

# CUANTIFICACIÓN DE LA LONGITUD Y VOLUMEN DE LA RED VASCULAR A PARTIR DE SECCIONES

García Oliveira, P.

e- mail: paulagarciao@alumnos.uvigo.es

Trabajo Fin de Grado en Biología

Tutor:

- Manuel Megías Pacheco

Departamento de Biología

Funcional y Ciencias de la Salud

Facultad de Biología

Universidad de Vigo.

## Resumen

En el presente trabajo de investigación se cuantificó el volumen y la longitud totales de la red capilar de bulbos olfativos humanos mediante el método estereológico de las secciones IUR (Isotropic Uniform Random) y el uso de la lectina UEA para poner de manifiesto el endotelio capilar. Este método permite obtener datos cuantitativos, insesgados y precisos de manera sencilla y eficiente de estructuras biológicas tridimensionales.

## INTRODUCCIÓN

Un gran problema de la biología es la cuantificación de ciertos parámetros de forma precisa e insesgada como, por ejemplo, el número total de células, el volumen, la superficie o la longitud total de una estructura (Mouton, 2011). Algunas técnicas como las imágenes por resonancia magnética (MRI) permiten calcular el volumen de estructuras biológicas *in vivo*, pero no su superficie o longitud. Además, en estructuras pequeñas, los resultados no siempre son precisos, ni tampoco sirven para cuantificar estas variables en tejido *post mortem*.

La estereología es una metodología cuantitativa que permite obtener información tridimensional de un objeto de estudio a partir de secciones paralelas y equidistantes. Esta técnica es insesgada puesto que se basa en el muestreo sistemático y aleatorio, sin hacer asunciones previas. Es muy eficiente porque permite obtener información de un órgano completo sin analizar todos sus cortes, ya que todas las secciones de un objeto tienen la misma probabilidad de ser analizadas (Howard & Reed, 2005; Mouton, 2011). Utiliza plantillas con características geométricas conocidas para estimar parámetros como el área, volumen, longitud y superficie. La estimación se realiza a partir del número de intersecciones al azar entre la plantilla y el objeto de estudio (Mouton, 2011).

La estereología se ha usado en medicina para el cálculo de volúmenes de distintos órganos como los pulmones (Wiebe & Laursen, 1998), o distintas estructuras neurológicas, como la amígdala basolateral (Rubinow *et al.*, 2016) o el bulbo olfativo (Bhatnagar *et al.*, 1987). También se ha utilizado para estimar el número de células de áreas nerviosas (Bhatnagar *et al.*, 1987) o la longitud de la red capilar de diversos órganos (Wiebe & Laursen, 1998; Kreezmanski *et al.*, 2005).

El objetivo de este trabajo de investigación es adaptar la técnica estereológica denominada Isector para obtener valores precisos e insesgados del volumen y la longitud de la red capilar de bulbos olfatorios humanos a partir de secciones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

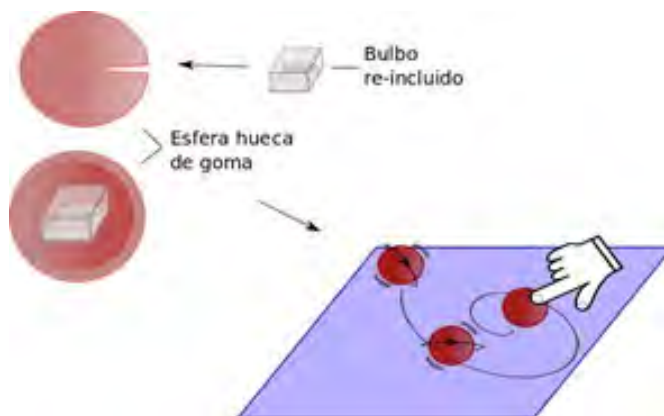
Para la cuantificación del volumen de la red vascular se utilizó el método de Cavalieri y para la cuantificación de su longitud, la combinación entre el método de Cavalieri y la obtención de secciones IUR ("Isotropic Uniform Random") (Howard & Reed, 2005). El órgano escogido para poner a punto la

metodología fueron bulbos olfativos humanos de individuos control e individuos diagnosticados de Alzheimer.

**1. Obtención de secciones IUR.**

Para utilizar la técnica de las secciones IUR es necesario generar una orientación aleatoria de los bulbos olfativos escogidos (4 pertenecientes a individuos control y 4 pertenecientes a individuos diagnosticados de Alzheimer). Para ello, los bulbos se incluyeron en bloques de parafina con las dimensiones adecuadas para introducirlos en el interior de una esfera hueca de goma. A continuación, una vez sellada la abertura con cinta adhesiva, se hizo girar la esfera al azar sobre una superficie plana (Figura 1). Tras detener la esfera, se extrajo el bloque con mucha precaución, evitando variar su orientación espacial y se montó sobre un portamuestras.

