

Análisis morfométrico digital de la piel

ZÚÑIGA V., TADEO I., NAVARRO S., NOGUERA R.

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA – FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA – UNIVERSIDAD DE VALENCIA;
FUNDACIÓN INVESTIGACIÓN CLÍNICO DE VALENCIA-INCLIVA
rnoguera@uv.es

Resumen

Objetivo: Proponer el uso de la infraestructura digital morfométrica para la cuantificación microscópica objetiva de elementos celulares y de la matriz extracelular en heridas y cicatrizaciones de la piel. Descripción de posibles usos, ventajas e inconvenientes. Presentación de una propuesta en diversos cortes histológicos del sistema tegumentario.

Material y métodos: En el ejemplo empleado se utilizaron cortes de piel fina sana teñidos con técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas. Las muestras se digitalizaron con el escáner Panoramic MIDI (3D Histech Ltd.) y las imágenes obtenidas se analizaron con el software Panoramic Viewer v.1.15 (3D Histech Ltd) para cuantificar elementos celulares y con el software Image Pro-plus v.6.0 (Media Cybernetics) para cuantificar y caracterizar elementos fibrosos de la matriz extracelular.

Resultados: Por un lado cuantificamos las células CD1a+ de la epidermis y la dermis detectando 164 elementos positivos por mm² y 2.039 elementos negativos por mm²; representando el 7,46% de las células cutáneas y, por tanto, las células de Langerhans epidérmicas y macrófagos dérmicos. También valoramos fibras de la matriz extracelular en las capas papilar y reticular de la dermis. En relación con las fibras elásticas, se cuantificó un número mayor por unidad de área con mayor porcentaje de área teñida en la dermis profunda o capa reticular. Mientras que, para las fibras de colágeno, se detectó mayor cantidad por unidad de área con menor porcentaje de área teñida en la dermis superficial o capa papilar. Con respecto a las características de las fibras elásticas en las dos capas, distinguimos que formaban redes más ovoides, estaban dispuestas de forma más oblicua a la epidermis y eran más cortas, estrechas y rectilíneas en la dermis papilar. Para las fibras de colágeno detectamos que formaban haces más redondeados, estaban dispuestos de forma más perpendicular a la epidermis y eran más cortos, estrechos y ondulados en la dermis papilar.

Conclusiones: La cuantificación objetiva de células y fibras de la matriz extracelular en imágenes microscópicas digitalizadas proporciona una herramienta rápida, fiable y discriminativa que puede ser útil para numerosos estudios cutáneos.

Palabras Clave: Herida – Cicatrización – Estudio Histológico – Piel.

Abstract

Digital morphometric analysis of skin elements

Aim: To propose the use of digital morphometric infrastructure for the objective microscopic quantification of cells and extracellular matrix elements in skin wounds and scars. To describe its possible uses, advantages and disadvantages. The proposal is presented by means of several histological cuts of the integumentary system.

Material and methods: In our example, healthy thin skin cuts were stained by using histochemical and immunohistochemical techniques. The samples were digitized with the scanner Panoramic MIDI (3D Histech Ltd), and the images were analyzed with the software Panoramic Viewer v.1.15 (3D Histech Ltd) to quantify cellular elements, and the software Image Pro-plus v.6.0 (Media Cybernetics) to quantify and characterize fibrous elements of the extracellular matrix.

Results: On the one hand, we quantified the CD1a+ cells in the epidermis and dermis detecting 164 positive elements per mm² and 2.039 negative elements per mm², representing the 7.46% of the cutaneous cells, and therefore, epidermal Langerhans cells and dermal macrophages. Moreover, we quantified fibers from the extracellular matrix in both papillary and reticular dermal layers. Regarding elastic fibers, they were more abundant and took up more stained area in the deep or reticular dermis. Concerning collagen fibers, they were more abundant and took up less stained area in the superficial or papillary dermis. On the other hand, we characterized both types of fibers in the dermal layers. With respect to the elastic fibers, they form more ovoid networks, they were arranged more oblique to the epidermis and were shorter, narrower and more straight in the papillary dermis. Regarding the collagen fibers, they formed, mainly, more round cross-linked bundles, arranged more perpendicular to epidermis and they were shorter, narrower and wavier in the papillary dermis.

Conclusions: The objective quantification of cells and extracellular matrix fibers in digitized microscopic images provide us with a quick, reliable and high-resolution tool, which can be useful for numerous skin studies.

Keywords: Wound – Scar – Histopathology – Skin.

