

Revisión de los métodos estereológicos y su aplicación en biología celular

Ofelia Pérez-Olvera,* Salvador Arellano Balderas,** Héctor A. Rodríguez Martínez*

RESUMEN

En medicina un gran número de investigaciones requieren del análisis morfométrico de un órgano, tejido o célula y/o del estudio de su composición interna. La estereología es el resultado de razonamientos matemáticos complejos, concretados en fórmulas aplicables para la obtención de parámetros tales como: densidad de volumen, densidad de superficie, densidad numérica y densidad de longitud, a partir de imágenes bidimensionales. Los cambios en la función celular, por ejemplo, frecuentemente se asocian con aumento o disminución en el tamaño de células o núcleos, o bien, con cambios en el número de determinadas organelas celulares involucradas en el proceso. Se presenta una breve revisión de los métodos y los principios físico-matemáticos en que se basan los métodos estereológicos comúnmente utilizados. Se revisan una serie de concepciones sobre los principios estereológicos estudiados a lo largo de varias décadas con el objeto de evitar sub o sobreestimaciones en la valoración de los resultados que el método permite determinar. Actualmente varios programas de cómputo han simplificado la aplicación de los estudios de morfometría, lo cual ha resultado en grandes ventajas para elaborar cuantificaciones a corto plazo.

Palabras clave: estereología, densidad de volumen, densidad de superficie, densidad numérica.

ABSTRACT

In Medicine, a large number of investigations require a morphometric analysis of an organ, tissue or cell and/or the study of their internal composition. Stereological methods are the result of mathematical reasoning explained in applicable formulas designed to determine parameters such as volume density, surface density, numerical density and length density, from bidimensional images. Changes in cellular function, for example, are frequently related to variations in the size of cells and nuclei, or to changes in the number of specific cellular organelles involved in the process. A brief review of the physical-mathematical principles that gave rise to the classic stereological methods is presented. We comment upon a series of conceptions on stereological principles over the past few decades in order to prevent under or overestimations in the appraisal of the results that the method allows. The stereological methods more frequently used are also examined. Currently software development simplifies the application of morphometric studies, whose main advantage is that they allow quantifications in a short time.

Key words: stereology, volume density, surface density, numerical density.

* Laboratorio de Investigaciones Anatomopatológicas iRoberto Ruíz Obregóni, Departamento de Medicina Experimental (Facultad de Medicina, UNAM). **Área de Análisis Matemático y sus Aplicaciones (Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco).

Correspondencia: Biol. Ofelia Pérez Olvera, Hospital General de México, Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. Dr. Balmis, no. 148, col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc. Correo electrónico: o_perez_olvera@yahoo.com.mx
Recibido: mayo 2011. Aceptado: enero 2012

Este artículo debe citarse como: Pérez-Olvera O, Arellano Balderas S, Rodríguez Martínez HA. Revisión de los métodos estereológicos y su aplicación en biología celular. Patología Rev Latinoam 2012;50(2):63-71.

La estereología es un método que en biología celular permite, aplicando fórmulas matemáticas basadas en la probabilidad geométrica estadísticamente significativa, obtener información tridimensional de células o estructuras tisulares, a partir de cortes microscópicos bidimensionales, seriados, paralelos y equidistantes.¹ La descripción morfológica y el análisis estructural cuantitativo han contribuido a la resolución de muchos de los problemas, no solamente de citología sino también de patología, fisiología, y bioquímica. La estereología ha brindado los medios necesarios para la cuantificación.

Los parámetros más comúnmente estudiados son: a) densidad de volumen (V_V), que es el volumen de las organelas o estructuras tisulares contenido por unidad de volumen; b) densidad de superficie (área) (S_V), que es la superficie de las membranas de las organelas o estructuras tisulares por unidad de volumen, y c) densidad numérica (N_V), que es el número de organelas o estructuras tisulares por unidad de volumen obtenido mediante conteo de puntos, intersecciones o número en los perfiles de las estructuras celulares y tisulares a estudiar.

El objetivo de este trabajo es hacer una revisión de los métodos estereológicos más comúnmente usados en biología celular e indicar de manera muy general las posibilidades de su aplicación para evitar sub o sobreestimaciones en las determinaciones de las densidades de volumen, superficie y numéricas.

Breve historia y establecimiento de algunos parámetros

En 1635, Buenaventura Cavalieri mostró que el volumen medio de una población de objetos de forma irregular se puede estimar a través de la suma de las áreas, a partir de cortes del mismo objeto a intervalos constantes. Este principio permitió las cuantificaciones morfológicas de volúmenes de objetos de una población basándose en la integración de áreas de un espacio de referencia definido.¹ Hay diferentes métodos para estimar las áreas de un objeto por medio de cortes; uno de los más usados en estereología es el método de conteo de puntos, que se describe mas adelante.

