem do uso de coordenadas (em relação a medidas lineares, como as usadas na morfometria tradicional), é que estas incluem informação sobre suas posições relativas, e deste modo permitem a reconstrução da forma após as diversas análises uni- e multivariadas.

Vamos nos concentrar especialmente na morfometria geométrica baseada em pontos de referência. Para a análise de contornos (que alguns autores separam da morfometria geométrica propriamente dita), informações mais precisas podem ser encontradas na bibliografia sugerida. Vamos considerar um exemplo prático ao longo das explicações, de forma a clarear os conceitos. Neste caso, vamos comparar a forma do crânio de um roedor, *Calomys tener*, em três idades diferentes.

As funções de flexão de placas finas

Um dos métodos que têm tido maior aceitação e desenvolvimento recentemente é o uso de Funções de Flexão de Placas Finas (*Thin-plate Splines Functions*) para avaliar mudanças em pontos de referência. Esta função, baseada em um modelo físico de deformação de uma placa de metal de espessura desprezível e infinitamente grande, permite descrever as diferenças entre duas conformações de pontos como uma deformação contínua. Na prática, é como se tivéssemos duas placas de metal, e em cada uma marcássemos os pontos de referência das formas a serem

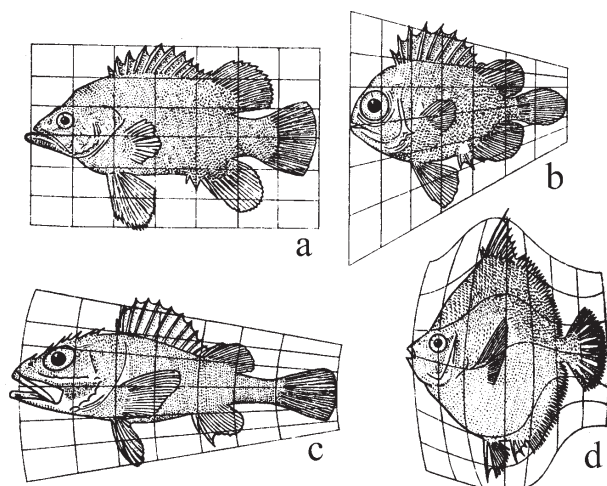


Figura 1. Grades de deformação propostas por D'Arcy Thompson para representar as variações na forma de 4 gêneros de peixe (a: *Polyprion*, b: *Pseudopriacanthus*, c: *Scorpaena*, d: *Antigonina*). Pode-se notar que as grades são aproximadas, já que determinadas estruturas nem sempre se encontram nas mesmas interseções das linhas das grades. Isso se deve ao fato que D'Arcy Thompson fazia estas grades visualmente, sem o uso de pontos de referência precisos, uma vez que as funções matemáticas para mapear e representar precisamente estas deformações não eram conhecidas. Retirados de Thompson, 1947.

comparadas (uma é a de referência, a outra a forma que se quer estudar). Então, entortamos a placa que tem os pontos da forma a ser comparada para que os pontos encaixem sobre os pontos presentes na placa da configuração de referência. A força feita para deformar a placa é uma quantificação das diferenças entre as formas. Assim, pode-se descrever quantitativamente as diferenças entre duas formas através de grades de deformação semelhantes àquelas descritas por D'Arcy Thompson na sua clássica obra, *On growth and form*, publicada pela primeira vez em 1915 (Fig. 1).

O Espaço da Forma de Kendall

Matematicamente, este método se baseia em um espaço matemático chamado Espaço da Forma de Kendall. Este é um espaço multidimensional curvo no qual cada forma (existente no mundo real) é representada por um ponto. No espaço da forma de Kendall, as distâncias são distâncias geodésicas (chamadas de Distâncias de Procrustes) e não distâncias lineares ou euclidianas. A distância entre dois pontos nesse espaço multidimensional representa portanto o quão distante duas formas estão, ou em outras palavras, o quão diferentes estas formas são. Deste modo, as Distâncias de Procrustes são, na prática, uma maneira de medir a diferença entre duas formas. Como todos os métodos estatísticos habituais pressupõem um espaço linear (*i.e.* distâncias euclidianas), estes não podem ser aplicados às Distâncias de Procrustes. Para isso, usa-se uma projeção do Espaço da Forma de Kendall para um espaço euclidiano tradicional (comparável, por exemplo, a uma projeção do globo terrestre em um mapa plano). Os pontos no espaço da forma podem ser projetados em um espaço linear, tangente ao espaço da forma, de modo que distâncias lineares entre pares de pontos correspondam a projeções das Distâncias de Procrustes originais. Visto que a variação das formas no mundo real, por maior que seja, ocupa sempre um espaço pequeno no Espaço da Forma de Kendall, as projeções no espaço linear podem ser consideradas boas estimativas das Distâncias de Procrustes.