Para comprobar que este método es apropiado para generar orientaciones aleatorias se hizo un estudio estadístico. La superficie de la esfera se dividió en cuatro cuadrantes numerados del 1 al 4 y se hizo rodar sobre una superficie plana, con un bloque de parafina dentro. Se anotó el cuadrante que ocupaba el “polo norte” tras su detención. Este proceso se realizó 100 veces y a los resultados se les aplicó la prueba  $\chi^2$  de Pearson para testar la hipótesis de aleatoriedad.

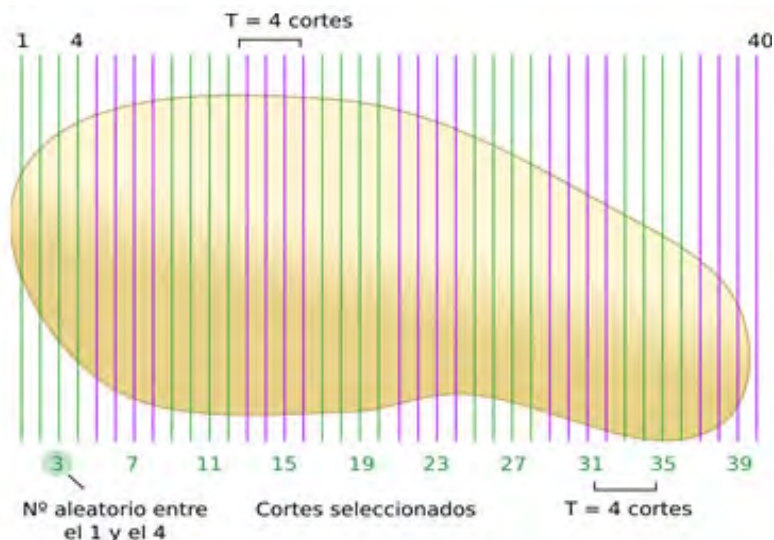


**Figura 1:** Método de la “esfera rodante”. Procedimiento para generar una orientación aleatoria del bloque de parafina.

Una vez montados todos los bloques, cada uno con su orientación aleatoria, se cortaron por completo en secciones de 8  $\mu$ m de grosor con un microtomo de parafina (Leyca, RM2235). Los cortes se montaron alternativamente en dos series (una con los cortes pares y otra con los impares).

**2. Selección de cortes**

Para aplicar el método estereológico han de escogerse unas 10 secciones de manera aleatoria y sistemática de la siguiente manera. Se contó el número total de cortes de cada bulbo y se dividió entre 10, obteniendo 10 intervalos fijos con el mismo número de cortes (T). Para seleccionar el primer corte de estudio, se generó un número al azar entre los cortes del primer intervalo utilizando la función “aleatorio” en Excel (<http://www.microsoftstore.com/>). A este número se le suma el intervalo fijo (T) para elegir el segundo corte y así sucesivamente hasta obtener los 10 cortes de estudio (Fig. 2)



**Figura 2:** Esquema donde se muestran los intervalos (T) de un bulbo olfativo y la elección aleatoria del corte (3) del primer intervalo. Los números en verde de la parte inferior corresponden a los cortes seleccionados.

### 3. Marcaje de capilares con la lectina UEA

Los portaobjetos con los cortes seleccionados se procesaron para poner de manifiesto la red capilar con la lectina UEA (aglutinina de *Ulex europaeus*), que marca el endotelio de los capilares sanguíneos, además de las aferencias olfativas primarias.

Primeramente se eliminó la parafina de las secciones de los portaobjetos con xileno (2 x 10 min) y se hidrataron en una gradación decreciente de etanol 100° (2 x 10 min), 96°, 80° y agua (10 min cada uno). El tejido se sumergió 1 h en tampón fosfato salino 0.1 M pH 7.4 (PBS) con peróxido de hidrógeno (7:3), para eliminar la actividad peroxidasa endógena y evitar la aparición de falsos positivos. Los cortes se lavaron en PBS (2 x 5 min) y se bloquearon los sitios potenciales de unión inespecífica de la lectina UEA al tejido incubando los cortes 1h en una solución de bloqueo (albúmina de suero bovino al 1% diluida en PBS). Tras ello, se lavaron en PBS (2 x 5 min) y se mantuvieron toda la noche incubando con la lectina UEA conjugada con biotina (Vector Laboratories) a una concentración de 10 µg/mL en PBS.