INTRODUCCIÓN

Durante las etapas de curación de heridas: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación, acontecen numerosos cambios biológicos que generan cambios en la matriz extracelular (MEC) y en las células no solo de la zona, sino también de todo el organismo⁽¹⁾. Facilitar estos cambios ayuda a mejorar el proceso de cicatrización y evitar problemas crónicos. La detección, cuantificación, caracterización y organización de los elementos que intervienen en la zona dañada en dichos procesos pueden objetivarse, gracias a las imágenes microscópicas digitalizadas de muestras de tejidos previamente teñidos, mediante el uso de softwares. Esto provee al investigador de herramientas para establecer métodos robustos que pueden ser automatizados y que poseen gran especificidad⁽²⁾. La infraestructura digital puede ser utilizada tanto para el estudio en heridas agudas y crónicas, como con otras patologías que afectan a la piel, tales como carcinomas o melanomas⁽³⁻⁵⁾. La bioimagen es útil para el análisis de cualquier tejido u órgano sano o enfermo⁽⁶⁻¹⁰⁾.

Podemos encontrar múltiples estudios de la piel basados en la cuantificación subjetiva de los elementos celulares y de la MEC mediante métodos de conteo por campos y usando objetivos microscópicos de diferente aumento (desde 20x a 100x). En el estudio sobre cicatrización dérmica de Stuart y cols, además de cuantificar fibras de colágeno, también hicieron uso de una escala subjetiva para caracterizar, entre otros elementos, las células inflamatorias, fibroblastos y células gigantes presentes en la herida⁽¹¹⁾. Otro ejemplo interesante lo encontramos en un estudio sobre la implicación en la curación de heridas humanas de los mastocitos presentes en el margen de la lesión. Se empleó la serina proteasa triptasa como inmunomarcador de estas células, y el conteo se realizó con el microscopio óptico, de múltiples campos separados, con un aumento de 20x⁽¹²⁾. Por último, podemos reseñar otros estudios con modelos murinos sobre el proceso de cicatrización donde también se realizó el conteo subjetivo por campos con un aumento de 20x no solo de macrófagos, sino también de miofibroblastos inmunoteñidos previamente⁽¹³⁾. Sin embargo, cada vez es más frecuente encontrar en la bibliografía estudios realizados mediante el uso de las técnicas de imagen para cuantificar y caracterizar los diferentes elementos celulares y acelulares presentes en cualquier tejido, y en concreto en cicatrización y heridas cutáneas, de una manera más objetiva. De esta manera podemos encontrar la existencia de numerosos softwares capaces de llevar a cabo esta tarea. Algunos ejemplos son el Optimas software system v.6.1, (Optimas Corporation, Green Bay, WI, USA) que fue usado para cuantificar células de Langerhans marcadas con anticuerpos específicos en tumores cutáneos⁽¹⁴⁾, o el Leica Imaging Systems (Cambridge, UK)⁽¹⁵⁾. Este último software fue utilizado para cuantificar células VEGF positivas y el porcentaje de área teñida de fibras de colágeno en un estudio sobre el efecto de las células madre mesenquimáticas (MSC) derivadas de médula ósea sobre la regeneración de heridas in-

ducidas en rata⁽¹⁶⁾. De manera similar, el software de análisis de imagen NIH Image (de dominio público), fue utilizado para medir el área de la herida durante el proceso de cicatrización en estudios sobre atracción de macrófagos y células endoteliales por parte de las MSC durante el proceso de regeneración de heridas⁽¹⁷⁾, y el software Image J (NIH) fue empleado para cuantificar fibras de colágeno y para medir el área de la herida en un estudio sobre la degradación del colágeno en el proceso de cicatrización⁽¹¹⁾. Además de los previamente nombrados, existen otros softwares aplicados en estudios de diversas patologías de cuantificación de células y elementos de la MEC como el ImageScope (Aperio technologies) y el CellProfiler (Broad Institute)^(18, 19).

El uso de esta metodología de análisis de imagen para la cuantificación objetiva de células y elementos de la MEC, que fue bautizada por algunos autores como "slide-based histocytometry", presenta ventajas respecto al análisis al microscopio óptico usando escalas objetivas de cuantificación, donde se estandariza la intensidad de la tinción y la proporción de células teñidas, con menores costes económicos, mayor eficiencia de análisis de numerosos casos, mayor facilidad de acceso a la información y capacidad de almacenamiento⁽²⁰⁾. También presenta ventajas técnicas como mayor facilidad para explorar o "viajar" por la muestra y regular rápidamente el aumento de la imagen, evitando así la posibilidad, sobre todo con objetivos de gran aumento, de perder el área o elemento que se está observando. Así mismo dota al investigador de una mayor precisión, sensibilidad y mayor poder de validación entre observadores. Por otro lado el uso de esta metodología no está desprovista de inconvenientes, como la necesidad de validación y estandarización de los resultados por parte de especialistas para su uso diagnóstico traslacional, el coste de las herramientas (tanto el precio del software como del hardware puede ser desorbitado) y el requisito de imágenes de calidad. La obtención de una buena calidad de imagen dependerá de los procedimientos técnicos previos como el correcto corte de la muestra, con el mismo grosor en todos sus puntos, la tinción histoquímica (HQ), inmunohistoquímica (IHQ) o inmunofluorescente y el escaneado^(6, 21-24).