Como o Espaço da Forma de Kendall é curvo, à medida que as formas se afastam do ponto de tangência entre os dois espaços, as projeções tendem a se aproximar no espaço linear. Portanto, é recomendável que o ponto de tangência entre os dois espaços seja definido como sendo a média de todas as formas observadas, de modo que esta forma média estivesse o mais equidistante de todas as formas estudadas e as variações fossem as menores possíveis. Esta forma média chamada de Configuração de Consenso corresponde à média de todas as formas, tendo sido retiradas as diferenças decorrentes de orientação, posição e tamanho. Trata-se somente de um artefato matemático que, portanto não tem e nem precisa ter nenhum significado biológico.

Eliminação do tamanho

Um dos primeiros passos da análise baseada em pontos de referência é a eliminação do efeito do tamanho (*scaling*), padronizando todas as configurações para uma mesma medida geral de tamanho. Assim, as diferenças observadas podem ser mais claramente atribuídas à forma. Esta transformação é feita com uma medida geral multivariada de tamanho, chamada de Tamanho de Centróide, e não em relação a uma única medida, como às vezes é feito usando, por exemplo, índices indicadores de tamanho. O centróide de uma nuvem de pontos é o ponto cujas coordenadas são as médias das coordenadas dos pontos da nuvem, em suma, um “ponto médio”. Assim, o Tamanho de Centróide corresponde à raiz quadrada do somatório dos quadrados das distâncias entre cada ponto de referência e o centro de massa, ou centróide. Portanto, quanto maior a configuração, mais longe estarão os pontos do centróide, e maior o Tamanho de Centróide. Este tamanho constitui um valor único, e é usado para redimensionar todas as configurações. Calcula-se o Tamanho de Centróide de cada indivíduo e estes são igualados. Podemos acompanhar esse processo com os crânios do roedor *Calomys tener*. Para isto foram tomadas fotografias do crânio em vista dorsal de indivíduos de idade conhecida. Neste caso, foram usados três crânios, um de 5 dias de idade, um de 40 dias de idade e um de 300

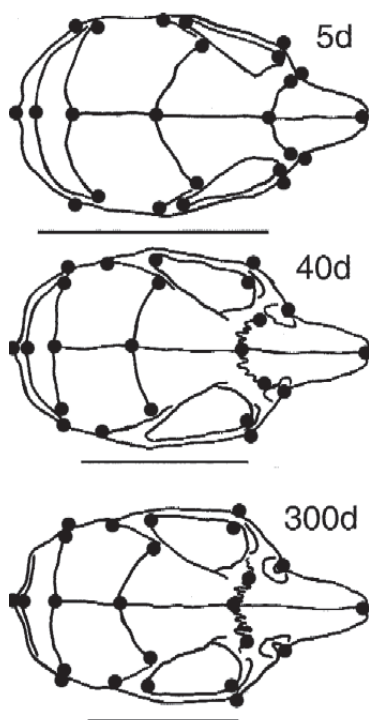


Figura 2. Crânios de indivíduos de *Calomys tener* (Rodentia, Sigmodontinae) de 5 dias, 40 dias e 300 dias, em vista dorsal, com os pontos de referência utilizados no exemplo. A barra representa 1cm.

dias de idade (Fig. 2). Para representar a forma destes crânios foram escolhidos 24 pontos de referência. Os pontos de referência foram colocados nos três crânios, usando o programa de digitalização de pontos TPSDig (este e todos os demais programas usados nesta análise podem ser

obtidos gratuitamente, ver ao final do texto). Neste mesmo programa é possível colocar um fator de conversão, para retirar as diferenças de tamanhos resultantes da distância entre o equipamento utilizado para obter as imagens e cada um dos indivíduos, antes de calcular o tamanho absoluto de cada um. Os Tamanhos de Centróide calculados encontram-se na tabela 1. Como pode ser visto, essa única medida de tamanho reflete o tamanho real dos indivíduos. Na figura 2, os crânios foram representados com tamanhos iguais para enfatizar as diferenças de forma (ou seja, igualamos seus Tamanhos de Centróide).