La incubación se realizó mediante el método tipo sándwich. Se colocaron dos tiras de Parafilm (SIGMA) en los extremos del portaobjetos con los cortes y un portaobjetos limpio sobre las tiras, quedando una separación correspondiente al grosor de las tiras de Parafilm. A continuación, se añadieron 150 µL de la solución con la lectina a cada sándwich. Los sándwiches se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Tras la incubación, los cortes se lavaron 3 veces durante 10 min en PBS y se incubaron con el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC; Vector Laboratories) a una concentración de 1/100 en PBS durante 1 h. Seguidamente se realizaron 2 lavados de 10 min en PBS para eliminar el complejo ABC no unido.

A continuación los cortes se sumergieron 10 minutos en tampón fosfato pH 7.8 y 0.1 M (PB) y se procedió al revelado. Para ello, los cortes se incubaron en una solución de 3-3' diaminobencidina (DAB; SIGMA) y 0.01% de peróxido de hidrógeno. La reacción se mantuvo hasta que se observó color marrón en los cortes. Una vez se consideró óptima, la reacción se detuvo con varios lavados de 5 min en PB.

Tras el revelado se realizó una tinción de contraste con hematoxilina de Mayer para poner de manifiesto los núcleos celulares. Los cortes se sumergieron en hematoxilina de Mayer durante 45 s y se diferenció el colorante incubando los cortes en agua corriente durante 15 min. Posteriormente se deshidrataron en una gradación creciente de etanol de 80°, 96° (5 min cada uno), 100° (2 x 5 min), se aclararon con xileno (2 x 5 min) y se montaron con el medio de montaje Coverquick 2000 (VWR; Chemicals).

### 4. Cuantificación por métodos estereológicos

Una vez procesadas y montadas las secciones, se emplearon los métodos estereológicos que se describen a continuación para calcular el volumen total del bulbo olfativo, el volumen de capilares y la densidad de longitud de capilares. Primeramente, cada una de las 10 secciones de cada bulbo, seleccionadas de manera aleatoria y sistemática, se fotografió con una cámara digital DP71 (Olympus) acoplada a un microscopio Olympus (Bx51), con el objetivo de 20X. Las imágenes se montaron en con el programa Inkscape (<https://inkscape.org/es>). En el mismo programa se diseñaron las plantillas para el cálculo de los parámetros anteriores, de forma que se contaron entre 10-20 intersecciones del tejido de cada corte con cada plantilla, tal y como recomienda Mouton (2011).

#### 4.1. Cálculo del volumen bulbar

Para la cuantificación del volumen bulbar se aplicó el método de Cavalieri, que permite estimar el volumen de un objeto a partir de 10 cortes paralelos, separados un intervalo fijo (T) (Howard & Reed, 2005). Se calculó el área de cada corte mediante una plantilla de puntos superpuesta al azar, en la que cada punto llevaba asociada un área determinada (Figura 3).

Fórmula del método de Cavalieri: Volumen =  $\sum P \times (a/p) \times T$

$\sum P$ : número total de puntos de la plantilla que se superpone con cada una de las secciones; a/p: área asociada a cada punto; T: intervalo en µm entre los cortes.

### 4.2. Cálculo del volumen de la red capilar

El volumen total de la red capilar se calculó también mediante el método de Cavalieri, usando los 10 cortes previamente seleccionados. En este caso, el número de puntos totales es el número de puntos que se superpusieron con algún capilar, mientras que los que se superpusieron con cualquier otra parte del tejido no se consideraron.

Fórmula de Cavalieri para el volumen de capilares:

$$\text{Volumen} = \sum P \times (a/p) \times T$$

$\sum P$ : número total de puntos superpuestos;

$a/p$ : área asociada a cada punto;  $T$ : intervalo en  $\mu\text{m}$  entre los cortes.

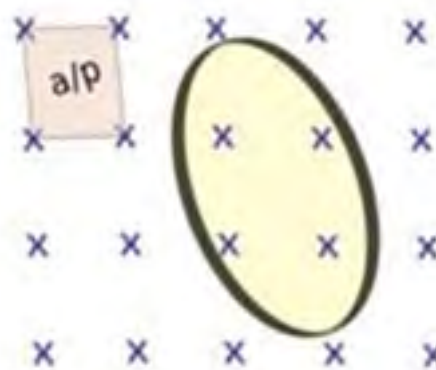


Figura 3 :Esquema del método de Cavalieri.  $a/p$ : área asociada a cada punto.

### 4.3 Cálculo de la densidad de longitud

La densidad de longitud de un objeto ( $L_v$ ) es la longitud por unidad de volumen en un determinado espacio de referencia. Se calcula según la siguiente fórmula:  $L_v = \text{Longitud objeto} / \text{Volumen del espacio de referencia}$  (Howard & Reed, 2005).