En la literatura podemos encontrar numerosos trabajos que pudieran beneficiarse al aplicar la cuantificación objetiva celular y de elementos de la MEC en el proceso de cicatrización⁽²⁵⁻³⁰⁾. Hemos seleccionado algunos de ellos, resaltando algunos beneficios que se podrían obtener tras la aplicación de las herramientas de análisis de imagen que se describen en este trabajo. Esta aplicación podría ser extensible a otros trabajos de análisis de los procesos de reparación y/o procesos patológicos. Mediante el análisis de imagen microscópica con el software Panoramic Viewer, que describiremos en primer lugar, y en base a la morfología celular y al marcaje con anticuerpos frente a antígenos celulares específicos, se podría detectar y objetivar la excesiva infiltración de neutrófilos como marcador de heridas crónicas, por liberar colagenasa, elastasa, etc⁽²⁵⁾. A través de esta herramienta, estas células podrían ser cuantificadas y sus niveles estandarizados para

conocer mejor sus relaciones funcionales. Por otro lado, se ha comprobado que las MSC intervienen en las diferentes fases del proceso de cicatrización coordinando numerosos cambios biológicos⁽²⁶⁾. Con anticuerpos como el CD105 o CD166 podrían detectarse y secuencialmente cuantificarse, de forma precisa, estas células a lo largo de las diferentes fases del proceso de cicatrización con alguno de los métodos reseñados. También hay una creciente evidencia de que las disfunciones macrofágicas afectan el proceso de cicatrización⁽²⁷⁾. Con este software de análisis de imagen se puede detectar, tras utilizar anticuerpos como CD163 o CD68, los tipos de macrófagos M1 y M2, y ver su número y distribución relacionándolo con las células vecinas. Así mismo, en estudios sobre cicatrización, intentar caracterizar morfométricamente fuerzas biomecánicas implicadas como las fibras de colágeno y elásticas, es esencial para la aplicación adecuada de la mecanoterapia⁽²⁸⁾. Mediante el análisis de imagen microscópica con el software Image Pro-plus, que describiremos en segundo lugar, y en base a la morfología de los elementos de interés (como fibras elásticas y colágenas) y a su tinción histoquímica (orceína, tricrómico de Masson y picrosirius red) se han descrito cambios en las fibras de tejido conjuntivo de la dermis según la edad^(29, 30). Mediante la técnica de imagen microscópica, aplicando diversos métodos, como los descritos por Tadeo y cols, es posible caracterizar parámetros de cantidad, tamaño, orientación y forma de las fibras de la MEC⁽⁹⁾. También es posible, mediante el solapamiento de imágenes y con la aplicación de la teoría

de grafos, hacer estudios sobre la organización y relación de los diferentes elementos que constituyen los tejidos en estudios topológicos recientemente descritos en patología muscular⁽³¹⁾.

En el presente trabajo y a través del análisis de imágenes microscópicas obtenidas de piel sana proponemos el uso de técnicas morfométricas que permitan el análisis y cuantificación objetiva de cualquier tipo celular o elemento forme de la MEC, previamente detectado gracias a marcadores HQ y/o IHQ.

MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se detallan algunas de las herramientas de cuantificación (softwares) y de los métodos (algoritmos o parámetros de segmentación) que se pueden utilizar en el análisis de imagen microscópica de la piel. Para presentar nuestra propuesta, se han utilizado las imágenes correspondientes a muestras de piel previamente teñidas con técnicas IHQ e HQ de la Unidad de Histología del Departamento de Patología de la Universidad de Valencia (www.histomed.es). Las tinciones utilizadas fueron el anti-CD1a (que detecta los gránulos de Birbeck de las células de Langerhans epidérmicas y macrófagos dérmicos), orceína (fibras elásticas) y tricrómico de Masson (fibras de colágeno). Las preparaciones teñidas se digitalizaron con el escáner Panoramic MIDI (3D Histech Ltd.), a una ampliación de 20X y con una resolución de 0.33 μm

