

Santamaría-Solís, L.; Serna-Cuéllar, E.; Ingelmo-Ingelmo, I.
Aplicación de técnicas estereológicas para la cuantificación del tejido adiposo
Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana, vol. 39, núm. 1, 2013, pp. 74-81
Sociedad Española de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética
Madrid, España

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=365533933016>

Cirugía Plástica
Ibero-Latinoamericana

Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana,
ISSN (Versión impresa): 0376-7892
ciplaslatin@gmail.com
Sociedad Española de Cirugía Plástica,
Reparadora y Estética
España

Aplicación de técnicas estereológicas para la cuantificación del tejido adiposo

Quantification of the adipose tissue by stereology



Santamaría-Solís, L.

Santamaría-Solís, L.*, Serna-Cuéllar, E.**, Ingelmo-Ingelmo I.***

Resumen

El conocimiento de la estructura y función del tejido adiposo es fundamental no sólo por el papel que desempeña en el metabolismo lipídico y en enfermedades endocrinas como la diabetes, sino también por su importante misión como elemento estructural de soporte mecánico y de modelado del contorno orgánico (facial, por ejemplo); de ahí su relevancia en el campo de la Cirugía Plástica, Reparadora y Estética.

La cuantificación es un método que se practica desde los albores de la Histología. En el presente estudio nos referiremos exclusivamente a las metodologías estereológicas, herramientas libres de sesgo que aprovechan propiedades geométricas intrínsecas de las estructuras a cuantificar. En esencia, la estereología consiste en un conjunto de métodos morfométricos que obtienen datos cuantitativos tridimensionales a partir de elementos bidimensionales, utilizando propiedades geométricas intrínsecas a la estructura que se está estudiando.

Describimos las metodologías estereológicas que conducen a la estimación no sesgada de la fracción de volumen de tejido adiposo en relación con el espacio de referencia, número relativo de adipocitos, y longitud relativa del lecho microvascular que irriga el tejido adiposo.

Abstract

The knowledge of the structure and function of the adipose tissue is not only relevant in relation with its role played in the lipidic metabolism or in endocrine disorders as diabetes. The fat tissue plays also an important role as mechanical support and in the modelling of organic contours (facial, for example); therefore its interest in the field of the Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery.

The quantitative methodology has been employed from the very beginning of the histological science. The present study deals with the stereology as a set of unbiased tools that employ intrinsic geometrical features of the objects to quantify. In short, the stereology consists in a pool of morphometric methods that obtain tridimensional information from bidimensional elements (the tissue sections) using the geometrical characteristics of the structures of interest.

We describe some stereological procedures leading to the unbiased estimate of: volume fraction of the adipose tissue, the relative number of adipocytes, and the relative length of microvessels of the adipose tissue.

Palabras clave Adipocitos, Estereología, Disector óptico.

Código numérico 19-104-15841

Key words Adipocytes, Stereology, Optical disector.

Numeral Code 19-104-15841

* Catedrático de Histología, Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. España.

** Médico Adjunto de Cirugía Plástica y Reparadora, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España.

*** Médico Adjunto de Anestesia y Reanimación, Departamento de Anestesiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España.

Introducción

El conocimiento de la estructura y función del tejido adiposo es de fundamental interés, no sólo por el papel que desarrolla en el metabolismo lipídico y en enfermedades endocrinas tales como la diabetes, sino también por su importante misión como elemento estructural de soporte mecánico y de modelado del contorno orgánico (facial, por ejemplo) (1); de ahí su relevancia en el campo de la Cirugía Plástica, Reparadora y Estética.

Aunque la ciencia histológica fue inicialmente descriptiva, desde siempre se vio la necesidad de comprender la realidad mediante “figuras y movimientos” (2). Pronto fue necesario pasar de la descripción semicuantitativa a la estimación propiamente cuantitativa, que siempre es de naturaleza estadística, ya que habitualmente sólo se tiene acceso a una porción de la población objeto de estudio (una muestra), ya sean neuronas, próstatas, biopsias o animales de experimentación. Esto es plenamente aplicable en el caso del tejido adiposo (3,4).

La cuantificación es una metodología que se viene practicando desde los albores de la Histología. En el presente estudio nos vamos a referir en exclusiva a las metodologías estereológicas como herramientas libres de sesgo que aprovechan propiedades geométricas intrínsecas de las estructuras a cuantificar.

En general se plantean cuatro tipos de propiedades físicas susceptibles de cuantificación morfológica:

- Tamaño: ya sea de poblaciones celulares (número absoluto, densidad numérica) o volúmenes celulares, de compartimentos histológicos, de órganos, etc.
- Forma: irregularidad nuclear, factores de forma, contornos nucleares o celulares.
- Topología: relaciones de distancia entre elementos, orientación, posición.
- Función: toda cuantificación morfológica tiene que dar razón en última instancia de la función, normal o patológica y plantear correlaciones histofisiológicas.

En este trabajo describiremos las metodologías estereológicas que conducen a la estimación no sesgada de: la fracción de volumen de tejido adiposo en relación con el espacio de referencia, densidad numérica (número de células por unidad de volumen) de adipocitos, y de la longitud relativa del lecho microvascular que irriga el tejido adiposo.

Métodos de cuantificación histológica

Muchas técnicas cuantitativas “clásicas” (métodos planimétricos, morfométricos, etc.) han sido útiles para un mejor conocimiento de la estructura celular y tisular. Sin embargo, con mucha frecuencia, no están libres de errores sistemáticos (sesgo) o precisan asumir geometrías particulares para las estructuras objeto de estudio (convertir los núcleos en esferas o en elipsoides), lo cual conlleva también posibles sesgos en la estimación (5,6).

Por ello, nos referiremos exclusivamente a las metodologías estereológicas, que se presentan como herramientas libres de sesgo que aprovechan propiedades geométricas intrínsecas de las estructuras a cuantificar.