Tabela 1. Distâncias de Procrustes entre as três idades, e Tamanhos de Centróide para cada idade (entre parênteses).

Idade	5d (2.497)	40d (3.385)	300d (3.655)
5d	0	0,1459	0,1722
40d		7	0
300d		0	0,0723
			8
			0

A Configuração Tangente

Para calcular a Configuração de Consenso, é realizada uma Sobreposição Generalizada por Quadrados Mínimos (*Generalized Least-Squares Superimposition*). As Distâncias de Procrustes são calculadas como a soma dos quadrados das distâncias entre os pontos correspondentes das duas configurações. Estas distâncias constituem, como já dito, uma medida de proximidade neste espaço, e, portanto similaridade das formas analisadas. Esta sobreposição é feita através do seguinte processo iterativo (repetitivo): uma das formas é escolhida aleatoriamente (digamos, o indivíduo de cinco dias), e todas as demais são rodadas, transladadas e redimensionadas de modo que seus centróides se sobreponham, que seus Tamanhos de Centróide sejam iguais e que as Distâncias de Procrustes entre elas sejam minimizadas. A média de todas estas configurações é calculada, e o processo de rotação, sobreposição e redimensionamento são repetidos, sobrepondo as formas a esta média. Estas etapas são repetidas até que não seja encontrada uma diminuição significativa nas Distâncias de Procrustes entre as configurações. A configuração assim calculada é então chamada de Referência, Configuração Tangente, ou Configuração de Consenso. As demais formas são então comparadas entre si através desta configuração de referência. Mas como o próprio nome diz, esta forma de referência é somente o ponto de tangência entre os dois espaços, e representa a forma através da qual todas as outras serão comparadas. Como a variação de forma é sempre pequena o suficiente, pode-se também usar uma forma escolhida *a priori* sem que isto afete significativamente as aproximações no espaço tangente. Isto faz sentido em

estudos ontogenéticos, por exemplo, nos quais a configuração de referência pode ser um estágio inicial de crescimento (o que poderia ser feito aqui, comparando as formas de 40 e 300 dias à de 5), ou estudos filogenéticos, onde a configuração de referência pode ser um representante, ou a média de vários representantes de um grupo externo. No nosso exemplo dos roedores, o arquivo com as coordenadas dos três indivíduos foi usado para calcular a Configuração de Consenso e os Tamanhos de Centróide, no programa TPSRegrW.

Análise das deformações relativas

Matriz de Energia da Deformação e Deformações Principais

Um método que pode ser extremamente útil para descrever as mudanças na forma de um conjunto de organismos é a Análise das Deformações Relativas, que se baseia no uso dos parâmetros das Funções de Flexão de Placas Finas. Em termos matemáticos, a variação da forma pode ser repartida entre dois componentes, denominados uniformes e não-uniformes. Os primeiros representam mudanças generalizadas, enquanto os componentes não-uniformes representam variações localizadas. Por exemplo, uma deformação uniforme transforma uma esfera numa elipse ou um retângulo num paralelograma não-retangular (ou seja, todas as linhas paralelas da figura se mantêm paralelas antes e depois da transformação); já uma transformação não-uniforme seria a que transforma um retângulo num trapézio (as linhas que eram paralelas antes da deformação não mais o são após esta).

Resumindo o processo envolvido, a partir da Configuração de Referência (explicada anteriormente) é construída uma matriz com todas as distâncias entre os pares de pontos de referência utilizados. Essa matriz é chamada de Matriz de Energia da Deformação, já que a partir dela serão definidos os parâmetros necessários para realizar as deformações das grades. Esta matriz é decomposta de modo a gerar duas outras matrizes de valores particulares, chamadas em álgebra de matrizes uma matriz de autovalores e a matriz correspondente de autovetores. Essas duas matrizes são associadas (cada valor da primeira matriz está associado a um vetor da segunda).