El origen de la estereología propiamente dicha se ubica en 1847 con el principio de Auguste Delesse,² el cual demuestra que la densidad de volumen (V_V), o sea el volumen de las organelas por unidad de volumen de un componente, es igual a la densidad de área (A_V), o sea el área de los perfiles del corte:

$$N_A = N_V / \bar{D}$$

Delesse toma como modelo para la deducción de su principio un cubo de tejido que contiene sólo un componente de forma irregular incrustado en una matriz (Figura 1). Este objeto puede tener cualquier tamaño y forma.² Si se pone el cubo dentro de un sistema de tres coordenadas X, Y, Z, y se corta el plano XZ en cortes delgados de un grosor dy conocido, el área total de cada corte es igual a a_T ; y dentro del mismo corte la estructura en estudio cubre un área igual a a_0 . El cubo tiene, por tanto,

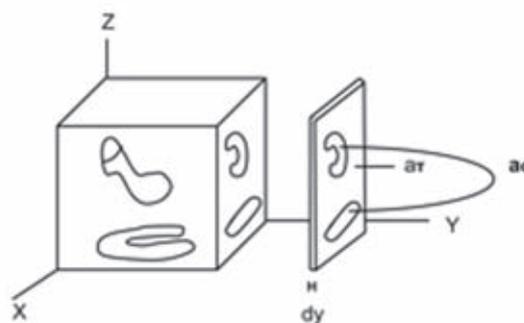


Figura 1. Pérez-Olvera. Modelo del principio de Delesse (ver Weibel ER. 1979).

cierto volumen total V_T . De manera análoga, el volumen total de cada corte es v_T y el volumen de la estructura en estudio dentro el corte es v_0 , y se pueden expresar de la siguiente manera: $v_T = a_T dy$; y $v_0 = a_0 dy$

Ahora, si se suman todas las rebanadas se tiene que:

$$\frac{\sum v_0}{\sum v_T} = \frac{V_0}{V_T} = V_V$$

Donde V_V es la densidad de volumen de la estructura en estudio. Pero si la relación anterior se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{\sum v_0}{\sum v_T} = \frac{\sum (a_0 dy)}{\sum (a_T dy)} = \frac{dy \sum a_0}{dy \sum a_T} = \frac{A_0}{A_T} = A_A$$

Donde:

A_0 = la sumatoria del área que ocupa la estructura en estudio

A_T = la sumatoria del área de todo el cubo

A_A = la densidad de área de A_0 , contenida en A_T

Debido a que el grosor del corte es una constante, se puede sacar fuera de la suma y es igual a 1. Es evidente que ambas ecuaciones son iguales y, por lo tanto: $V_V = A_A$,²

Glagoleff, en 1933,³ y Charkly, en 1943,⁴ redujeron el sistema de prueba a una rejilla con puntos colocados a una distancia d conocida y demostraron que la fracción de puntos que toca el objeto (P_p) es igual a la densidad de volumen: $P_p = V_V$.

El razonamiento que siguieron Glagoleff y Charkly de manera independiente dio lugar al método de la planimetría

(Figura 2), que consiste en trazar pequeños cuadrillos de una área constante y conocida para decidir si los cuadros que se encuentran en el límite de la estructura están dentro o fuera. Comúnmente se dice que si por lo menos la mitad del cuadro está adentro de la figura, entonces se considera incluida.^{3,4} Para simplificar esto, Glagoleff³ pensó que era más fácil marcar con un punto el centro del cuadrado para que se pudiera prescindir de los cuadrados y plausiblemente considerar que:

$$A_A = P_p$$

Saltykov, en 1945,⁵ introdujo el parámetro de S_V , y demostró que: a) la orilla (o límite de longitud) de un objeto determinado es proporcional al área de superficie S_V del mismo objeto; y que b) esta superficie puede ser estimada a partir del número de intersecciones con las líneas paralelas de una rejilla de prueba colocadas al azar.