Debemos, por tanto, definir qué se entiende por estereología: se trata de un conjunto de métodos morfométricos que obtienen datos cuantitativos tridimensionales (3D) a partir de elementos bidimensionales (2D), utilizando propiedades geométricas intrínsecas a la estructura que se está estudiando. La estereología se relaciona con la realización de estimaciones cuantitativas de características geométricas del objeto de interés (número de partículas, longitudes, superficies, volúmenes) (5).

Relaciones entre el mundo real y el mundo histológico

Cuando se efectúa un corte a través de estructuras tridimensionales (L3) se originan perfiles o transecciones bidimensionales (L2); una estructura 3D compleja puede generar varias transecciones. Las estructuras bidimensionales en los cortes originan perímetros (unidimensionales, L1). Las estructuras unidimensionales o longitudes, en el corte, generan elementos adimensionales (puntos, L0), es decir eventos contables (no mensurables). Resumimos esto en la Tabla I.:

De dicha tabla se desprende que el muestreo de una estructura tisular tridimensional mediante la obtención de cortes (bidimensionales, si despreciamos su grosor), opera una reducción de una dimensión sobre todos los elementos topológicamente reconocibles en dicha estructura.

En qué consiste la estimación estereológica

La esencia de la estimación estereológica consiste en producir el encuentro al azar de una sonda de medida (puntos, líneas, planos o volúmenes) con la característica geométrica del tejido que deseamos evaluar; de esta intersección se genera un evento (impacto) que siempre es cero-dimensional (Fig. 1).

Definiciones de interés en estereología

1. El espacio de referencia

Es el ámbito al que se refieren las estimaciones, usualmente un volumen, aunque a veces es útil referirlas a un área, por ejemplo si estamos evaluando número de adi-

Tabla I.
Suspensión celular (EU/ml).

Mundo real (3D)	Sección (2D)
Volumen (L^3) →	Transecciones (L^2) (pueden ser múltiples)
Superficie (L^2) →	Perímetro (L^1)
Longitud (L^1) →	Evento contable (L^0)

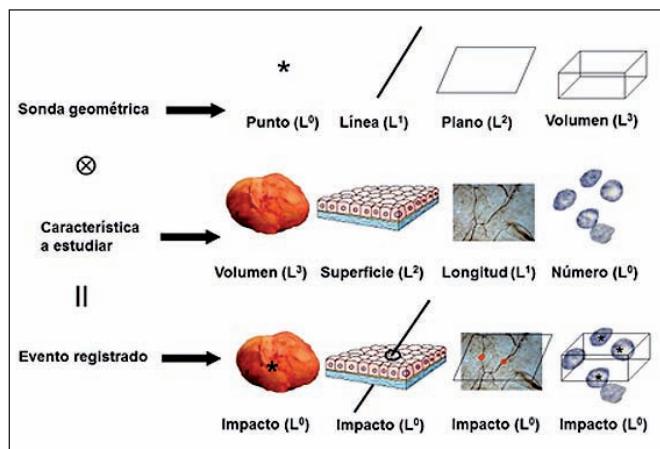


Fig. 1. Representación de la intersección de diversas sondas estereológicas, L^0 a L^3 , (puntos, líneas, planos y volúmenes) con las características geométricas a estimar en estructuras histológicas (volúmenes, superficies, longitudes y número de elementos). El evento registrado en la intersección de la sonda y el objeto, es siempre un impacto (L^0).

pocitos, se puede obtener una información fisiológica relevante si se refieren al área de superficie del endotelio vascular; a longitudes, como cuando evaluamos el número de células endoteliales por unidad de longitud de membrana basal del capilar, e incluso se puede tomar como espacio de referencia de una población celular respecto a otra población celular relacionada con la anterior. Puede ser interesante, por ejemplo, contar el número de adipocitos que expresan leptina (7) y referirlo al número total de adipocitos (leptina positivos y leptina negativos) del tejido adiposo en cuestión.

El espacio de referencia debe ser considerado como la *unidad fundamental de muestreo* (8,9). Definir ésta es siempre crucial en cualquier experimento. Por ejemplo, no es lo mismo referir el número de neuronas de la corteza cerebral al volumen ocupado por el córtex, o al volumen de todo el encéfalo; la densidad neuronal variará ostensiblemente con la elección de uno u otro espacio de referencia.

Con frecuencia en estereología se emplean estimaciones que son ratios o proporciones entre un estimador y otro que se puede considerar el espacio de referencia (2). Estas estimaciones se suelen denominar densidades, en analogía al concepto de densidad física que es una proporción entre el peso de una sustancia y el volumen que ocupa. Para la notación de estos estimadores relativos se sigue el convenio de colocar como subíndice el espacio de referencia. Así tendremos:

- Densidad numérica: número de células por unidad de volumen (N_V).
- Densidad de volumen: fracción de volumen que ocupa un elemento dentro de un volumen de referencia (V_V).
- Densidad de longitud: longitud de un elemento lineal por unidad de volumen (L_V).
- Densidad de área: superficie de una estructura por unidad de volumen) (S_V).

2. Sesgo

El sesgo es la desviación de los valores estimados en relación con los valores reales de una determinada población (2,5-10). Puede ser de dos tipos:

- a. Sesgo en el muestreo: cuando no todos los elementos de la población objeto de estudio tienen la misma probabilidad de ser elegidos (el muestreo no se ha efectuado al azar). Por ejemplo, si queremos estimar el volumen celular en un determinado tejido, y el sistema para elegir las células a medir escoge con más probabilidad los elementos más grandes.
- b. Sesgo sistemático: desviación constante de la medida obtenida con relación al valor real (error sistemático) debido a:
 - I. Defectos en el observador.
 - II. Defectos en la sonda de medida.
 - III. Defectos en el método de medida.