Para la cuantificación de la densidad de longitud se utilizó la técnica de la “línea prohibida”. La plantilla se diseñó con cuadrados, con dos lados verdes y dos rojos, de forma que se contaron aquellos capilares a los que se superpuso una línea verde o quedaron dentro del cuadrado de muestreo. Aquellos capilares a los que se superpuso una línea roja no se contaron (Figura 4). Al igual que en los casos anteriores, la plantilla se diseñó de forma que se contaran entre 10 y 20 capilares por corte.

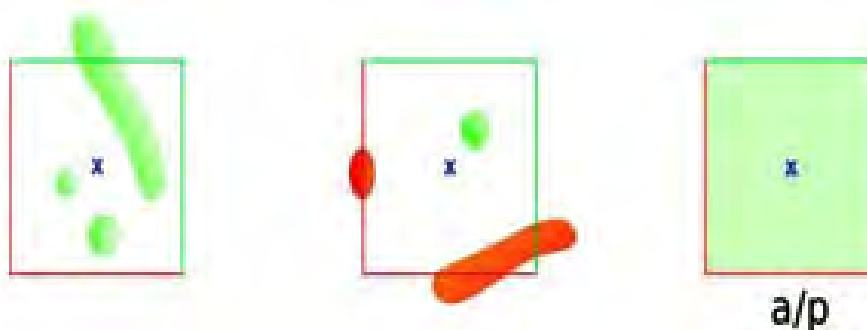


Figura 4 :Técnica de la línea prohibida. Los capilares en verde corresponden a aquellos que se cuentan, mientras que los rojos no se cuentan.

La plantilla se colocó sobre cada una de las secciones y se contó el número de capilares, siguiendo la regla antes descrita. La densidad de longitud se estimó según la siguiente fórmula:  $L_v = (2 \times \sum Q) / ((a/p) \times \sum P)$

$\sum Q$ : sumatorio total de capilares contabilizados;  $a/p$ : área de muestreo;  $\sum P$ : número total de cuadrados que caen dentro del corte.

Además de la densidad de longitud, se estimó la longitud total de la red capilar, despejando la longitud ( $L$ ) de la ecuación  $L_v = \text{longitud total } (L) / \text{Volumen}$

$L = L_v \times \text{Volumen}$ ;  $L_v$ : densidad de longitud; Volumen: volumen bulbar total (espacio de referencia)

## RESULTADOS

### 1. Orientación aleatoria del plano de corte

Para aplicar las técnicas estereológicas empleadas es necesario conseguir una orientación al azar del bulbo olfativo. Se utilizó la técnica del "Isector" (Nyengaard & Gundersen, 1992), con las modificaciones descritas en Material y Métodos.

La validez del método de la "esfera rodante" se comprobó aplicando la prueba de  $\chi^2$  de Pearson a los resultados obtenidos. Se partió de la siguiente hipótesis nula: los resultados siguen una distribución aleatoria (cada cuadrante de la esfera tiene una probabilidad de 0.25 de aparecer en el "polo norte") (Tabla 1).

**Tabla 1** :Frecuencia de cada cuadrante de la esfera tras 100 lanzamientos y las frecuencias esperadas.

Cuadrante	Frecuencia (O <sub>i</sub> )	Frecuencias esperadas (E <sub>i</sub> )
1	23	25
2	24	25
3	26	25
4	27	25

Mediante la siguiente fórmula se obtuvo el estadístico de contraste ( $\chi^2$ ). Cuanto menor sea este valor, más se acercan los valores observados a los esperados y, por tanto, concuerdan con la hipótesis nula.