Smith y Guttman (1953)⁶ y Henning (1956)⁷ retomaron los conceptos involucrados en el principio anterior para establecer que: la superficie del objeto en estudio es igual a 2 veces la densidad de intersecciones del objeto con las líneas de la rejilla de prueba (I_L).

$$S_V = 2I_L$$

Donde I_L proviene del principio del Conde Bufón, referido por Weibel,⁸ que dice que: hay probabilidad de que

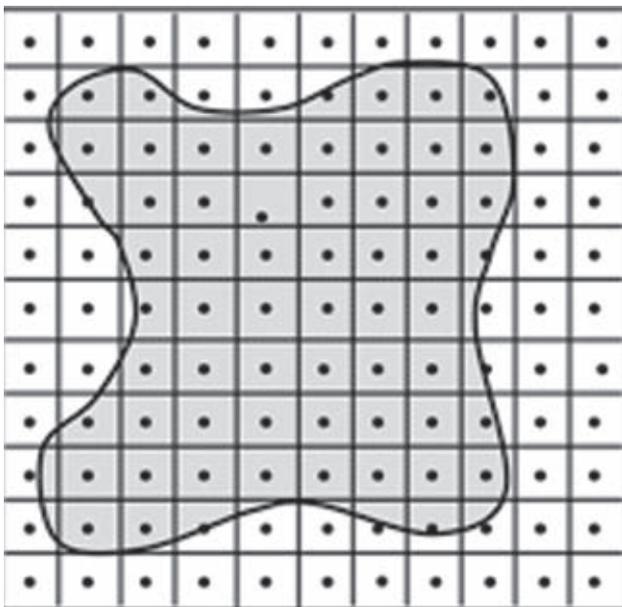


Figura 2. Pérez-Olvera. Método de planimetría, sistema de conteo de puntos. (Ver Weibel ER, 1979).

una simple aguja de longitud L en un movimiento aleatorio interceptó una rejilla de líneas paralelas de distancia d conocida. Wiecksell (1925)⁹ fue el primero en estudiar el número de partículas contenidas N_V en cierto compartimento y en definir una relación entre: a) el tamaño de la partícula en estudio (midiendo en cada corte su diámetro, y tomando dos tipos de forma: elipsoidal y esférica), y b) el número de veces que aparecen en cada corte.

En 1968,¹⁰ y posteriormente en 1981, De Hoff y Rhines¹¹ demostraron que:

$$N_A = N_V / \bar{D},$$

Donde, N_A es la densidad numérica total por unidad de área de la estructura celular en estudio, N_V es la densidad numérica del objeto en estudio (el número de veces que aparece la estructura celular en estudio por foto o campo), y D es el diámetro promedio del objeto.

Métodos estereológicos formulados por Weibel

Weibel,^{8,12} quien se considera el padre de la estereología, formuló la siguiente metodología en donde a las fotografías (de preferencia de tamaño carta), que contienen la estructura celular en estudio y a la que se desea medir el parámetro estereológico, se les sobreponen rejillas transparentes con el sistema de prueba adecuado y por medio de puntos, intersecciones, o contando el número, se aplican las correspondientes fórmulas dependiendo del parámetro a estudiar.

Densidad de volumen (Figura 3).

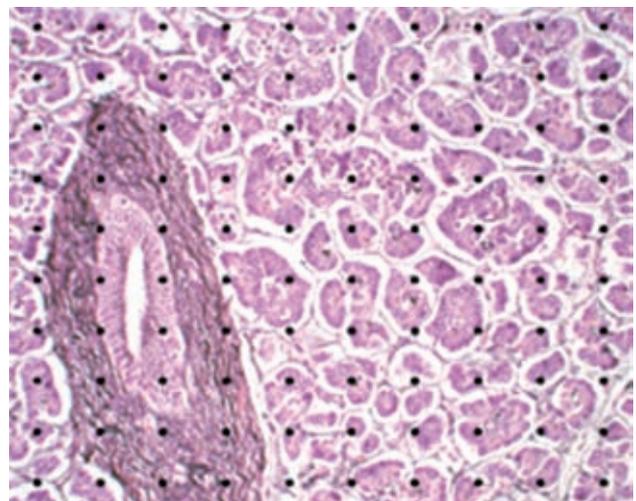


Figura 3. Pérez-Olvera. Sistema de puntos para obtención de densidad de volumen. Corte en parafina de páncreas, tinción de metenamina de Jones.

$$V_v = \frac{\sum^n P_a(i)}{\sum^n P_c(i)}$$

Donde:

V_v = densidad de volumen de la estructura celular en estudio.

$\sum^n P_a(i)$ = la suma de los puntos que tocan la estructura celular.

$\sum^n P_c(i)$ = la suma de los puntos totales de la rejilla.

Densidad de superficie (Figura 4).

$$S_v = 2 \frac{\sum^n I_a(i)}{\sum^n L_c(i)}$$

Donde:

S_v = densidad de superficie de la estructura celular en estudio.

$\sum^n I_a(i)$ = suma de las intersecciones entre las líneas de prueba y la estructura celular.

$\sum^n L_c(i)$ = suma del total de las líneas de prueba de la rejilla.