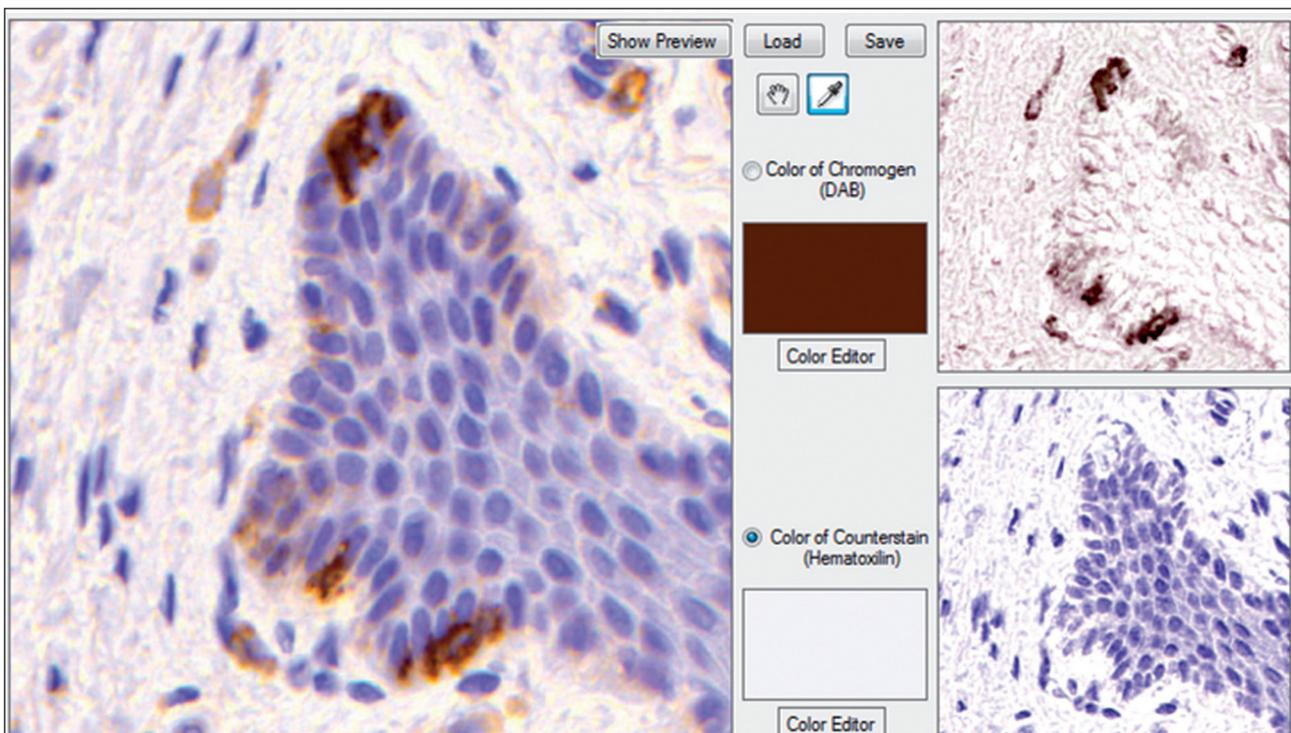


Figura 1. La configuración de la deconvolución del color. Primer paso para la configuración del algoritmo de cuantificación con el programa Panoramic Viewer v 1.15 (3D Histech Ltd.). A la izquierda se observa la imagen original (obtenida tras la inmunotinción con CD1a), y a la derecha los colores detectados por el software como cromógeno (arriba) y como contratinción (abajo).

por píxel. Como ejemplos, para cuantificar bien las células dendríticas de Langerhans en la epidermis, aplicamos la metodología de segmentación nuclear para identificar y clasificar la positividad celular con el software Panoramic Viewer. Como prototipo de cuantificación de las fibras de colágeno y elásticas en la dermis papilar y reticular proponemos algoritmos de configuración específica utilizando el software Image Pro-plus.

CUANTIFICANDO ELEMENTOS CELULARES DE LA PIEL MEDIANTE EL PROGRAMA INFORMÁTICO PANORAMIC VIEWER

El primer paso para trabajar con el programa Panoramic Viewer, es seleccionar el área de la imagen digitalizada que queremos analizar. En dicha área se cuantificarán los elementos positivos gracias al algoritmo o parámetros de segmentación. Para la configuración del algoritmo de cuantificación objetiva de los infiltrados celulares de la piel hemos de tener en cuenta la localización celular del antígeno detectado con la técnica IHQ. El programa utilizado nos permite seleccionar entre a) localización antigénica nuclear, b) de membrana, c) de densidad o d) de fluorescencia. Tras realizar en varias áreas tentativas de aproximación "prueba-error" aplicando los algoritmos de localización antigénica de membrana y nuclear, se decidió aplicar el algoritmo nuclear, como ejemplo de cuantificación de las células de Langerhans en la piel fina, al ser células muy irregulares, con escaso citoplasma, a pesar de que el marcador anti-CD1a detecta antígenos de membrana. Para realizar la segmentación de los elementos positivos de una imagen, el programa informático utiliza la detección del color del cromógeno asociado al anticuerpo, que habitualmente es diaminobenzidina (DAB), y el color de la contratinción, habitualmente hematoxilina (H), basándose en los parámetros de color que vienen por defecto en el programa. Éstos pueden editarse seleccionando determinados píxeles de la imagen con mayor o menor intensidad de color, en la opción de configuración de la deconvolución del color. También pueden editarse variando la intensidad de cada uno de los tres canales de color: rojo (R), verde (G) y azul (B) (Fig 1).