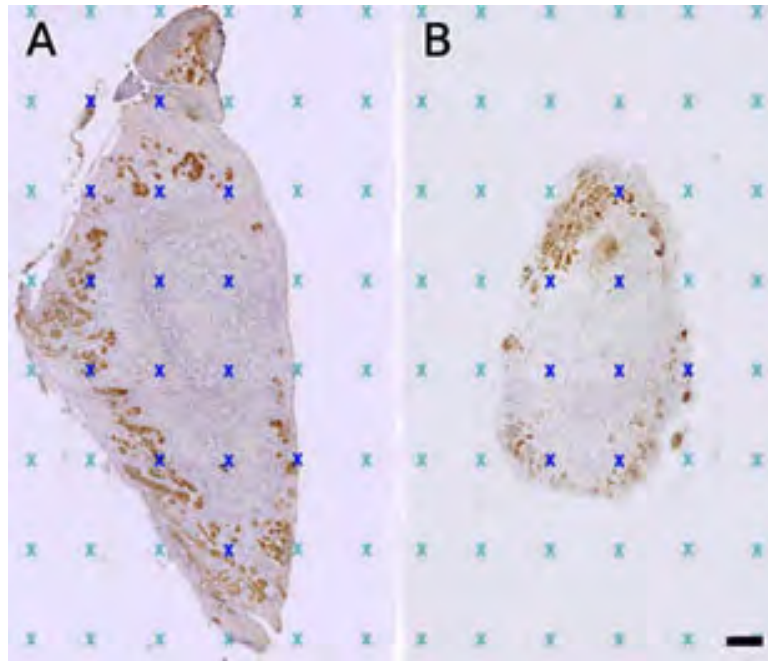
$$\chi^2 = \sum (O_i - E_i)^2 / E_i$$

$\chi^2$ : estadístico de contraste; O<sub>i</sub>: frecuencia observada; E<sub>i</sub>: frecuencia esperada.

El estadístico de contraste obtenido fue de 0.4. Este valor se comparó con el valor crítico de la distribución  $\chi^2$  con 3 grados de libertad (4 filas -1) y un  $\alpha=0.05$ . El valor de  $\chi^2$  (3) es de 7.82 > 0.4, por lo que se aceptó la hipótesis nula. Para un error  $\alpha=0.05$ , los datos se ajustaron a una distribución aleatoria, por lo que la técnica de la "esfera rodante" es adecuada para generar la orientación aleatoria de los bulbos.

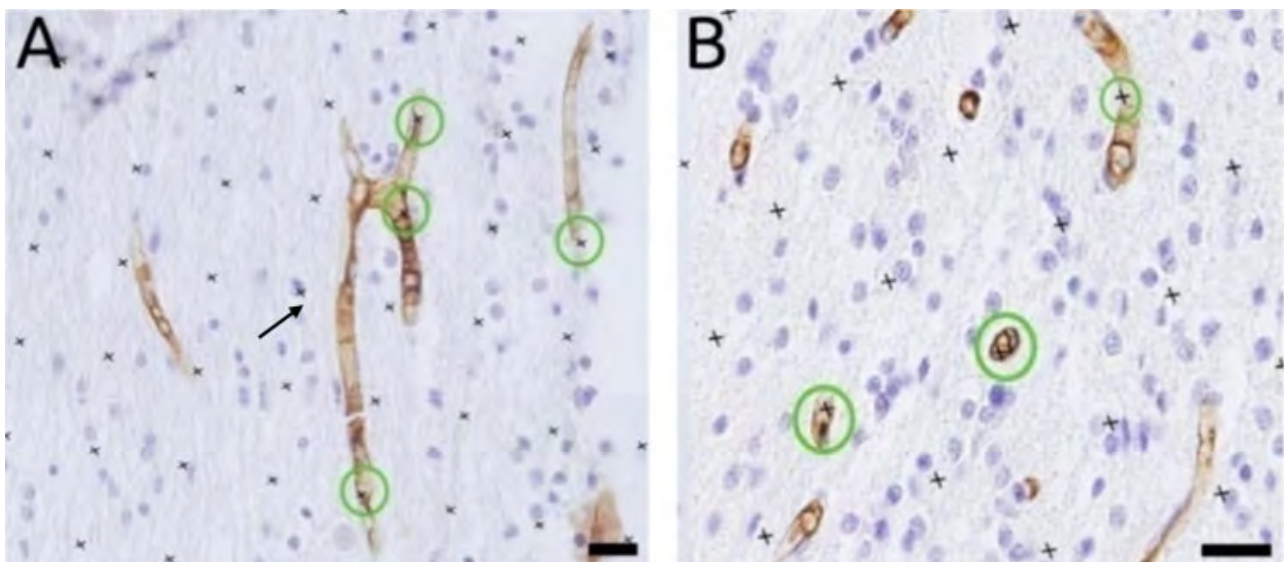
### 2. Volumen bulbar y volumen toral de la red capilar.

Mediante el método de Cavalieri se obtuvo tanto el volumen bulbar total como el volumen total de los capilares. Para el cálculo del volumen bulbar total se empleó una plantilla con un área asociada de 89401  $\mu\text{m}^2$  (299  $\mu\text{m}$  de lado) (Figura 5).



**Figura 5** :Cuantificación del volumen bulbar. A) y B) Panorámica de dos secciones de bulbo olfativo donde se observan las estructuras positivas para la lectina UEA y la plantilla del cálculo de volumen superpuesta. Las cruces en azul oscuro representan aquellos puntos de la plantilla que se cuentan puesto que se solapan con el tejido, mientras que las de color azul claro no se cuentan. Barra: 200  $\mu\text{m}$ .