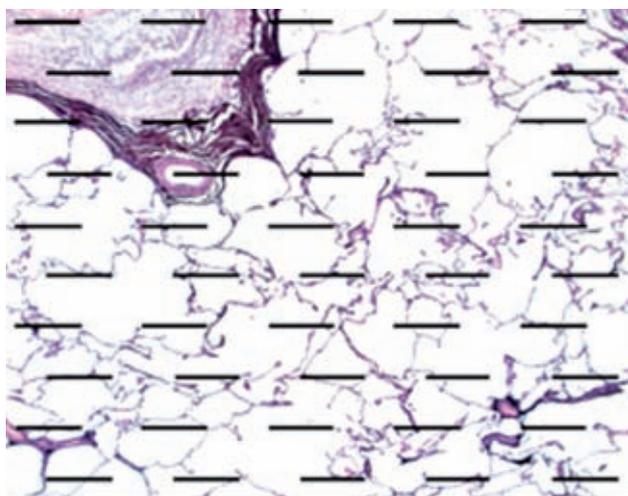


Figura 4. Pérez-Olvera. Sistema de intersecciones para obtención de densidad de superficie. Corte en parafina de pulmón, tinción de metenammina de Jones.

Esta fórmula se aplica con la rejilla de multisistema o bien con las líneas paralelas.

Densidad numérica (Figura 5)

$$N_A = N_v / \bar{D}$$

Donde: N_A = densidad numérica real de la estructura celular en estudio y para la cual se necesita saber el diámetro promedio de la organela en estudio.

N_v = densidad numérica de los perfiles cuantificados de la estructura celular por unidad de área.

D = diámetro promedio de la estructura celular.

Esta fórmula aplica para estructuras celulares redondas u ovals.

Multisistema: consiste de una rejilla transparente que contiene un cuadrículado en donde se conoce el tamaño de cada cuadro y el área total de la rejilla. Con este tipo de rejilla se pueden realizar todas las pruebas anteriores (Figura 6)

Aplicación de los métodos estereológicos

La preparación del material biológico, para su posterior análisis, demanda un cuidado especial para que las características morfológicas naturales de la estructura celular y de las estructuras tisulares por medir no sean alteradas por los procesos de fijación, deshidratación, infiltración, de tal forma que todo el procesamiento de las muestras de tejido

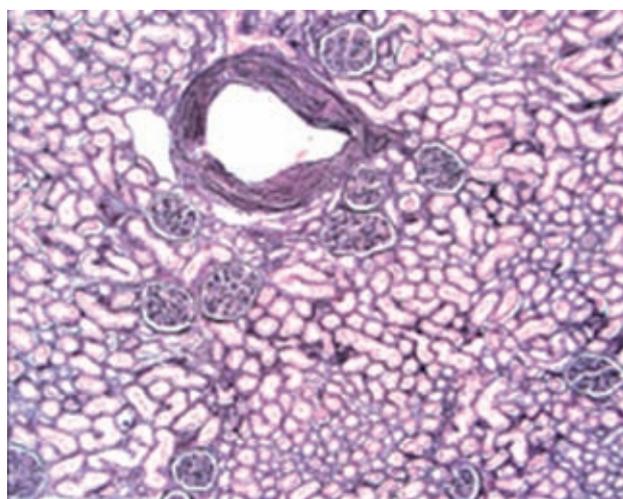


Figura 5. Pérez-Olvera. Sistema de densidad numérica de elementos celulares por unidad de área. El recuadro es una rejilla de un área conocida. Corte en parafina de riñón, tinción de metenammina de Jones.

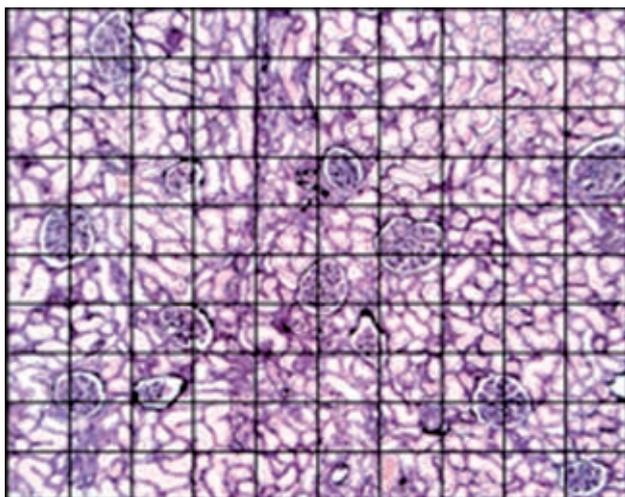


Figura 6. Pérez-Olvera. Multisistema. Corte en parafina de riñón, tinción de metenamina de Jones.

se realice de la misma manera. Así, los parámetros por medir, incluyendo desde la toma de la muestra del tejido hasta su observación en el microscopio, no son alterados. Especial cuidado deberá tenerse en cuanto al ajuste de: osmolaridad, pH, tiempos de fijación, deshidratación e infiltración y tamaño de la muestra por procesar.

