



Revista Electrónica de Metodología Aplicada
2000, Vol. 5 n° 1, pp. 25-34

APLICACIONES DE LA ESTEREOLOGIA EN PSICOBIOLOGIA (II): LA PRECISION DE LAS ESTIMACIONES.

Azucena Begega*
Rubén Miranda*
Sandra Rubio*
Luis J. Santín**
Jorge L. Arias*

***Laboratorio de Psicobiología. Facultad de Psicología.
Universidad de Oviedo.**

***Departamento de Psicología Básica, Psicobiología y Metodología.
Facultad de Psicología. Universidad de Málaga.
e-mail: begega@uniovi.es**

ABSTRACT.

The applications of the stereology in Neuroscience have been improved by the recent advances in the precision of stereological estimates. Here we make a comparison between two methods of estimating the coefficients of error. The new formula described by Cruz-Orive (1999) incorporate the local or “nugget” effect in addition to the error due to the sections. The estimations derived from this formula are more precise in comparison with the previous formula described by Gundersen and Jensen (1987).

Key words: Stereology, nugget, particle number, point counting error, sectioning error, systematic sampling, neuron count .

1. Introducción.

En las últimas décadas hemos vivido el enorme desarrollo que han sufrido las investigaciones enmarcadas dentro de las Neurociencias. Debido a que la década de los años 90 ha sido definida como la década del cerebro, toda investigación desarrollada en torno al cerebro y sistema nervioso ha sido analizada y valorada muy positivamente. Dentro de este marco, la estereología ha ofertado una serie de métodos de cuantificación muy útiles a la vez que eficaces. La estereología ha aparecido como un conjunto de técnicas que permiten la estimación de parámetros como la densidad de células nerviosas, el volumen total de un área o núcleo cerebral cualquiera, la longitud de las dendritas, densidad de sinapsis, etc., obteniendo unos resultados fiables y precisos en dichas cuantificaciones (Braendgaard y Gundersen, 1986; Haugh, 1986; West, 1999).

La estereología ofrece una serie de ventajas importantes para los estudios enmarcados dentro del campo científico, entre ellas destacan por ejemplo la reducción en el número de sujetos que forman parte de la muestra sobre los que se harán las estimaciones de interés. Numerosas investigaciones sobre la eficacia de dichos métodos han determinado que con una muestra de 10 sujetos (10 animales) en la mayoría de los casos se obtendrán unas estimaciones fiables (West y Gundersen, 1990; West, 1993). Además no es necesario una cuantificación de todo el núcleo cerebral estudiado, sino que las estimaciones del parámetro de interés se realizarán sobre una muestra de secciones del total de cortes extraídos donde se incluye el núcleo (Sterio, 1984; Royet, 1991). Todo ello repercute en una disminución de tiempo empleado para estas cuantificaciones, pero sin perder precisión en las estimaciones realizadas. Por ello estos métodos son definidos como eficaces económicamente (Schmitz, 1998; West, 1999)

Desde los estudios estereológicos se ha hecho hincapié en aclarar términos que son utilizados de una manera confusa. Algunos de esos términos son los siguientes:

Eficacia económica (economic efficiency): cuando obtenemos una mayor precisión con el menor coste de tiempo. (Supone un conteo de menor nº de secciones, partículas ..., pero con la mayor precisión).

Precisión (precision): este término se encuentra estrechamente relacionado con la varianza encontrada en las estimaciones. Cuanto menor sea la varianza mayor será la precisión.

Insesgado (accuracy, unbiased): Una estimación será insesgada si el promedio de diferentes medidas da lugar al valor real. Para garantizar una estimación insesgada nos basamos en el uso de la aleatorización en la asignación de los animales a los grupos y en la elección de las secciones a cuantificar. Por otro lado, utilizamos un muestreo sistemático y aplicamos el disector para que todas las partículas contenidas en los campos impuestos por el muestreo, tengan igual probabilidad de ser cuantificadas.

Por lo tanto, la precisión de un estimador y la ausencia de sesgo no son los mismos

conceptos y se pueden dar distintas combinaciones entre ellos. Lo que interesa al investigador es que las estimaciones sean precisas e insesgadas (West, 1999).