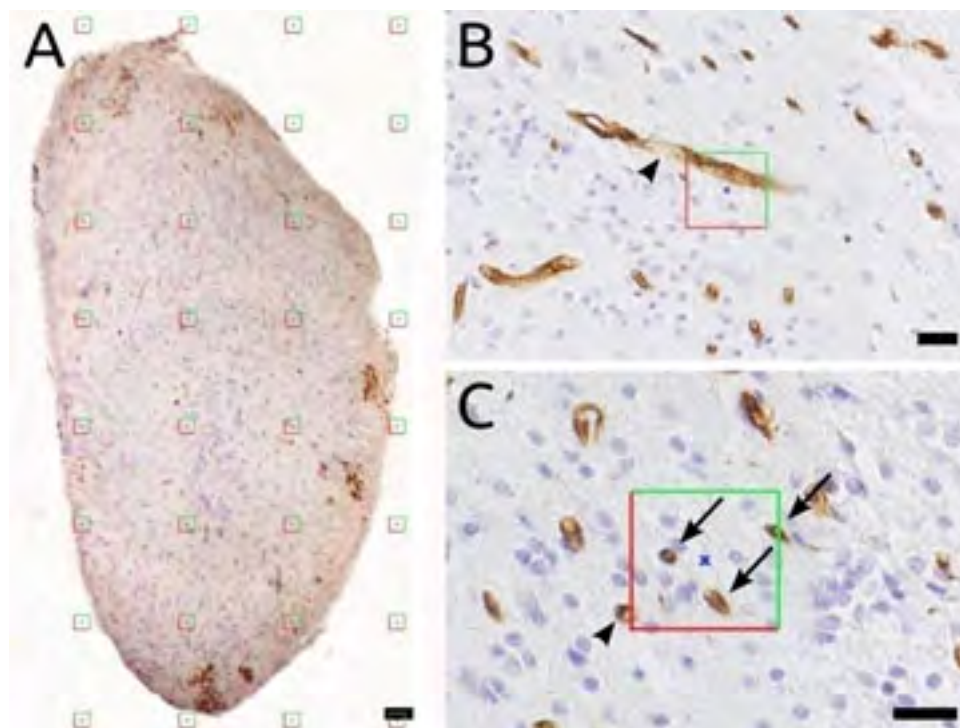
El volumen de capilares se obtuvo de la misma forma que el bulbar, utilizando una plantilla de un área asociada a cada punto de 1521  $\mu\text{m}^2$  (39  $\mu\text{m}$  de lado) (Figura 6).



**Figura 6** :Cuantificación del volumen total de capilares. Los puntos de la plantilla aparecen como cruces y los círculos verdes encierran a aquellos puntos que se cuentan porque se superponen con un capilar. A) Capilar longitudinal con tres puntos superpuestos (flecha). B) Capilares transversales y longitudinales en la zona granular con puntos de la plantilla superpuestos. Barras: 20  $\mu\text{m}$ .

### 3. Densidad de longitud de capilares

Para la estimación de este parámetro se empleó una plantilla con áreas cuadradas de muestreo de 2025  $\mu\text{m}^2$  (cada una de ellas, con 45  $\mu\text{m}$  de lado), que contenían líneas permitidas y líneas prohibidas. Esta se superpuso sobre cada corte y se contó el número de capilares totales que estaban dentro de cada área (Figura 7), siguiendo la regla descrita en Material y Métodos.



**Figura 7** :Cuantificación de la densidad de longitud. A) Panorámica de una sección de bulbo olfativo donde se observan estructuras marcadas con UEA y la plantilla de cálculo de densidad de longitud superpuesta. B) y C) Detalle de imágenes utilizadas para el cálculo de densidad de longitud. Las flechas marcan capilares que se consideran para el conteo, puesto que tocan al menos una línea verde (permitida) del área de muestreo o están en el interior de la misma. Las cabezas de flechas señalan capilares que no se cuentan, ya que tocan al menos una línea roja (prohibida). Barras: A: 200  $\mu\text{m}$ , B y C: 20  $\mu\text{m}$ .