Consideraciones sobre los cortes

En estereología, un corte se define como: el producto del deslizamiento del filo de la cuchilla sobre un bloque de parafina o resina que contiene el objeto en estudio.⁸ La ventaja de utilizar cortes es que exponemos el interior del tejido sin alterar su estructura interna. Los cortes deben de hacerse siempre del mismo grosor en el mismo estudio; de esta manera su valor se convertirá en una constante.⁸

1. **Muestreo:** las mediciones estereológicas se basan en la probabilidad que existe de que la estructura en estudio, presente en un corte, coincida con el apropiado sistema de prueba.¹³ En consecuencia, existe una demanda rigurosa de un adecuado muestreo de los diferentes niveles o subcompartimentos celulares y tisulares. Además, se debe tener especial cuidado al calcular tanto el número de bloques de tejido que serán cortados, así como al seleccionar la zona representativa del corte por muestrear.
2. **Tamaño de la muestra:** cinco casos o especímenes por grupo pueden ser suficientes para la realización del estudio estereológico. Se recomienda que se utilicen

de 5 a 10 bloques por caso. Se requieren aproximadamente 200 puntos para calcular la densidad de volumen y aproximadamente 200 intersecciones para determinar la densidad de superficie por cada caso de los diferentes compartimentos de interés. Para calcular la densidad numérica, será suficiente la cuantificación de organelas muestreando de 100 a 200 células por espécimen.^{13, 14}

Tipo de muestreo

- a) **Muestreo al azar:** un corte al azar es aquel que se practica sin tomar en cuenta ningún ángulo de orientación entre el plano del corte y el objeto en estudio (órgano, tejido, organela). Un corte se practica al azar, en el sentido estereológico, cuando el objeto en estudio se encuentra: i) distribuido en todos los niveles y en cualquier dirección del espacio que lo contiene (órgano o tejido), y ii) si la distribución del objeto es totalmente homogénea, es decir, no tiene periodicidad inherente que pudiera requerir un muestreo especial.^{8, 13} Si consideramos un tejido incrustado en un bloque de parafina para microscopía de luz o en un bloque incluido en resina para trabajar microscopía electrónica, se podrá constatar que éste puede ser cortado en un número casi ilimitado de formas: a diferentes escalas y en diferentes direcciones. En este tipo de muestreo se asume que el objeto en estudio se encuentra de manera representativa en todas las posibilidades de orientación del corte y que existe en cada corte con la misma probabilidad.
- b) **Muestreo sistemático:** el muestreo sistemático es aquel en el cual la muestra se toma siempre a distancias periódicas en el órgano, tejido o célula, con lo que se evita muestrear repetidas veces en el mismo lugar. Weibel⁸ propuso un método de muestreo sistemático para usarlo cuando se tomaran fotos en estudios ultraestructurales; por ejemplo, cuando se inicia el conteo, se escoge la misma esquina de los cuadros que componen la rejilla que sostiene el listón de cortes ultrafinos.
- c) **Muestreo en sistemas celulares ordenados:** el sistema apropiado de muestreo se hace más difícil cuando el objeto en estudio no se encuentra distribuido homogéneamente, sino que muestra una distribución irregular; como ocurre con frecuencia en los sistemas celulares. Weibel⁸ clasificó a los arreglos heterogéneos de los sistemas celulares en 5 patrones:

- i. Estructuras arregladas en capas, como es el caso del cartílago. El tejido cerebral constituye uno de los mejores ejemplos de este tipo.
 - ii. Estructuras arregladas de manera fasciculada; a este tipo pertenecen las estructuras celulares alargadas con un arreglo más o menos paralelo, por ejemplo: músculo esquelético y tejido nervioso.
 - iii. Estructuras ramificadas: a este tipo pertenece el tejido vascular como las arterias, venas y capilares, así como también los sistemas de conductos de las glándulas exócrinas y el arreglo de las vías aéreas de los pulmones.
 - iv. Estructuras de tipo polarizado: se presentan principalmente cuando los dos lados opuestos de una estructura son diferentes debido a su funcionalidad. Éste es el caso de estructuras laminares tales como las superficies epiteliales. Esta polaridad usualmente resulta en la formación de un gradiente de estructuras dentro de una misma banda, de tal forma que las células que se encuentran en una de las superficies tienen composición diferente de las del lado opuesto.
 - v. Estructuras periódicas: resultan de un arreglo secuencial de unidades idénticas. Un ejemplo claro es el músculo estriado, en el cual las miofibrillas están construidas por elementos estrictamente idénticos; las sarcómeras, que presentan simetría bilateral, debido a la interconexión de actina y miosina, y se encuentran alineadas de manera periódica. La periodicidad también se presenta en estructuras laminares como en el caso del arreglo del hueso lamelar.
 - vi. En el muestreo de estructuras periódicas se presentan algunos problemas, especialmente si además de la periodicidad se manifiesta también la anisotropía (grado de ordenamiento), como en el caso del músculo. El muestreo, los cortes practicados y las fotografías se harán dependiendo de la orientación, la periodicidad y el grado de anisotropía.
- d) Problemas que surgen al aplicar los métodos estereológicos en sistemas anisotrópicos: por naturaleza, las células son anisotrópicas, ya que para llevar a cabo sus funciones requieren de una cierta orientación con respecto al espacio que ocupan. La cancelación de la anisotropía es un prerequisite esencial para la

aplicación de métodos estereológicos en tejidos biológicos.¹⁵ Si la anisotropía no se elimina de manera natural, como en el caso de las superficies epiteliales y el músculo esquelético, es muy importante la selección del sistema de prueba. En un sistema isotrópico, todos los ángulos con los que se corta un espécimen son iguales, mientras que en un sistema anisotrópico el número de intersecciones será pequeño si el ángulo es 0° (cortes transversales) y será mayor cuando el ángulo sea de 90° (cortes longitudinales). Esto precisamente puede servir para saber el grado de anisotropía de la estructura en estudio, ya que se pueden contar las intersecciones paralelas al eje de anisotropía (I_{L0}), y las perpendiculares (I_{L90}). Entre más pequeño sea el valor de la relación I_{L0}/I_{L90} , será mayor el grado de anisotropía.

- e) Cortes verticales y el sistema cicloide: En la determinación de la densidad de superficie, se presentan problemas con los tejidos con un alto grado de anisotropía.¹⁶ El grado de anisotropía en estereología se rompe por medio de dos métodos: i) haciendo cortes con un ángulo de orientación de 45° con respecto al eje preferencial que muestre el tejido y ii) utilizando cortes verticales (paralelos al eje de orientación) y aplicando el sistema cicloide. Un corte vertical se define como un corte perpendicular al plano horizontal; típicos ejemplos de cortes verticales de estructuras celulares son los siguientes: ai) cortes longitudinales del tejido muscular esquelético; bi) cortes longitudinales de los diferentes epitelios; ci) cortes longitudinales de un órgano tubular (por ejemplo, el intestino).¹⁶ Para hacer un corte vertical, la estructura en estudio debe de tener un eje preferencial e identificable de orientación. Los típicos sistemas de prueba para este tipo de cortes son rejillas transparentes que contienen líneas cicloides con un ángulo constante que implica una orientación de 45° (corte perpendicular) con respecto al eje vertical (Figura 7).¹⁷

$$S_V = 2(p/l) \frac{\sum I_i}{\sum P_i}$$

En donde:

S_V = densidad de superficie

2 = constante

(p/l) = longitud de las líneas curvas de la rejilla

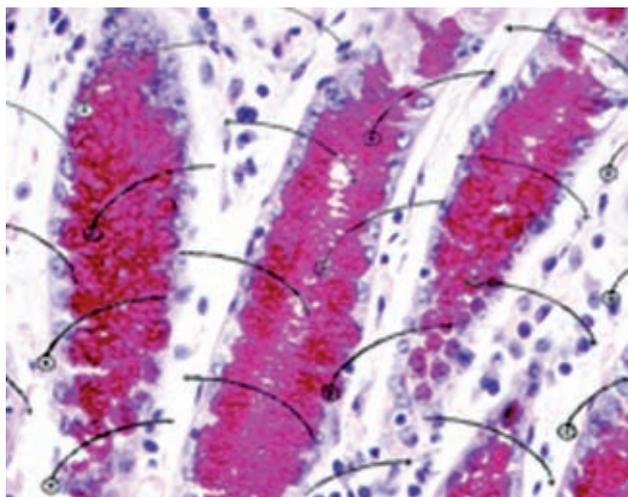


Figura 7. Pérez-Olvera. Corte vertical de colon, tinción de PAS, con el sistema de prueba cicloide usado para determinar densidad de superficie en estructuras celulares anisotrópicas (ver Baddeley et al., 1986).