Las estimaciones de los parámetros numéricos que estamos investigando mediante el uso de esquemas de muestreo estereológicos (ej., el fraccionador óptico) deberían ser acompañados de una estimación de la precisión de tal estimación numérica. Es decir, se debe explicitar la contribución de las distintas fuentes de variación: intersujeto (varianza biológica, estimada a través del Coeficiente de Variación -CV-) e intrasujeto. Esta última se compone de dos factores: el error local (nugget error) y el error debido a las secciones. La estereología nos ofrece las herramientas necesarias para calcular su propia eficacia o precisión; por ello en la mayoría de los estudios realizados sobre cualquier núcleo cerebral empleando las técnicas estereológicas se exige un conocimiento y cálculo de las principales fuentes de variación que están presentes en las estimaciones realizadas. Además de requerir su cálculo, también se exige que se compruebe la precisión de las estimaciones estereológicas, determinando cuál es su peso o influencia sobre las cuantificaciones realizadas:

$$\frac{\overline{CE}^2}{CV^2}$$

Como cabe suponer si la variación mayor de los datos obtenidos es debido a la cuantificación estereológica (valores superiores a 0,25 en la expresión), esos datos deberán ser revisados puesto que la mayor fuente de variación en este tipo de estudios siempre debería ser debida a la variabilidad intersujetos.

Pero la estereología asegura la fiabilidad de sus estimaciones siempre y cuando se tengan en cuenta ciertos requisitos como son la aleatorización y el muestreo sistemático de las secciones. Quizás sea éste el factor más destacado en este tipo técnicas puesto que se logra que la elección de las regiones para la cuantificación no dependa del investigador (Royet, 1991). Clásicamente, las investigaciones sobre tejido nervioso consistían en la cuantificación de los parámetros ya anteriormente mencionados, pero eran inevitablemente elegidas aquellas secciones donde se visualizaban perfectamente las células nerviosas, orgánulos, etc., de interés. Eran elegidos aquellos componentes de mayor tamaño, o bien aquellas regiones donde se evidenciaban una mayor densidad, etc. Todo ello sesgaba claramente las estimaciones, lo cual con estos métodos estereológicos es evitado puesto que el investigador no elige los campos para su cuantificación sino que estos ya se encuentran definidos y son desconocidos por el investigador (Begega et al., 1998).

2.- Método.

En nuestro trabajo tras emplear el fraccionador óptico (West et al., 1991; Begega et al., 1998) hemos calculado la contribución de dicho método estereológico a las estimaciones realizadas, es decir, CV y CE (error debido a las secciones y error local). Frente a las fórmulas ya usadas para la estimación de los coeficientes de error de las estimaciones estereológicas dadas en los últimos años, como, la fórmula propuesta por Gundersen y Jensen (1987), aplicada por West y Gundersen (1990) recogidas por Schmitz (1998), se ha propuesto el

cálculo de la variación debida al conteo de las partículas dentro de una misma sección, considerando que esta fuente podría ser la que tienen una mayor influencia dentro del CE total.

$$CE = \frac{\sqrt{(3A + C - B)/12}}{\sum P_i}$$

$$\text{Donde } A = \sum_{i=1}^m P_i^2 \quad B = \sum_{i=1}^{m-1} P_i \cdot P_{i+1} \quad C = \sum_{i=1}^{m-2} P_i \cdot P_{i+2}$$

siendo P_i = puntos contados - neuronas-.

Cruz-Orive (1999) ha señalado la importancia de dos factores dentro de la fuente de variación intrasujeto: por un lado el factor de variación dada entre secciones de un mismo sujeto y por otro lado, la variación dada en la misma sección debido a su cuantificación. Este factor se encuentra definido como "nugget error" y debemos recordar que este podría darse cuando nos encontramos estimando el área contada en una sección o bien el número de partículas contadas en un campo determinado sobre una sección. Se propondrá una nueva formula para la predicción de la variación intrasujeto en la que se englobarían las variaciones dadas entre las secciones de un núcleo determinado en un sujeto específico, además de determinar la variación dentro de una misma sección (Cruz-Orive, 1999).

$$CE^2(\hat{Q}_i) = 1/240 \cdot \left\{ 3 \left(\hat{A} - \sum_{i=1}^m P_i \right) + \hat{C} - 4\hat{B} \right\} / \left(\sum_{i=1}^m P_i \right)^2 + 1 / \sum_{i=1}^m P_i$$

Donde:

$$Nugget = 1 / \sum_{i=1}^m P_i$$

y,

$$Secciones = 1/240 \cdot \left\{ 3 \left(\hat{A} - \sum_{i=1}^m P_i \right) + \hat{C} - 4\hat{B} \right\} / \left(\sum_{i=1}^m P_i \right)^2$$

Esta fórmula supone una mejora en la precisión de la estimación de los Coeficientes de Error. Frente a la fórmula de Gundersen y Jensen (1987) que no tiene en cuenta el error local o "nugget" además, nos permite ver desglosado la contribución al CE total del error local por un lado y del error debido a las secciones por otro.

3.- Un ejemplo de aplicación.

A continuación se presenta un ejemplo con datos reales de una rata macho castrada, para la aplicación de la nueva fórmula de Cruz-Orive (1999) en comparación con la fórmula primera de Gundersen y Jensen (1987).