### 4. Aplicación del método

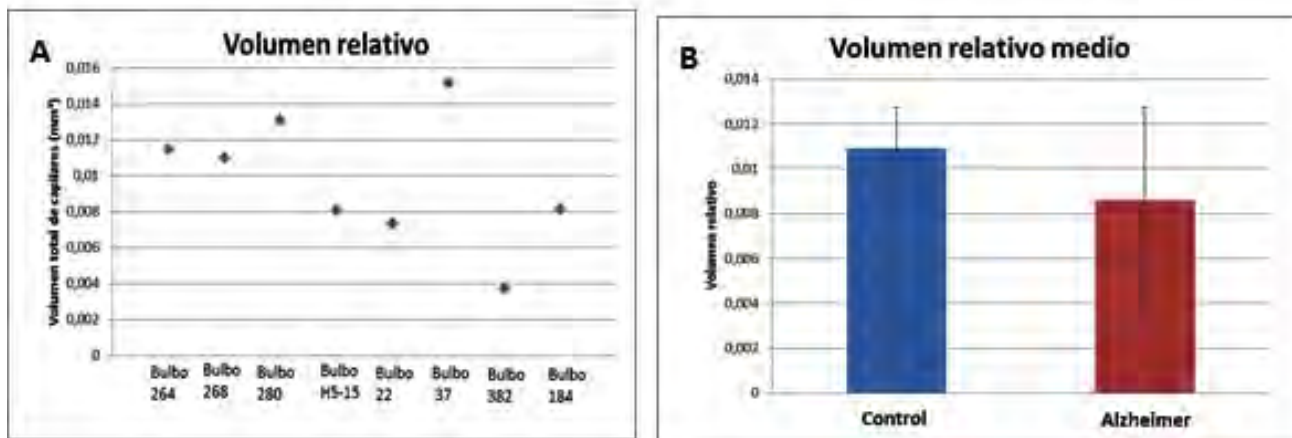
A continuación aparecen los resultados obtenidos con esta metodología y el análisis estadístico de varianza de un factor (ANOVA), para comprobar si había diferencias estadísticas que pudieran deberse a efectos provocados por la enfermedad de Alzheimer (Tabla 2; Tabla 3; Figura 8; Figura 9).

**Tabla 2** :Media y desviación estándar de volumen relativo y densidad de longitud en el grupo control y el grupo Alzheimer. D. E: desviación estándar.

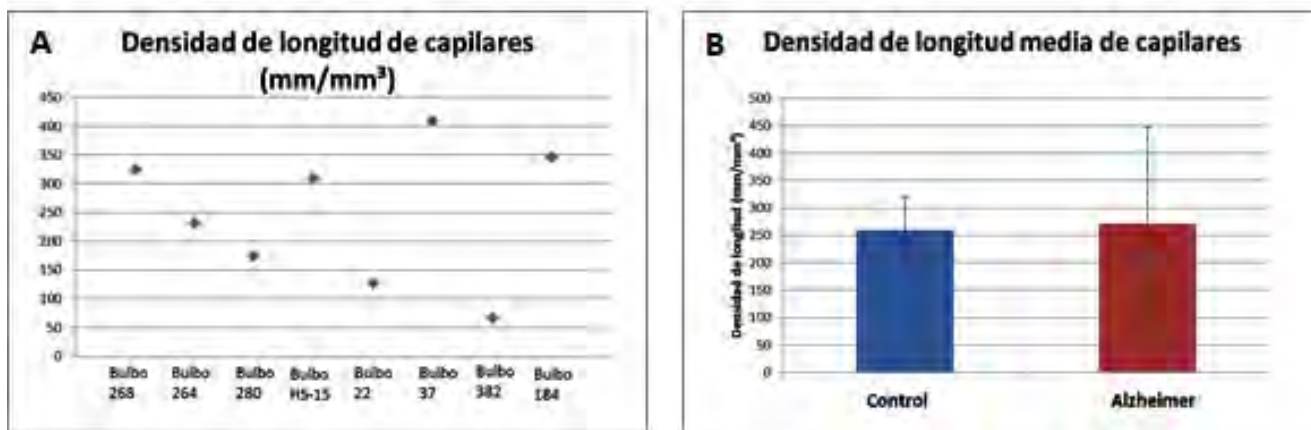
Grupo	Volumen relativo		Densidad de longitud	
	Control	Alzheimer	Control	Alzheimer
Media	0,011	0,008	259,803	201.019
D. E	0,002	0,005	60,802	149,376

**Tabla 3** :Resumen de los resultados del análisis ANOVA para determinar las diferencias significativas entre los grupos de bulbos olfativos. GL: grados de libertad.

Parámetro	GL	F	Sig.
Volumen relativo	7	0,804	0,404
Densidad de longitud	7	0,064	0,809



**Figura 8** :A) Volumen relativo (Volumen capilar / Volumen bulbar) de cada uno de los bulbos olfativos analizados. En rojo aparecen los bulbos olfativos pertenecientes a individuos con Alzheimer y en azul los individuos control. B) Volumen relativo medio de cada grupo. El análisis estadístico indica que no hay diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los bulbos control y enfermos (Tabla 3). En las barras de error se representa la desviación estándar (Tabla 2).