Además del color, los parámetros necesarios a ajustar para la creación del algoritmo nuclear incluyen:

- Radio. Se pueden introducir un valor máximo y un valor mínimo para acotar el área detectada.
- Área mínima. A mayores valores introducidos, mayor es el tamaño de los posibles núcleos troceados o elementos intra o extracelulares no interesantes que se eliminarán.
- Circularidad mínima. Cuanto mayor sea el valor introducido, núcleos con morfología menos circular son descartados.
- Uniformidad. Nos indica la presencia de protuberancias, de manera que a valores bajos introducidos más polilobulado o irregular es el núcleo.
- Contraste mínimo. Útil para contrarrestar ruido de fondo o exceso de pigmento remanente que puede quedar

inespecíficamente en la muestra. Si la tinción no es muy específica es mejor usar valores altos.

- Intensidad mínima. Valor útil si la intensidad de la inmunotinción es muy débil o muy fuerte. Sirve además para clasificar los elementos positivos en tres niveles de intensidad (débil, moderado y alto) y los negativos. Estos últimos son cuantificados utilizando la coloración de la hematoxilina.

Una vez creado el algoritmo, el programa cuantifica el número de elementos tanto positivos como negativos en el área analizada generando una imagen con los elementos detectados, o máscara, que quedará superpuesta a la imagen original (Fig 2B). El valor del área analizada puede obtenerse a través de la opción de gestión de las anotaciones que ofrece el software. Los resultados obtenidos se guardarán en un archivo excel (formato csv). Para calcular el resultado en número de células positivas por mm^2 , se dividirá el número de células positivas entre el área. El número de células positivas viene dado por el programa informático como número de objetos de clase 1+ para intensidades bajas (CNO:1), 2+ para intensidades medias (CNO:2+) y 3+ para intensidades altas (CNO:3+), mientras que el número de células negativas será el número de objetos de clase 0 (CNO:0).

CUANTIFICANDO Y CARACTERIZANDO ELEMENTOS DE LA MEC MEDIANTE EL PROGRAMA INFORMÁTICO IMAGE PRO-PLUS

Las áreas a analizar se seleccionaron y extrajeron como imágenes en formato jpg con Microsoft Power Point para su posterior análisis con el software Image Pro-plus. Las imágenes para el análisis con este software pueden proceder de cualquier fuente, y pueden presentar numerosos formatos.

El primer paso para trabajar con el software Image Pro-plus y poder analizar parámetros de forma de los elementos de interés, en nuestro caso fibras elásticas y fibras de colágeno, es calibrar la imagen, es decir, definir el valor de un píxel en μm . Los casos analizados se calibraron a $0.25 \mu\text{m}$ por píxel. A continuación el investigador selecciona los parámetros que desea estudiar, que pueden ser de forma, cantidad, tamaño y orientación. En nuestro caso hemos seleccionado, a modo de ejemplo, los parámetros siguientes; área teñida, aspecto, ángulo, longitud, anchura y perímetro/ratio. Una vez seleccionados los parámetros de interés, cuyos valores vienen por defecto, se selecciona el color de el/los elemento/s que se quieren estudiar mediante la herramienta de selección de color manual. Aquellos elementos que no sean de interés, pero que tengan los mismos parámetros de color, pueden ser descartados por el investigador haciendo más restrictivos los valores de parámetros de forma que vienen por defecto con el programa, es decir, sin restricciones. Así, por ejemplo, se puede disminuir la variable "redondez" para descartar las células más redondas si estamos analizando las fibras de la MEC. El software analizará los elementos que tengan los colores seleccionados y nos dará los resultados de los parámetros

por defecto o los que el investigador escogió. Estos pueden ser exportados a un archivo en formato Excel. Los resultados se pueden utilizar para calcular variables de interés. De este modo, la suma de todas las áreas teñidas de cada objeto (célula o fibra) nos da el valor del área teñida total. Dividiéndola por el área total analizada se calcula el porcentaje de área teñida por todos los objetos. Por otro lado, el número de muestras o fibras puede dividirse por el área total para calcular el número de objetos por unidad de área.

RESULTADOS

La figura 2 muestra la imagen obtenida, o máscara, tras utilizar el programa informático Panoramic Viewer para la cuantificación objetiva de células CD1a positivas en la epidermis y la dermis de la piel fina seleccionada. El algoritmo nuclear utilizado fue configurado, tras diversas pruebas de optimización, de acuerdo con los siguientes parámetros: radio 5-15 μm , área mínima 6 μm^2 , circularidad mínima 30, uniformidad 8, contraste mínimo 5 e intensidad mínima 10. El resultado de la cuantificación de las células de Langerhans en la muestra de piel fina fue, para un área analizada de 0.614 mm^2 , de 1.252 elementos negativos (CNO:0), 59 elementos positivos de intensidad baja (CNO:1), 13 elementos positivos de intensidad media (CNO:2) y 29 elementos positivos de intensidad alta (CNO:3). En total 1.251 elementos negativos, o reflejados en relación con el área, 2.039 elementos negativos por mm^2 , y 101 elementos positivos, o reflejado en relación con el área, 164 elementos positivos por mm^2 . El porcentaje total de células de Langerhans en la epidermis y macrófagos CD1a+ de la dermis fue de 7.46%.