Estes autovetores são chamados aqui de Deformações Principais (*Principal Warps*) e representam, simplificada e falando, os principais eixos de deformação possíveis para aquela configuração de pontos. É, no entanto, essencial lembrar que como as Deformações Principais são estabelecidas a partir das coordenadas da configuração de referência, estas simplesmente definem os principais eixos de deformações possíveis na *Configuração de Referência*. Para descrever as deformações que transformam a configuração de referência nas configurações originais, as coordenadas dos pontos de referência de cada indivíduo são projetadas nas Deformações Principais (ver

na seção seguinte). Cada uma dessas Deformações Principais tem um autovalor associado, e esses autovalores associados têm magnitude inversamente proporcional à escala das deformações e diretamente proporcional à quantidade de energia necessária para efetuar tal deformação. Ou seja, autovalores elevados estão associados a deformações principais que descrevem deformações localizadas, em pequena escala, enquanto autovalores baixos estão associados a deformações em larga escala. Na analogia da deformação das placas, isso explica por que é necessária mais energia para deslocar dois pontos próximos numa placa fina do que para deslocar dois pontos muito afastados. Os escores, resultantes das projeções de cada indivíduo nas Deformações Principais, descrevem o peso de cada deformação principal para transformar a configuração de referência na configuração destes indivíduos, e o conjunto destes escores forma a matriz de pesos, \mathbf{W} .

Deformações Parciais e Deformações Relativas

A projeção das coordenadas de cada indivíduo nas deformações principais gera vetores chamados de Deformações Parciais (*Partial Warps*), que são uma característica de cada indivíduo, assim como as Deformações Principais eram características da referência. Ou seja, os elementos na matriz \mathbf{W} descrevem cada exemplar como uma combinação linear das Deformações Principais. A Análise das Deformações Relativas equivale a realizar uma Análise de Componentes Principais sobre a matriz \mathbf{W} .

Os novos autovetores gerados deste modo são chamados de Deformações Relativas (*Relative Warps*), e estes descrevem os eixos ortogonais de maior variação da forma a partir das deformações parciais. Assim, é possível

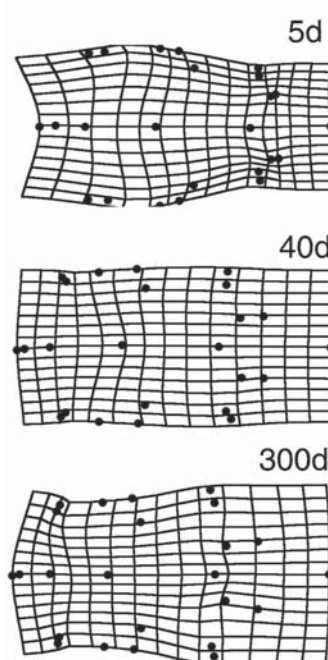


Figura 3. Grades de deformação para as três idades, usando como referência a Configuração de Consenso entre as três idades.

capturar e representar a maior parte da variação ao longo de alguns poucos eixos, reduzindo o número de dimensões sem perder a maior parte da informação. Ao contrário, porém, da Análise de Componentes Principais sobre medidas lineares, por exemplo, na Análise das Deformações Relativas é possível recuperar graficamente as grades de deformação de qualquer indivíduo em relação à referência, indivíduo este que é representado por um ponto no espaço delimitado pelas Deformações Relativas. Na nossa comparação entre as idades dos roedores, a Análise das Deformações Relativas permitiu recuperar as grades de deformação para as três idades (Fig. 3).

Como se pode ver, à medida que o crânio cresce, acontece um aumento relativo do rostró, ao mesmo tempo em que o tamanho relativo da caixa craniana diminui, e os arcos zigomáticos se alargam. As Distâncias de Procrustes indicam que as formas de 40 e 300 dias são mais semelhantes entre si que as de 5 e 40 dias, apesar da diferença em dias entre estes ser inferior. Isso indica que ocorrem mudanças muito mais importantes na forma do crânio na fase inicial do crescimento, e que em um pouco mais de um mês a forma do crânio já se assemelha bastante a forma final.