Un ejemplo típico de sesgo sistemático es el originado por errores en la calibración de la sonda; por ejemplo, cuando nos equivocamos al hacer una transformación de aumentos al trabajar sobre una microfotografía. Otro ejemplo es el sesgo derivado de asumir formas geométricas elementales para diversos elementos celulares, con objeto de aplicar fórmulas geométricas sencillas para estimar volúmenes. Cuando “reducimos” la forma de un núcleo por ejemplo, a un elipsoide, estamos introduciendo unos factores arbitrarios que pueden sistematizar desviaciones en la estimación de la medida del tamaño de ese núcleo.

3. Imprecisión

No se debe confundir con el sesgo. No es un error sistemático, sino el resultado de la variabilidad o dispersión de los datos en torno al valor real. Es una consecuencia de que toda evaluación estereológica es una evaluación estadística con un “ruido” en torno al valor real; ese ruido se puede estimar mediante estadísticos del tipo de la varianza (2). Puede ser debida a:

- a. Variabilidad biológica: es la variabilidad interindividual, intrínseca a la estructura de la población. No se puede reducir, su estimación proporciona datos valiosos acerca de la estructura y comportamiento de la población que estamos estudiando.
- b. Muestreo insuficiente.
- c. Imprecisión de la sonda de medida.

El muestreo en estereología

La metodología estereológica es fundamentalmente estadística. Extrae datos de grupos de células, tejidos, etc., que se pretende representen a la población real objeto de interés. Esos colectivos son por tanto muestras en sentido estadístico. El muestreo presenta diversos niveles: hay que seleccionar un grupo de animales, en cada animal hay que extraer el órgano objeto de estudio, pero ese órgano no puede analizarse en su totalidad, sino que

hay que muestrear unas porciones que una vez fijadas, frecuentemente se vuelven a muestrear para obtener bloques que se incluyen, se cortan (nuevo proceso muestral, lo que además opera una reducción de dimensiones 3D → 2D). Cada corte no se suele estudiar exhaustivamente, de nuevo; hay que muestrear campos, sobre los cuales o incluso sobre una fracción de los cuales se efectúa finalmente el estudio cuantitativo. La exigencia de todo el proceso es que se preserve la aleatoriedad desde el principio hasta el final, para que las mediciones reflejen la realidad que acontece en la población de interés.

Aunque en la metodología estadística se pueden emplear muchos tipos de muestreo (2,5,8,9,11), nos interesa señalar 2 tipos esenciales de amplia aplicación en estereología:

- Muestreo aleatorio uniforme: todas las muestras (por ejemplo: animales, cortes, campos) tomadas de una población, tienen la misma probabilidad de aparición (Fig. 2). El ejemplo más sencillo sería el elegir los objetos muestrales a base de asignarles el número de una papeleta sacada de un bombo de lotería.

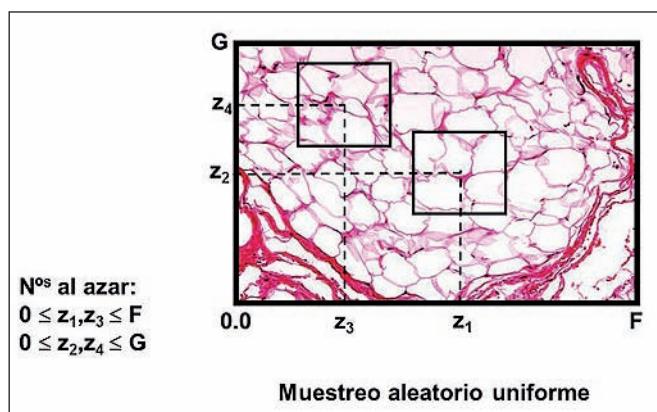


Fig. 2. Muestreo aleatorio uniforme de campos sobre un corte de tejido adiposo. Se eligen al azar los números Z_1-Z_4 , comprendidos en el rango fijado para los ejes de coordenadas que sitúan la región a muestrear, en el caso de la imagen de 0 a F para el eje X y de 0 a G para el eje Y. Estos números definen coordenadas aleatorias que fijan el centro de los campos muestreados.

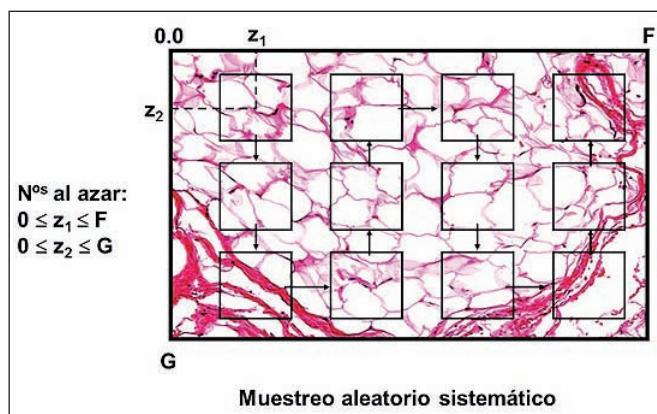


Fig. 3. Muestreo sistemático con comienzo al azar sobre una sección de tejido adiposo. El comienzo viene establecido por las coordenadas aleatorias fijadas por Z_1 y Z_2 . El primer campo obtenido aleatoriamente se desplaza barriendo todo el corte mediante un recorrido en meandros, la distancia entre campo y campo se establece sistemáticamente.

- Muestreo aleatorio sistemático: es un muestreo sistemático con comienzo al azar. La primera muestra se obtiene aleatoriamente y las siguientes mediante una fracción de muestreo (por ejemplo, uno de cada tres cortes seriados). Conserva la aleatoriedad del muestreo uniforme y es más eficiente (12) (Fig. 3).