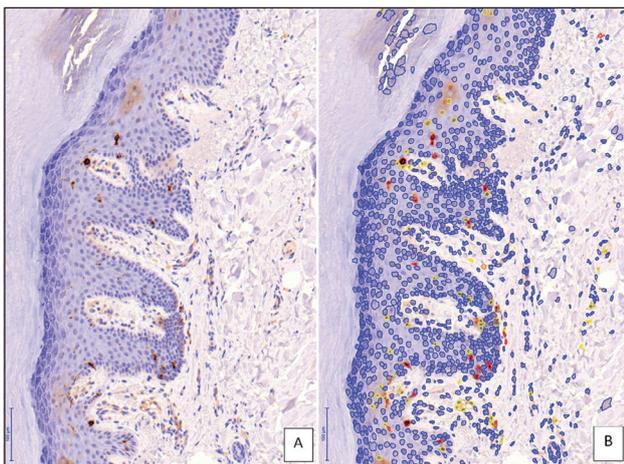


Figura 2. Resultado de la cuantificación objetiva de elementos CD1a+ en la muestra de piel fina usando el programa de análisis de imagen Panoramic Viewer v 1.15 (3D Histech Ltd.). A) Imagen original tras la inmunotinción con el anticuerpo CD1a. B) Imagen obtenida como resultado de la cuantificación objetiva por parte del software usando algoritmo de localización nuclear. Se ven los elementos que el software detecta como negativos (azul) y como positivos (rojo, elementos que presentan mayor intensidad; naranja, elementos de intensidad media; y amarillo, elementos de intensidad baja).

Las imágenes o máscaras obtenidas con el software Image Pro-plus, en ambas capas de la dermis, se muestran en las figuras 3 y 4 para las fibras elásticas y de colágeno respectivamente. Los resultados numéricos de la cuantificación objetiva quedan reflejados en las tablas 1 y 2. Atendiendo a las fibras elásticas, se midió mayor cantidad de fibras por unidad de área y mayor porcentaje de área teñida en la dermis reticular. Por otra parte, para las fibras de colágeno se cuantificó mayor número de fibras por unidad de área y menor

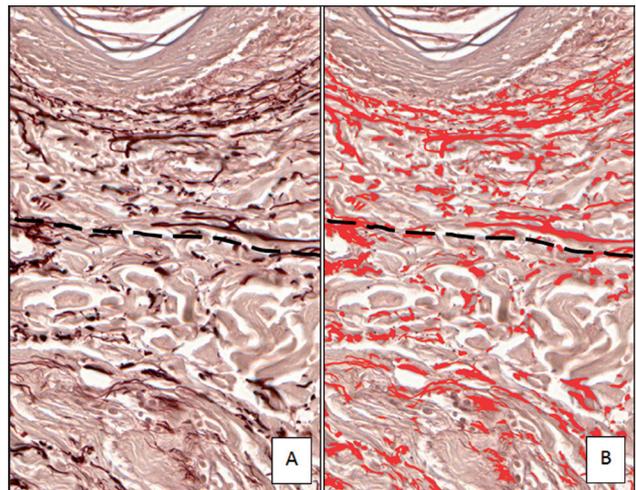


Figura 3. Resultado de la cuantificación objetiva de las fibras elásticas usando el programa informático Image Pro-plus v.6.0 (Media Cybernetics) en ambas capas de la dermis, separadas por la línea negra. A) Imagen original, resultado de la tinción histoquímica con orceína de las fibras elásticas (negro). B) Imagen resultado de la cuantificación objetiva por parte del software de las fibras elásticas (rojo).

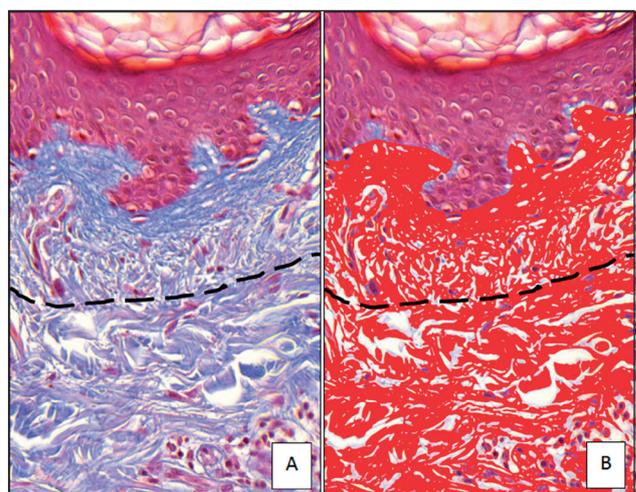


Figura 4. Resultado de la cuantificación objetiva de las fibras de colágeno usando el programa informático Image Pro-plus v.6.0 (Media Cybernetics) en ambas capas de la dermis, separadas por la línea negra. A) Imagen original, resultado de la tinción histoquímica con tricrómico de Masson de las fibras de colágeno (azul). B) Imagen resultado de la cuantificación objetiva por parte del software de las fibras de colágeno (rojo).