$\sum I_i$ = puntos de intersección de las líneas curvas con la estructura en estudio

$\sum P_i$ = puntos totales de la rejilla

Esta fórmula se aplica sólo cuando se utiliza el sistema cicloide en los cortes verticales.

- f) Muestreo en cascada o multiniveles: otro tipo de arreglo que presenta también algunos problemas en el muestreo es el que se refiere a estructuras ramificadas que además revelan un gradiente conforme se bifurcan. El gradiente en este tipo de elementos tubulares generalmente muestra una jerarquía que requiere de un muestreo en cascada o multiniveles.^{8,18}
- i. Cuando se desea estimar un parámetro estereológico que se encuentra definido en una fase que requiere de una amplificación final alta (por ejemplo, mitocondrias o capilares), se debe hacer un muestreo en multiniveles para crear un gradiente de aumentos, hasta obtener la amplificación final de interés.¹⁹ Para llevar a cabo un buen muestreo en cascada es requisito primordial conocer de antemano la estructura geométrica de la estructura celular de interés, así como escoger correctamente el aumento al cual se harán las cuantificaciones. Además, la medición del volumen del órgano en

estudio deberá ser lo más fiel posible, ya que una omisión podría repercutir en los cálculos finales.²⁰ La descripción, hecha por Weibel^{8,13} del muestreo en cascada, tomó como modelo multiniveles de hígado (Figura 8).

Los sistemas de cómputo

Dentro de los sistemas de cómputo utilizados se encuentra el analizador de imágenes. El principio de su funcionamiento fue establecido desde hace ya varias décadas. Consiste en lo siguiente: un microscopio que tiene adaptada una cámara de video, conectada a un monitor (con posibilidad de conectarse también a una videogradora), y una computadora que cuenta con los programas específicos para cada parámetro estereológico por medir. Existen dos maneras por medio de las cuales una imagen puede ser procesada: a) transferir la información de la imagen completa a la memoria y procesar la información posteriormente con un *software*; b) incorporar previamente un programa *ad hoc* que permita evaluaciones inmediatas y futuras de determinadas imágenes. La ventaja de utilizar el analizador de imágenes salta a la vista, ya que se puede hacer un número muy grande de conteos, con una gran exactitud y en muy corto tiempo.

Dependiendo de la calidad del sistema de cómputo utilizado se pueden evitar deformaciones de la imagen que, por ejemplo, la hagan más reducida, arrugada, o más agrandada. El desarrollo de equipos y programas más rápidos, con un costo menor y accesible, hará más eficaz la automatización y el análisis de imágenes.

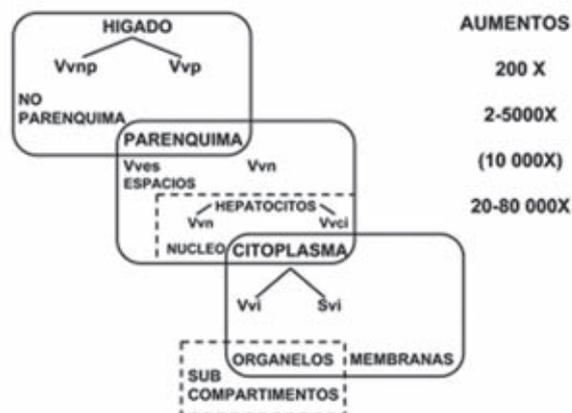


Figura 8. Pérez-Olvera. Muestreo en cascada tomando como ejemplo el hígado. (ver Weibel ER, 1979).

El método del disector físico

Una forma de contar partículas en un corte grueso de tejido (25 a 50 micras), consiste en utilizar diferentes y sucesivos planos focales y “disecar visualmente” las partículas presentes en un área tridimensional determinada.⁸ A este método se le conoce como el disector óptico. La aplicación de este método tiene muchos inconvenientes, como son los diferentes tipos de tejidos, y la inexactitud que se puede presentar en las observaciones microscópicas.

Sin embargo, con el método del disector físico se puede contar el número de partículas contenidas en un corte de tejido para determinar la densidad numérica (N_V). Tiene la ventaja de que en él no es tan importante la orientación del corte y que tampoco importa el tamaño y la forma de las partículas.⁸ Es muy importante y necesario conocer el grosor del corte. Para poner en práctica el método del disector físico se requiere utilizar dos planos paralelos, los cuales se pueden obtener, por ejemplo, de dos cortes adyacentes de un bloque de parafina (Figura 9); a uno de los cortes se le conoce como plano de referencia y al corte opuesto o complementario como *look up plane*. En el corte que se seleccione como plano de referencia se delimita un cuadrado o un rectángulo, “marco de conteo”, cuya área (A) debe ser medida. La figura geométrica que se seleccione utilizar se debe trazar con dos lados con raya continua y dos lados contralaterales con raya interrumpida. Es muy importante determinar la distancia d que separa a ambos cortes para poder calcular el número de partículas que se encuentra contenido entre ellos.