ESTIMACIONES ESTEREOOLÓGICAS UTILIZADAS EN TEJIDO ADIPOSO

Fracción de volumen

Definamos primero lo que se entiende por fracción de volumen (densidad de volumen). Dado un volumen de referencia (por ejemplo, la hipodermis de una determinada región), la fracción de volumen (V_V) ocupada por el tejido adiposo en esa región, igual a la razón entre el volumen del tejido adiposo y el volumen de la hipodermis: $V_{Vad} = Vad / V_{Hipod}$. Este parámetro estereológico es útil para estimar el tamaño de un compartimento en relación al tamaño total del órgano y se puede expresar en porcentaje del espacio de referencia, lo cual puede ser de gran interés a la hora de evaluar la supervivencia de autoinjertos de tejido adiposo (3,13).

Para medir la fracción de volumen, basta estimar la fracción de área equivalente, es decir $A_{Ad} = Aad / A_{Hipod}$, ya que según el principio de Delesse (9,10): $V_V = A_A$ (Fig. 4). Además, tampoco es necesaria la medición de las áreas correspondientes ya que un retículo de puntos es una sonda geométrica útil para estimar fracciones de áreas; sobre un corte de tejido muestreado al azar; el retículo evalúa el número de puntos que caen sobre todo el corte (área de referencia) y sobre el compartimento a estudiar (por ejemplo, los adipocitos). Aplicando también el principio de Delesse, la razón entre los puntos es equivalente a la razón entre las áreas y a la razón entre los volúmenes (Fig. 5).

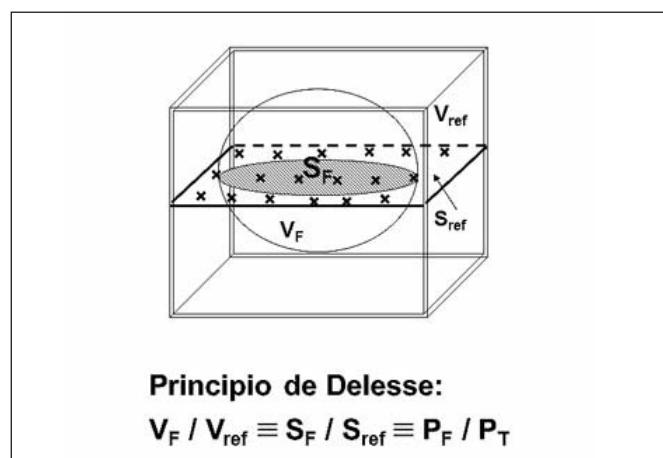


Fig. 4. Principio de Delesse: Sea un objeto de volumen V_F incluido en un volumen de referencia V_{ref} , si se practica un sección (S_F) de dicho objeto, esa sección aparecerá incluida en la correspondiente sección del espacio de referencia S_{ref} . Si se aplica un retículo de puntos sobre la sección, unos puntos caerán sobre S_F (P_F) y otros sobre S_{ref} (P_{ref}) se tiene que: la proporción entre P_F y P_{ref} , es idéntica a la porción entre S_F y S_{ref} y entre V_F y V_{ref} .

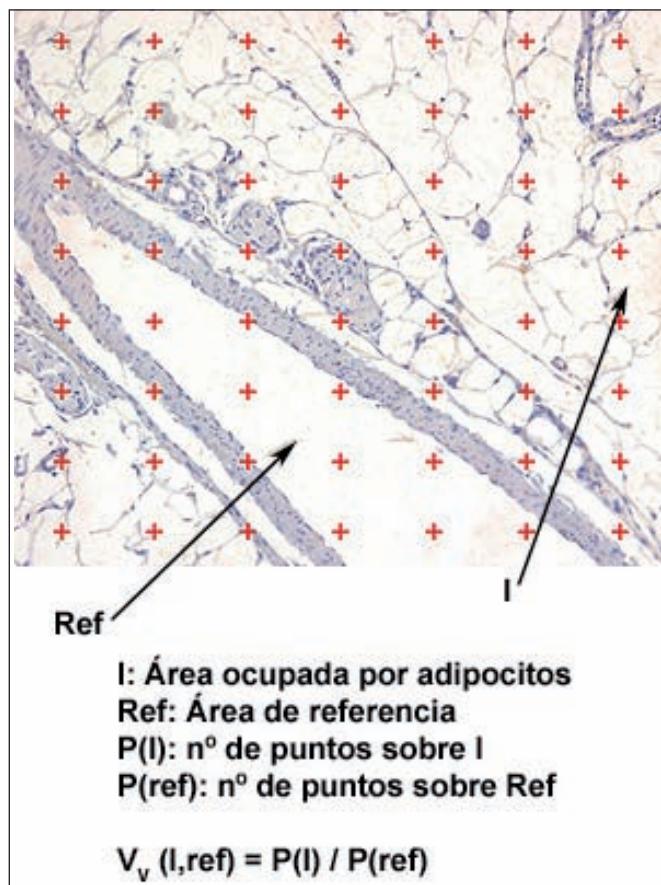


Fig. 5. Aplicación del principio de Delesse para el cálculo de la fracción de volumen ocupada por los adipocitos (I), en relación con el espacio de referencia considerado como adipocitos más estroma conjuntivo (ref).

Recuento de adipocitos

La evaluación del número de células en términos relativos (densidad celular o número de células por unidad de volumen) o en términos absolutos (número de células por órgano), es esencial en numerosos estudios morfológicos (6); nos puede interesar cómo cambia el tamaño de la población de adipocitos, a lo largo del desarrollo, en presencia de una determinada patología, tras un tratamiento concreto, tras el implante de grasa en una determinada región (3), etc. De modo genérico podemos hablar de recuento de partículas.

Entendemos por partícula cualquier elemento tisular discreto que se puede distinguir sin ambigüedad; habitualmente nos referiremos a células o a núcleos. En el caso de la célula adiposa, la unidad de recuento más adecuada será el núcleo, debido al gran tamaño que habitualmente presenta el citoplasma.