Revisión

Análisis morfométrico digital de la piel

TABLA 1. Resultados de la cuantificación y caracterización objetiva de las fibras elásticas y de colágeno en la muestra de piel fina.

	Capa papilar o dermis superficial							Capa reticular o dermis profunda									
	Estadísticos	Área (µm ²)	Aspecto	Ángulo (°)	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Perímetro/ratio	Estadísticos	Área (µm ²)	Aspecto	Ángulo (°)	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Perímetro/ratio			
Fibras elásticas	Min	1,9	1,2	0,8	2,8	0,5	0,780	Min	1,7	1,1	0,1	2,8	0,2	0,829			
	Max	120,2	18,8	178,0	30,6	12,0	1,000	Max	1.799,2	15,6	180,0	159,7	51,7	1,000			
	Media	21,2	3,9	69,6	9,6	3,2	0,972	Media	72,5	3,6	91,6	15,7	5,1	0,967			
	Dev Est	95,1	2,4	60,6	13,4	4,5	0,035	Dev Est	951,6	2,3	70,7	49,8	13,6	0,036			
	Resumen resultados	Muestras	129	ea teñida (µm Área total (µm ²)	2.737,8	Nº/mm ²	45.669,9	% teñido	Resumen resultados	Muestras	107	ea teñida (µm Área total (µm ²)	7.759,3	Nº/mm ²	28.007,8	% teñido	3.820,4
Fibras de colágeno	Min	2,8	1,3	3,8	2,8	0,9	0,805	Min	3,9	1,4	12,2	3,0	0,9	0,855			
	Max	12.039,1	8,5	179,6	203,0	138,2	1,000	Max	7.925,7	10,3	163,0	189,8	88,2	0,998			
	Media	480,6	3,2	95,6	14,6	8,2	0,940	Media	806,9	3,6	72,6	25,9	11,8	0,941			
	Dev Est	9.247,4	1,8	49,5	75,9	52,2	0,066	Dev Est	9.491,9	2,5	53,3	109,5	51,1	0,048			
	Resumen resultados	Muestras	26	ea teñida (µm Área total (µm ²)	12.495,7	Nº/mm ²	20.102,5	% teñido	Resumen resultados	Muestras	10	ea teñida (µm Área total (µm ²)	8.069,0	Nº/mm ²	11.558,5	% teñido	865,2

En esta tabla podemos ver todas las variables cuantificadas (área, aspecto, ángulo, longitud, anchura y perímetro/ratio) con el software Image Pro-plus v.6.0 (Media Cybernetics), y las estadísticas para cada variable, por orden: min (valor mínimo), max (valor máximo), media (valor medio), desviación estándar (o desviación típica), muestra (número de fibras), área teñida (por las fibras), área total (de la muestra analizada), el nº/mm² (número de fibras por unidad de área) y el % teñido (porcentaje de área teñida).

porcentaje de área teñida en la dermis papilar. Comparando ambos tipos de fibras entre ellas, observamos que, las fibras elásticas estaban en mayor número por unidad de área y ocupaban menor área teñida en ambas capas de la dermis. Además, se caracterizaron ambos tipos de fibras. Los resultados numéricos derivados quedan reflejados también en las tablas 1 y 2. Considerando únicamente a las fibras elásticas y comparándolas en ambas capas de la dermis, distinguimos que estaban formando elementos o plexos con una configuración más ovoide (aspecto mayor), organizadas con un ángulo más oblicuo respecto a la epidermis (ángulo más agudo), eran más cortas (menor longitud), estrechas (menor anchura) y rectilíneas (mayor perímetro/ratio) en la dermis papilar. Mientras que, atendiendo a las fibras de colágeno, advertimos que for-

TABLA 2. Variables Características de fibras de la MEC en las regiones dérmicas.