En la práctica se tienen que seguir los siguientes lineamientos: a) solamente se cuantifican aquellas partículas que están presentes en el plano de referencia sin que lo estén en el plano *look up*; b) solamente se cuentan aquellas partículas que se encuentren contenidas dentro de los límites del marco de conteo; c) se cuentan únicamente las

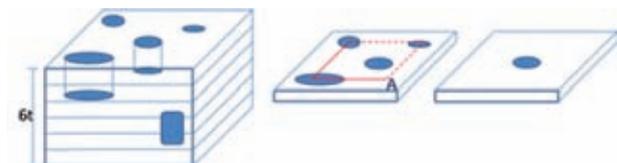


Figura 9. Pérez-Olvera. Bloque de parafina dividido en seis cortes paralelos y sistemáticos. Para aplicar el disector físico se toman 2 cortes adyacentes, 1 y 2. Al corte no.1 se le toma como plano de referencia y se le delimita el marco de conteo. Al corte no. 2 se le considera como plano *look up*.

partículas que tocan la raya interrumpida; d) no se pueden contar las partículas que tocan la raya continua, o sea la línea prohibida; e) para determinar el número de partículas, se aplica la siguiente fórmula:²¹

Donde:

N_V = densidad numérica

Q^{-1} = número de veces en que aparece la estructura en estudio

A = área del marco de conteo

t = grosor del corte

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen por su colaboración en dar formato al escrito a Ricardo Eloi Arellano Pérez y a Angélica Leticia Serrano Ahumada.

REFERENCIAS

1. Cruz-Orive LM. Avances recientes en estereología y su aplicación en biología celular. Actas del II Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular. E-Barcelona 1987;2:16-19.
2. Delesse MA. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. C,R, Hebd Séan Acad Sci Paris, 1847;25:544-546.
3. Glagoleff AA. On the geometrical methods of quantitative mineralogical analysis of rocks. Trudy Inst Prikl Miner Metall 1933;59:1-200.
4. Charlkley HW. Methods for the quantitative morphologic analysis of tissues. J Nat Cancer Inst 1943;4:47.
5. Saltikov SA. Stereometrische Metallographie. Leipzig. VEB Deutscher Verlag 1945;1-149.
6. Smith CS Guttman L. Measurement of internal boundaries in three dimensional structures by random sectioning. Trans Metall Soc AIME 1953;10-300.
7. Henning A. Bestimmung der oberfläche beliebig geformeter körper mit besonderer anwendug auf körperhaufen im mikroskopischen bereich. Mikroskopie 1956;11:1-103
8. Weibel ER. Stereological Methods. Practical Methods for Biological Morphometry. Vol.1. Londres, Academic Press, 1979;9-257.
9. Wicksell SD. The corpuscle problem I. Biometrika 1925;17- 84.
10. De Hoff RT, Rhines FN. Quantitative Microscopy. Nueva York, McGraw-Hill, 1968;9-80.
11. De Hoff RT, Rhines FN. Determination of number of particles per unit volume from measurements made on random plane sections: the general cylinder and the ellipsoid. Trans Metall Soc AIME 1981;221: 975.
12. Wicksell SD. The corpuscle problem II. Biometrika 1926;18-151.
13. Weibel ER. Stereological Methods. Theoretical Foundations Vol.2. Londres, Academic Press, 1980;20-200.

14. Cruz-Orive LM, Weibel ER. Sampling designs for stereology. *J Microsc* 1981;122:235-257.
15. Cruz-Orive LM, Hunziker EB. Stereology for anisotropic cells: application to growth cartilage. *J Microsc* 1986;143:47-80.
16. Baddeley AI, Gundersen HJG, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J. Microsc* 1986;142:259-276.
17. Phyllofsky EM Hilliard JE. The measurement of the orientation distribution of lineal and areal arrays. *Quart. J Appl Math* 1969;27:79-86.
18. Hyde DM, Buss DD. Morphometry of the coronary microvasculature of the canine left ventricle. *Am J Anat* 1986;177:415-425.
19. Hunziker EB, Cruz-Orive LM. Consistent and efficient delineation of reference space for light microscopical stereology using a laser microbeam system. *J Microsc* 1986;142:1,95-99.
20. Scherle WF. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 1970;26-57.
21. Mayhew T.M., Gundersen HJG. If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the dissector for stereological counting of particles in 3D space. *J. Anat* 1996;1-15.