Se debe hacer hincapié en la tridimensionalidad del elemento celular objeto del recuento. El que los objetos a contar tengan un volumen y estén incluidos en un espacio de referencia 3D, implica que un simple recuento de sus perfiles bidimensionales muestreados por un corte no se corresponde con la cantidad real de las estructuras 3D, que es lo que nos interesa; es más, no tiene sentido ni estereológico, ni biológico, la estimación de número de perfiles por unidad de área, a pesar de que aún se encuentran en la literatura científica estudios que evalúan

cantidades celulares en estos términos. Incluso la estimación de la densidad numérica (células por unidad de volumen), con ser estereológicamente correcta, puede llevarnos a conclusiones erróneas acerca de la cantidad celular si no conocemos el tamaño del espacio de referencia y cómo varía éste en los distintos avatares del experimento. Así, un incremento de la densidad celular puede que no se deba a un aumento real del número absoluto de células, sino a una “contracción” del volumen que las contiene.

Requerimientos para el recuento no sesgado de partículas

El requerimiento para un recuento no sesgado de partículas consiste en elegir un atributo de la partícula tal que se pueda asignar una y sólo una vez a cada partícula presente (por ejemplo, el núcleo para células mononucleadas) y registrarla la primera vez (y sólo esa) que aparece en el volumen de referencia.

No se puede contar en secciones únicas o en conjuntos de secciones independientes (2,5). Hay que definir un volumen de referencia (por ejemplo, “celdilla unidad”) delimitado por dos secciones físicas u ópticas paralelas entre sí y separadas por una distancia prefijada. Este par de secciones “ligadas” definen una sonda estereológica tridimensional que denominaremos disector (físico u óptico). No nos ocuparemos aquí del disector físico (6), que utiliza un par de cortes seriados de espesor conocido y con una separación intercorte fija; sobre ese par de cortes dependientes se hace el recuento siguiendo unos determinados criterios de exclusión e inclusión (por ejemplo se excluye del recuento la partícula que aparece en ambas secciones). Vamos a centrar el método en el denominado disector óptico (2,5) que describimos a continuación.

Material y Método

El disector óptico

El disector óptico consiste en una sonda tridimensional o celdilla unidad delimitada por dos planos ópticos de enfoque del tejido y con unos bordes y caras de exclusión-inclusión destinados a evitar sobre o infrarecuentos. La aplicación del disector óptico se fundamenta en la “*unbiased brick-counting rule*” propuesta por Howard y col. en 1985 (5).

Consiste en una celdilla unidad, denominada por estos autores “ladrillo” (*brick*), delimitada por 3 planos de inclusión y 5 superficies prohibidas (Fig. 6). Una partícula se cuenta si está totalmente contenida en la celdilla o si corta alguno de los planos de inclusión y no toca ninguna de las superficies prohibidas.

Para fijar las ideas acerca del disector óptico, veamos con más detalle la celdilla de la Figura 6. Si sepáramos sus 6 caras, cada una de ellas aparecerá delimitada por lados de inclusión o exclusión en 2D. Son elegibles para recuento los núcleos que:

- Se encuentren en el interior de la celdilla sin tocar ningún borde o cara.

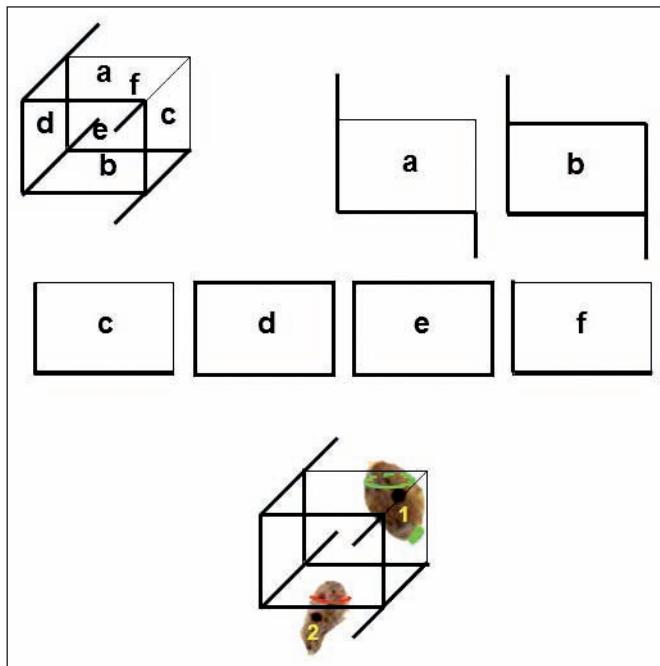


Fig. 6. Celdilla insesgada “desmontada” para ver las caras y bordes de inclusión / exclusión. Los bordes de exclusión y sus prolongaciones (hasta el infinito) fuera de la celdilla se representan en trazo grueso, a: cara superior; b: cara inferior; c, d, e, f, caras laterales. Son elegibles para recuento los núcleos que: a) se encuentren en el interior de la celdilla sin tocar ningún borde o cara; b) estando en el interior o en el exterior de la celdilla toquen caras o bordes permitidos. Se entiende que una cara prohibida es aquella delimitada completamente por trazos gruesos, por ejemplo la cara inferior b, o las caras laterales d y e. Así el núcleo 1 sería contado pues toca las caras a y f, y el núcleo 2 no, ya que toca la cara b.

b) Estando en el interior o en el exterior de la celdilla, toquen caras o bordes permitidos.

En la Figura 6, una cara prohibida es aquella delimitada completamente por trazos gruesos, por ejemplo, la cara inferior b, o las caras laterales d y e. Así el núcleo 1 se contaría, pues toca las caras a y f, y el 2 no, ya que toca la cara b.