Los datos han sido extraídos de la cuantificación de n° neuronal del Bulbo Olfatorio Accesorio de rata. Se ha utilizado el fraccionador óptico como esquema de muestreo (Begega et al., 1998) donde el núcleo ha sido cortado según secciones de Cavalieri (Korbo et al., 1990) de las que se cuantifican 5 para estimación de n° neuronal.

Sección	P_x	P_x^2	$P_x \cdot P_{x+1}$	$P_x \cdot P_{x+2}$
1	40	1600	2720	2760
2	68	4624	4692	4420
3	69	4761	4485	3933
4	65	4225	3705	-
5	57	3249	-	-
Total (Σ)	299	18459	15602	11113

Tabla I. Datos del conteo del n° neuronal.

	Gundersen y Jensen, 1987	Cruz-Orive, 1999
CE²	0.0037	0.00348
CE	0.0616	0.05899

Tabla II. Resultados de la comparación de las fórmulas 2 y 3.

Se puede apreciar como la fórmula de Cruz-Orive nos da valores de CE total más bajo (mayor precisión) frente a la fórmula de Gundersen y Jensen.

4.- Resultados y discusión.

1. Por un lado comprobamos como se produce una mejora en la precisión de las estimaciones aplicando la nueva fórmula de Cruz-Orive (1999) frente a la fórmula de Gundersen y Jensen (1987).

Animal	CE (Gundersen y Jensen, 1987)	CE (Cruz-Orive, 1999)
1	0.061	0.056
2	0.080	0.020
3	0.079	0.059
4	0.067	0.056
5	0.088	0.061
6	0.074	0.067
7	0.080	0.059
Mean CE	0.075	0.054

Tabla 1: Comparación de los CE(n° neuronal) grupo Machos Castrados.

Animal	CE (Gundersen y Jensen, 1987)	CE (Cruz-Orive, 1999)
1	0.157	0.093
2	0.175	0.099
3	0.111	0.093
4	0.174	0.090
5	0.137	0.087
6	0.235	0.104
7	0.133	0.091
Mean CE	0.155	0.094

Tabla 2: Comparación de los CE(n° neuronal) grupo Hembras Androgenizadas.

Animal	CE (Gundersen y Jensen, 1987)	CE (Cruz-Orive, 1999)
1	0.169	0.095
2	0.113	0.109
3	0.206	0.119
4	0.154	0.095
5	0.190	0.112
6	0.123	0.097
7	0.117	0.098
8	0.139	0.105
Mean CE	0.147	0.104

Tabla 3: Comparación de los CE (n° neuronal) grupo Machos Intactos.

Animal	CE (Gundersen y Jensen, 1987)	CE (Cruz-Orive, 1999)
1	0.117	0.129
2	0.112	0.114
3	0.121	0.089
4	0.116	0.100
5	0.148	0.107
6	0.171	0.109
7	0.189	0.101
8	0.117	0.095
9	0.121	0.098
10	0.161	0.100
11	0.152	0.092
Mean CE	0.138	0.103

Tabla 4: Comparación de los CE (n° neuronal) grupo Hembras Intactas.

Obviamente, se recomendaría el uso de la nueva fórmula de Cruz-Orive ya que nos ofrece una mejora en la precisión de las estimaciones de los Coeficientes de Error.

2. Por otro lado, presentamos los resultados de la aplicación de la fórmula de Cruz-Orive (1999) en dos grupos de ratas (hembras intactas y machos castrados). En las tablas 5 y 6 se puede observar como se desglosa las fuentes de error mencionadas como son el nugget

y el error debido a las secciones. La suma de estas dos fuentes de error es lo que daría lugar al CE total que se expresa al cuadrado.

Animal	Nugget	Secciones	CE*
1	0.01639 (97%)	0.000482 (3%)	0.01687
2	0.01265 (96%)	0.000478 (4%)	0.01312
3	0.00747 (92%)	0.000648 (8%)	0.00805
4	0.00952 (94%)	0.000559 (6%)	0.01008
5	0.01052 (91%)	0.000974 (9%)	0.01150
6	0.01075 (89%)	0.001338 (11%)	0.01209
7	0.00847 (83%)	0.001693 (17%)	0.01016
8	0.00854 (93%)	0.000580 (7%)	0.00912
9	0.00917 (93%)	0.000622 (7%)	0.00979
10	0.00884 (87%)	0.001196 (13%)	0.01004
11	0.00751 (87%)	0.001070 (13%)	0.00858

Tabla 5: Resultados de la aplicación de la fórmula de Cruz-Orive (1999) para la estimación de los Coeficientes de Error en el grupo de ratas hembras intactas.