**Figura 9** :A) Densidad de longitud de capilares de cada uno de los bulbos olfativos. En rojo aparecen los bulbos olfativos pertenecientes a individuos con Alzheimer y en azul los individuos control. B) Densidad de longitud media de capilares de cada grupo. El análisis estadístico indica que no hay diferencias significativas entre el grupo de los bulbos control y el de los diagnosticados ( $p>0.05$ ) (Tabla 3). En las barras de error se representa la desviación estándar (Tabla 2).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Uno de los objetivos de este trabajo era medir la longitud capilar en tejido post mortem. En tejido vivo esto se ha realizado mediante microscopía intravital en ratones (Pries *et al.*, 1994). Sin embargo, en tejido post mortem es difícil obtener este valor con otra metodología que no sea mediante la obtención de secciones histológicas combinadas con la estereología. Existen 4 métodos estereológicos para estimar la longitud: las secciones VUR (“Vertical Uniform Random”), los planos isotrópicos virtuales, las esferas



isotrópicas virtuales y las secciones IUR ("Isotropic Uniform Random") (Mouton, 2011). El método de las secciones IUR se basa en la obtención de secciones con planos de corte aleatorios (ver Material y Métodos). No suele gustar a los biólogos, ya que si la estructura se corta al azar, en muchos casos no es fácil reconocerla. Sin embargo, presenta grandes ventajas respecto a los otros tres métodos: No es necesario equipamiento especializado, es adecuado para cortes finos y es fácil diseñar las plantillas para el recuento (el cicloide necesario para las secciones VUR es complicado). El bulbo olfativo es apropiado para este método ya que puede orientarse y cortarse fácilmente en cualquier plano y es un tejido sin partes duras por lo que la orientación no afecta a la calidad de los cortes.

El método para generar las secciones IUR empleado en el presente trabajo es una modificación del "isector" (Nyengaard & Gundersen, 1992), el cual consiste en embeber el objeto de estudio en una esfera de resina y hacerla rodar en todas direcciones, se detiene y se corta por el plano paralelo a la superficie. En nuestro caso el objeto de estudio no se embebe, sino que se introduce en el interior de una esfera hueca. Este método permite obtener planos de corte aleatorios de manera sencilla, rápida y barata. La aleatoriedad queda demostrada tras la realización de  $\chi^2$  de Pearson (ver Resultados). Además, la lectina UEA es un buen marcador de aferencias olfativas primarias y red capilar bulbar en tejido humano post mortem.

Los resultados obtenidos de densidad capilar son bastante semejantes a los obtenidos por Kreczmanski *et al.* (2005) en córtex frontal humano. Respecto al volumen capilar, no hay estudios en estructuras neurológicas. Wiebe & Laursen (1998) estimaron el volumen de la red capilar del pulmón, cuyo resultado es mayor al obtenido en el bulbo olfativo. Los resultados muestran que, con este pequeño tamaño muestral, no hay diferencias entre el grupo control y el grupo Alzheimer, aunque la variabilidad entre individuos del mismo grupo es muy alta y son necesarias más muestras para obtener unos datos más consistentes.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bhatnagar, K. P., Kennedy, R. C., Baron, G., Greenberg, R. A. (1987). Number of mitral cells and the bulb volumen in the aging human olfactory bulb: a quantitative morphological study. *Anat. Res.* 218: 73-87.
- Howard, C.V., Reed, M.G. (2005) *Unbiased stereology*. New York: Garland Science/BIOS Scientific Publishers
- Kreczmanski, P., Schmidt-Kastner, R., Heinsen, H., Steinbusch, H. W., Hof, P. R., Schmitz, C. (2005). Stereological studies of capillary length density in the frontal cortex of schizophrenics. *Acta Neuropathol.* 109(5): 510-518.
- Mouton, P. R. (2011). *Unbiased Stereology. A concise guide*. Baltimore, USA: Johns Hopkins University Press.
- Nyengaard, J. R., Gundersen, H. J. G. (1992). The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens. *J. Microsc.* 165(3): 427-431.
- Pries, A. R., Secomb, T. W., Gessner, T., Sperandio, M. B., Gross, J. F., Gaehtgens, P. (1994). Resistance to blood flow in microvessels in vivo. *Circ Res.* 75(5): 904-915.
- Rubinow, M. J., Mahajan, G., May, W., Overholser, J. C., Jurjus, G. J., Dieter, L., Herbst, N., Steffens, D. C., Miguel-Hidalgo, J. J., Rajkowska, C. A., Stockmeier, C. A. (2016). Basolateral amygdala volume and cell numbers in major depressive disorder: a postmortem stereological study. *Brain Struct Funct.* 221(1): 171-184.
- Wiebe, B., Laursen, H. (1998). Lung morphometry by unbiased methods in emphysema: bronchial and blood vessel volume, alveolar surface area and capillary length. *APMIS* 106(1! 6): 651-656.