Ejemplo práctico de recuento mediante el disector óptico

Aplicaremos la sonda del disector óptico para el recuento de adipocitos en un campo muestreado (Fig. 7a): La unidad de recuento será el núcleo del adipocito. El disector óptico es en realidad un espacio tridimensional, delimitado por arriba, por un plano focal donde se inserta el retículo no sesgado del disector (Fig. 7b), con un área conocida (en μm^2) y unos bordes de exclusión (de color rojo en la figura) que siguiendo la convención de Sterio (14), permiten excluir del recuento a todo núcleo que toque esos bordes (Fig. 7c), ya esté dentro o fuera del área delimitada por el retículo, y unos bordes de inclusión (de color verde en la figura), que prescriben la inclusión de cualquier partícula que los toque, independientemente de que se encuentre fuera o dentro del área del disector. Por supuesto, se incluyen en el recuento todas las partículas que no toquen ningún borde y estén dentro del área del disector.

La tercera dimensión de la sonda viene determinada por la distancia h (en μm) entre los dos planos focales

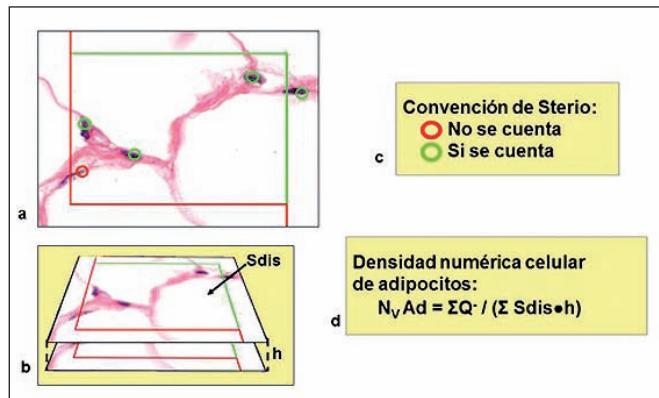


Fig. 7. En la imagen (a) se observa superpuesto el retículo del disector, en trazo verde los bordes de inclusión y en rojo los de exclusión, sobre un plano focal de tejido adiposo. Los núcleos con un círculo verde son los incluidos, los núcleos con un círculo rojo son los excluidos según la convención de Sterio. En (b) se esquematiza el paralelepípedo resultante de la disposición de dos planos focales paralelos (con área S_{dis}) separados por una distancia h . En (c) se enuncia la convención de Sterio. La densidad numérica celular de adipocitos (d) se obtiene dividiendo el sumatorio de núcleos incluidos ΣQ^- por el total de volumen tisular explorado: el sumatorio de todos los volúmenes de disector ($S_{\text{dis}} \cdot h$) muestreados.

(Fig. 7b); también se sigue un criterio de exclusión a lo largo de la profundidad del disector, de modo que no se cuentan las partículas que aparecen enfocadas en uno de los planos ópticos (por ejemplo, el superior), se incluyen en el recuento todas las restantes que se muestran enfocadas a lo largo del recorrido de h , incluidas las que aparecen en foco en el plano óptico inferior. Por convención, a las partículas elegibles para recuento se las designa por Q^- .

La densidad numérica de adipocitos (número de células por unidad de volumen) vendrá expresada por la fórmula (Fig. 7d):

$$N_v Ad = \Sigma Q^- / (\Sigma S_{\text{dis}} \cdot h)$$

Donde:

$N_v Ad$ = densidad numérica de adipocitos

ΣQ^- = número total de núcleos elegibles contados

ΣS_{dis} = área total de los dissectores muestreados

h = altura del disector (distancia entre los dos planos focales)

Estimación de la densidad de longitud de microvasos en tejido adiposo

El tejido adiposo es una estructura abundantemente vascularizada; la irrigación vascular juega un papel importante en el mantenimiento y funcionalidad del adipocito (15). Para cuantificar la microvascularización se utiliza habitualmente un estimador denominado genéricamente “densidad de microvasos” (16). Sin embargo, la estimación estereológica de la longitud de microvaso por unidad de volumen del espacio de referencia (L_v) es más segura y libre de sesgo (17,18) que la densidad de microvasos, (*microvessel density*, MVD), profusamente empleada en la mayoría de los estudios revisados (16,19,20).

Existen dos razones fundamentales para preferir la L_v a la MVD para cuantificar el tamaño del lecho micro-

vascular. La primera es que, cuando se emplea la MVD es habitual identificar ese parámetro con el número de vasos por unidad de área; sin embargo, es erróneo utilizar estimaciones por unidad de área, pues no es posible contar vasos en secciones, que son planos bidimensionales (2D), ya que los vasos son estructuras tubulares o lineales sumergidas en un espacio tridimensional (3D). Tampoco es correcto hablar de recuento de vasos, ya que las estructuras vasculares forman un continuo (lecho o red microvascular) y por tanto no son numerables. Realmente lo que estima la MVD son perfiles de microvasos, es decir, secciones de vasos, pero no vasos enteros. Además, cuando se cuentan dos secciones vasculares muy cercanas, es muy probable que las dos no sean de vasos diferentes, sino que pertenezcan al mismo vaso cortado dos veces.

Por otro lado, el número de perfiles de una estructura lineal, registrado en un plano 2D y que “vive” en un espacio 3D es, de hecho, la estimación de la longitud de dicha estructura dada por la expresión: $2 \cdot (\text{número de perfiles contados} / \text{área de la sección})$. Realmente ésto es la densidad de longitud de la estructura lineal. Los autores que aplican la MVD para estimar el “número de vasos por unidad de área” están en realidad subestimando la densidad de longitud, pues L_v es igual a $2 \cdot \text{MVD}$ (18).