Apesar de parecer matematicamente complexo, na prática o método é de compreensão relativamente fácil. Recomenda-se, no entanto, algum conhecimento de álgebra de matrizes e estatística multivariada para dominar com mais confiança a metodologia. Informações sobre esse assunto podem ser encontradas na literatura especializada. Alguns exemplos e sugestões básicas encontram-se na bibliografia sugerida.

Onde conseguir mais informações?

Existem diversos livros lançados que reúnem os avanços na metodologia em morfometria geométrica. Uma lista extensa da bibliografia disponível pode ser encontrada na Internet, no *site* administrado pelo Prof. F. James Rohlf, da State University of New York at Stony Brook, um dos pioneiros no desenvolvimento da metodologia. No *site* (<http://life.bio.sunysb.edu/morph>) podem ser encontrados nomes dos principais livros já publicados, contatos com outros pesquisadores que utilizam Morfometria Geométrica em seus estudos, acesso a uma lista de discussão de morfometria e anúncios de eventos relacionados. O mais importante, contudo, é que neste *site* encontram-se disponíveis a grande maioria dos programas usados para realizar as análises morfométricas, desde a digitalização dos pontos de referência até a realização das análises finais. Todos estes programas são gratuitos, e constantemente atualizados. Além disto, existe agora disponível um livro texto em português, que reúne as principais informações necessárias e exemplos para a compreensão da metodologia (ver literatura sugerida), o que provavelmente servirá como um estímulo adicional para a divulgação desta metodologia, antes confinada a alguns livros de difícil obtenção, e com uma linguagem excessivamente técnica. Por fim, qualquer

informação adicional pode ser adquirida diretamente com o autor, para esclarecer qualquer dúvida do leitor.

Sugestões de leitura

- Bookstein, F.L. 1991. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press: New York. 435 pp.
- Corti, M.; Marcus, L.F. & Hingst-Zaher, E. 1998. *Proceedings of the Geometric Morphometrics in Mammalogy Symposium at the Euro-American Mammal Congress. Hystrix* (n.s). **10** (2).
- Manly, B.J.F. 1994. *Multivariate statistical methods - A primer*. 2nd ed. Chapman & Hall, London. 215 pp.
- Marcus, L.F.; Bello, E. & García-Valdecasas, A.. (eds.) 1993. *Contributions to morphometrics*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, Spain. 264 pp.
- Marcus, L.F.; Corti, M.; Loy, A.; Naylor, G.J.P. & Slice, D. E. (Eds.). 1996. *Advances in morphometrics*. NATO ASI Series. Series A, Life Sciences, v. 284. Plenum Press, NY.
- Monteiro, L. & dos Reis, S. F. 1999. *Princípios de morfometria geométrica*. Holos Editora. 188 pp.
- Rohlf, F.J. & Bookstein, F.L. (Eds.). 1990. *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop*. Special Publication. The University of Michigan Museum of Zoology, 2. University of Michigan Museum of Zoology, Michigan.
- Rohlf, F.J. & Marcus, L.F. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* **8**(4): 129-132.
- Thompson, D' A. W. 1917. *On growth and form*. Cambridge University Press, Cambridge. 346 pp.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em particular à Erika Hingst-Zaher e ao Prof. Leslie Marcus, por terem me iniciado e ensinado praticamente tudo que sei de Morfometria Geométrica, ao Prof. Rui Cerqueira por me fornecer ao longo desses últimos anos toda a infraestrutura necessária para aplicar a técnica, à Luciana Araripe por me ceder os crânios de *Calomys tener* usados no exemplo, e à Mariana Guenther pelas valiosas sugestões que permitiram tornar este manuscrito mais acessível e de mais fácil compreensão. Agradeço também as sugestões dos revisores. O financiamento referente a este trabalho veio de uma bolsa de Mestrado do CNPq e a uma bolsa de Doutorado da FAPESP (em curso) ao autor, além de financiamentos do CNPq e CAPES ao Laboratório do Prof. Rui Cerqueira.