Animal	Nugget	Secciones	CE*
1	0.00602 (91%)	0.000580 (9%)	0.00660
2	0.00584 (86%)	0.000946 (14%)	0.00679
3	0.00540 (89%)	0.000700 (11%)	0.00610
4	0.00529 (88%)	0.000692 (12%)	0.00598
5	0.00606 (88%)	0.000839 (12%)	0.00690
6	0.00877 (94%)	0.000518 (6%)	0.00929
7	0.00564 (85%)	0.001030 (15%)	0.00668

Tabla 6: Resultados de la aplicación de la fórmula de Cruz-Orive (1999) para la estimación de los Coeficientes de Error en el grupo de ratas macho castradas.

Como podemos observar la mayor contribución al CE total procede de las variaciones debidas al conteo dentro de una misma sección coincidiendo con los comentarios de Cruz Orive, 1999. En la mayoría de los casos estudiados se ha confirmado que en el coeficiente de error total (CE), la mayor contribución es debida al error local, el que corresponde a las estimaciones realizadas sobre la sección, en el conteo de puntos; mientras que la contribución de las variaciones entre las secciones de un mismo sujeto es prácticamente insignificante.

Por lo tanto podríamos decir que para una mejora en la precisión de nuestras estimaciones podríamos incrementar el número de partículas cuantificadas sin tener que incrementar el número de secciones puesto que al aumentar el número de puntos o partículas contadas siguiendo la fórmula de Cruz-Orive (1999), el efecto nugget o error local disminuiría dando lugar a un CE total más bajo.

3. Finalmente, hemos calculado la precisión de la estereología siguiendo la fórmula anteriormente mencionada. Con esta fórmula vemos la relación entre la fuente de variación intrasujeto (CE) y la fuente de variación intersujeto (CV). Del resultado de esta razón depende que se considere que la estereología se haya aplicado de forma eficaz puesto que su contribución de error sea menor que la propia varianza biológica expresada como CV². Se ha establecido que una razón con un resultado en torno al 25% indicaría que la estereología ha sido aplicada con éxito (West et al., 1991; West, 1993).

GRUPO	\overline{CE}^1	CV^2	\overline{CE}^2 / CV^2
HEMRAS INTACTAS	0.107	0.445	0.2404 (24%)
MACHOS CASTRADOS	0.029	0.109	0.2660 (26%)

Tabla 7: Cálculo de la precisión de la estereología en el grupo de ratas hembra intactas y ratas macho intactos.

A la vista de estos resultados parece que la estereología es un conjunto de técnicas en continua evolución, muy útiles para las investigaciones en el marco de la Psicobiología o las Neurociencias cuando necesitemos hacer estimaciones numéricas, que puedan ayudarnos a entender y explicar el funcionamiento del sistema nervioso en relación con el comportamiento. Son técnicas relativamente sencillas en su aplicación con las que se consigue alta precisión en la medida al menor coste de tiempo posible. Y nos ayudan a que los datos sobre los que se apoyan nuestras conclusiones sean firmes o fiables ya que podemos calcular hasta que niveles de error estamos introduciendo en las medidas finales.

5.- Referencias.

- Begega, A., Miranda, R., Rubio, S., Santín, L.J., Cuesta, M. y Arias, J.L. (1998). Aplicaciones de la Estereología en Psicobiología. *Revista Electrónica de Metodología Aplicada*, vol 3(1), 30-40.
- Braendgaard, H. and Gundersen, H.J.G. (1986). The impact of recent stereological advances on quantitative studies of nervous system. *Journal of Neuroscience Methods*, 18, 39-78.
- Cruz-Orive, L. M. (1999). Precision of Cavalieri sections and slices with local errors. *Journal of Microscopy*, 193(3), 182-198.
- Gundersen y Jensen (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*, 147, 229-263.
- Haug, H. (1986). History of the neuromorphometry. *Journal of Neuroscience Methods*, 18, 1-17.

- Korbo, L., Pakkenberg, B., Ladefoged, O., Gundersen, H.J.G., Arlien-Soborg, P. and Pakkenberg, H. (1990). An efficient method for estimating the total number of neurons in rat brain cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, 31, 93-100.
- Royet, J.P. (1991). Stereology: a method for analyzing images. *Progress in Neurobiology*, 37, 433-474.
- Schmitz, C. (1998). Variation of fractionator estimates and its prediction. *Anat. Embryology*, 198, 371-397.
- Sterio, D.C. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy*, 134, 127-136.
- West, M.J. (1993). New stereological methods for counting neurons. *Neurobiology of Aging*, 14, 275-285.
- West, M.J. (1999). Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends in Neuroscience*, 22(2), 51-61.
- West, M.J. and Gundersen, H.J.G. (1990). Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the Human Hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 296, 1-22.
- West, M.J., Slomianka, L., and Gundersen, H.J.G. (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivision of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical Record*, 231, 482-497.