Ejemplo práctico de la estimación de la densidad de longitud vascular en tejido adiposo

Dado que las estructuras vasculares son elementos lineales anisotrópicos, y que la estimación de su longitud puede verse fuertemente influida por su orientación en el espacio, las piezas de tejido adiposo a evaluar se deben

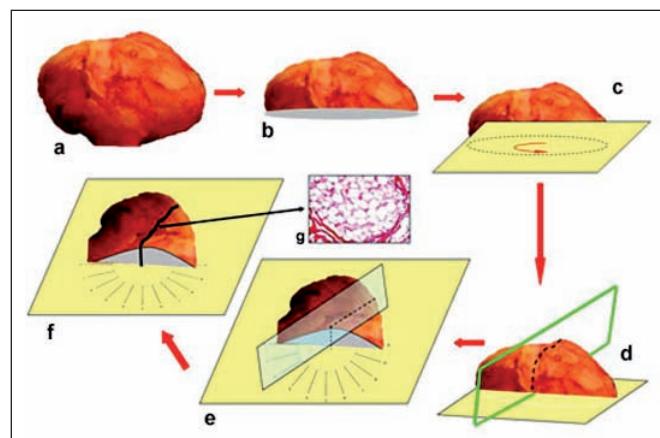


Fig. 8. En la imagen (a) se observa un lipoma que va a ser muestreado mediante un protocolo IUR (*uniform random sampling*). Se comienza seccionando la pieza por un plano arbitrario (b). A continuación una de las mitades del lipoma se coloca sobre una superficie plana y se rota al azar (c); posteriormente se efectúa una sección en un plano perpendicular a la superficie de apoyo (d); la superficie de corte obtenida se coloca apoyada sobre un plano que contiene un reloj orientador de Mattfeldt (e), que consiste en un círculo dividido por una serie de 10 diámetros igualmente espaciados y numerados de 0 a 9; se escoge un número al azar entre 0 y 9, por ejemplo, el 6. A continuación se efectúa un nuevo corte según un plano perpendicular al reloj de Mattfeldt y orientado según el diámetro numerado como 6. La superficie resultante se apoya de nuevo sobre el reloj de Mattfeldt (f) y se repite el proceso. Los cortes histológicos obtenidos a partir de las rodajas producto de las secciones indicadas (g) son cortes IUR.

seccionar siguiendo un protocolo de muestreo aleatorio isotrópico y uniforme (*isotropic uniform random*: IUR) (8), para asegurar un encuentro isotrópico entre el tejido y la sonda para la estimación de la longitud de los microvasos (9,18). El protocolo de realización de secciones IUR se esquematiza en la Fig. 8.

Las microestructuras biológicas como capilares, túbulos y axones, pueden considerarse a efectos prácticos como elementos lineales. Estos elementos se pueden evidenciar fácilmente mediante inmunotinción del endotelio para el Factor de Von Willebrand (Factor VIII), un marcador específico del endotelio de los vasos sanguíneos (19). El atributo estereológico más importante de estas estructuras lineales es la densidad de longitud (L_v).

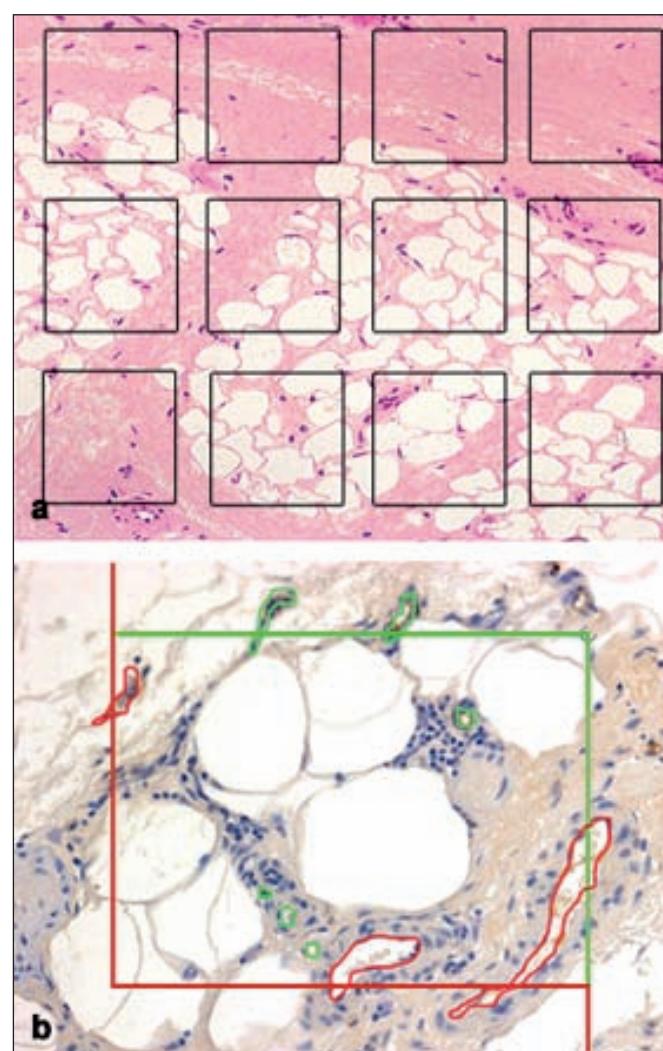


Fig. 9. En (a) se observa una zona de tejido celular subcutáneo procedente de una sección obtenida por medio de un protocolo IUR (*isotropic uniform random*). Dicha área se explora mediante muestreo sistemático con comienzo al azar; los campos seleccionados aparecen recuadrados en negro. En (b) se visualiza uno de los campos seleccionados inmunoteñido para Factor VIII, para evidenciar los microvasos. Se ha superpuesto sobre el campo un retículo de disector. Se incluyen en la estimación los perfiles de microvasos (resaltados en verde) que o bien se encuentran en el interior del retículo, sin tocar ningún borde, o, que estando dentro o fuera, tocan algún borde de inclusión (líneas de color verde). Se excluyen de la estimación, los perfiles (resaltados en rojo), que toquen algún borde de exclusión (líneas de color rojo). Los perfiles vasculares elegibles (Q_A) sirven para estimar la densidad de longitud de microvasos: $L_v = 2 \cdot Q_A$ donde Q_A es el número de perfiles vasculares inmunoteñidos por unidad de área, $Q_A = Q_v / S_{dis}$, siendo S_{dis} el área del retículo.

Sobre secciones IUR, se evaluará la L_v de los microvasos del tejido graso, es decir la longitud microvascular por unidad de volumen de tejido adiposo (5,18). Como espacio de referencia para esta estimación se emplea el estroma conectivo. Se utiliza el retículo del disector siguiendo la regla de Sterio (14) para muestrear los perfiles vasculares inmunoteñidos para Factor VIII y elegibles para ser contados. La densidad de longitud se calculará aplicando la fórmula:

$$L_v = (2 \times \Sigma Q_-) / \Sigma A$$

Donde Q_- = número de perfiles vasculares inmunopositivos elegibles y ΣA = área total muestreada, es decir: área del retículo del disector multiplicada por el número de retículos seleccionados (Fig. 9).

Conclusiones

En la presente revisión, ofrecemos una panorámica de algunos principios generales de la técnica estereológica, esencialmente en torno a conceptos esenciales como el espacio de referencia, estimadores estereológicos más habituales, diferencias entre sesgo y precisión, metodologías de muestreo uniforme y sistemático con comienzo al azar, etc.

Describimos a continuación una serie de estimaciones de interés en el caso del tejido adiposo, concretamente: la obtención de la fracción de volumen ocupada por los adipocitos en relación con el compartimento que se esté analizando; el recuento de la densidad numérica o número de adipocitos por unidad de volumen mediante la técnica del disector óptico y finalmente, la estimación de la densidad de longitud de microvasos o longitud de microvasos por unidad de volumen de tejido adiposo, aplicando así mismo el retículo de disector.

Ponemos de manifiesto que, aplicando técnicas sencillas pero rigurosas desde un punto de vista estadístico, es relativamente sencillo el obtener parámetros de interés para cuantificar el comportamiento del tejido adiposo ante diversos factores, ya sean experimentales o clínicos.

Dirección del autor

Dr. Luis Santamaría
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia
Facultad de Medicina, UAM
C/ Arzobispo Morcillo, 3
28029 Madrid, España.
e-mail: luis.santamaria@uam.es

Bibliografía

1. **Coleman SR.**: Facial recontouring with lipostructure. *Clin. Plast. Surg.* 1997;24: 347-367.
2. **Santamaría L.**: Métodos Estereológicos en Histología y Biología celular. In Técnicas en Histología y Biología celular. Editor: Montuenga L, Esteban FJ, and Calvo A. Elsevier Masson, Barcelona, 2009. Pp 275-300.
3. **Serna E, Santamaría L.**: First use of stereology to quantify the survival of fat autografts. *Image Analysis and Stereology*. 2005;24:1-7.
4. **Serna E, Martín R, and Santamaría L**: Injerto autólogo de grasa en la edad pediátrica. *Pediatrka*. 2003;23:192-199.
5. **Howard CV and Reed MG.**: Unbiased Stereology: three-dimensional measurement in microscopy. Bios Scientific Publishers, Oxford, 2005. Pp: 4-6.
6. **Gundersen HJ.**: Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J.Microsc.* 1986;143:3-45.
7. **Fain JN, Kanu A, Bahouth SW, et al.**: Comparison of PGE2, prostacyclin and leptin release by human adipocytes versus explants of adipose tissue in primary culture. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2002; 67:467-473.
8. **Baddeley A, Vedel Jensen E.**: Uniform and isotropic uniform designs. In *Stereology for statisticians*. Editor: Baddeley A and Vedel Jensen E. Chapman & Hall, Boca Raton, Florida (USA), 2005. Pp:155-173.
9. **Baddeley A, Vedel Jensen E.**: Geometrical probability. In *Stereology for statisticians*. Editor: Baddeley A and Vedel Jensen E. Chapman & Hall, Boca Raton, Florida (USA), 2005. Pp 111-133.
10. **Baddeley A, Vedel Jensen E.**: Overview of modern stereology. In *Stereology for statisticians*. Editor: Baddeley A and Vedel Jensen E. Chapman & Hall, Boca Raton, 2005. Pp 55-85.
11. **Gundersen HJ, Osterby R.**: Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or "do more less well". *J Microsc.* 1981;121: 65-73.
12. **Gundersen HJ, Jensen EB.**: The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J.Microsc.* 1987; 147:229-263.
13. **Carpaneda CA, Ribeiro MT.**: Percentage of graft viability versus injected volume in adipose autotransplants. *Aesthetic Plast. Surg.* 1994;18: 17-19.
14. **Sterio DC.**: The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J.Microsc.* 1984;134:127-136.
15. **Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, et al.**: Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002;99:10730-10735.
16. **Bono AV, Celato N, Cova V, et al.**: Microvessel density in prostate carcinoma. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2002;5:123-127.
17. **Mattfeldt T, Eckel S, Fleischer F, et al.**: Statistical analysis of reduced pair correlation functions of capillaries in the prostate gland. *J.Microsc.* 2006;223:107-119.
18. **Santamaría L, Ingelmo I, Ruiz J, et al.**: Stereological Estimate of the Length of Microvessels and the Number. Proliferation and Apoptosis of Endothelial Cells in Prostate Cancer. *The Open Prostate Cancer Journal*. 2009;2: 46-53.
19. **Deering RE, Bigler SA, Brown M, et al.**: Microvascularity in benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 1995;26: 111-115.
20. **Lissbrant IF, Stattin P, Damberg JE, et al.**: Vascular density is a predictor of cancer-specific survival in prostate carcinoma. *Prostate*. 1997;33: 38-45.