	C. Papilar		C. Reticular	
	F. elásticas	Colágeno	F. elásticas	Colágeno
% teñido:	6,0	62,2	27,7	69,8
Nº/mm ²	2.824,6	1.293,4	3.820,4	865,2
Área (µm ²)	21,2	480,6	72,5	806,9
Longitud (µm)	9,6	14,6	15,7	25,9
Anchura (µm)	3,2	8,2	5,1	11,8
Aspecto	3,9	3,2	3,6	3,6
Ángulo (°)	69,6	95,6	91,6	72,6
Perímetro/Ratio	0,972	0,940	0,967	0,941

En esta tabla se detalla el porcentaje de área teñida, el número de fibras por área y las medias objetivas de los parámetros analizados, para las fibras elásticas y de colágeno en ambas capas de la dermis en las muestras de piel fina, obtenidas con el software Image Pro-plus v.6.0 (Media Cybernetics).

maban estructuras o elementos más redondeados, dispuestas más perpendicularmente respecto a la epidermis, eran más cortas, estrechas y onduladas en la dermis papilar. Además, se pudo comparar ambos tipos de fibras entre ellas. De este modo, observamos que, en la dermis papilar, las fibras elásticas formaban elementos o estructuras más ovoides, estaban dispuestas de forma más oblicua respecto a la epidermis y eran más cortas, estrechas y rectilíneas que las fibras de colágeno. Mientras que en la dermis reticular, las fibras elásticas conformaban elementos o estructuras igualmente ovoides, dispuestas de forma más perpendicular respecto a la epidermis, eran más cortas, estrechas y rectilíneas que las fibras de colágeno. Por último podemos destacar el mayor rango existente entre los valores máximo y mínimo, así como una mayor variabilidad de los datos (desviación estándar) de las fibras de colágeno, en ambas porciones dérmicas, en algunas variables como el porcentaje de área teñida, la longitud o la anchura.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El uso de softwares o programas informáticos de análisis de imagen microscópica, cuando son optimizados y validados, permiten un análisis cuantitativo automático y reproducible de numerosas muestras de cualquier órgano o tejido, salvando posibles errores humanos derivados de la cuantificación subjetiva^(32, 33). Estas herramientas aportan mayor facilidad y rapidez para la detección de células debidamente teñidas, así como para la cuantificación global y concreta de células positivas y negativas. De esta manera, en nuestro análisis, el porcentaje de células CD1a positivas y negativas en esta muestra de piel fina se obtuvo de forma fácil y rápida. Aunque el resultado obtenido no representa únicamente este tipo de células epidérmicas, sino que también incluye macrófagos dérmicos, su valor está dentro del 3-8 % de las células epidérmicas que constituyen las células de Langerhans⁽³⁴⁾. Así mismo, estas herramientas son muy útiles para acelerar la cuantificación y caracterización, no solo de elementos celulares, sino también de elementos de la MEC, como las pequeñas y numerosas fi-

bras elásticas y/o de colágeno, respecto a los estudios con el microscopio óptico, sobre todo si los elementos a analizar son muy numerosos⁽³⁵⁾. De igual manera, se cuantificó y caracterizó de manera rápida y sencilla las fibras de la MEC de nuestro ejemplo, obteniendo resultados que, aunque no son científicamente válidos por tratarse de un único caso, entran dentro de lo esperado. Por ejemplo, las fibras elásticas son mayores en tamaño en la dermis reticular que en la papilar, o que las fibras de colágeno, dispuestas desordenadamente, están situadas de forma más perpendicular a la epidermis en la dermis papilar que en la reticular⁽³⁶⁾. Por otra parte, también se facilita la validación subjetiva si el escaneado de las muestras se realiza a gran aumento. Esto permite hacer estudios comparativos de la orientación, forma, tamaño y cantidad de las fibras de la MEC en procesos de cicatrización de heridas⁽³⁷⁾. En nuestro caso permitió validar objetivamente el número de células CD1a positivas y de algunos parámetros de las fibras elásticas y de colágeno^(34, 36).

No obstante, los resultados derivados del uso de softwares morfométricos presentan una dependencia fundamental de los pasos previos que generen imágenes de calidad. En los pasos previos, como la tinción, existe la posibilidad de obtener muestras que presenten una pigmentación inespecífica que en la cuantificación subjetiva puede ser diferenciada con más facilidad. Las herramientas informáticas objetivas de análisis de imagen pueden generar falsos positivos, o elementos que el software considera y clasifica como positivos pero que, en realidad, son artefactos producidos por la técnica o propios del tejido (pigmento, manchas, necrosis, etc.). Por otro lado una tinción excesivamente débil puede hacer que el software subestime el conteo, por la dificultad para distinguir entre elementos positivos y el color remanente que pueda haber quedado de manera inespecífica por toda la muestra. Respecto a las fibras de la MEC, si el algoritmo no es debidamente ajustado o si la tinción propicia los inconvenientes comentados, el software también puede subestimar el número de fibras cuantificadas por unidad de área. Si éstas aparecen muy juntas o fusionadas de manera que el algoritmo pueda cuantificarlas como una unidad, como ha ocurrido en algunas áreas de nuestro ejemplo con las fibras de colágeno. Estos inconvenientes pueden ser resueltos realizando una

corrección objetiva, tras comparar las imágenes originales y las obtenidas tras la aplicación del algoritmo y obtención de las máscaras.

También dificultará el análisis una incorrecta digitalización de la muestra. Por lo tanto, una validación de la tinción y el escaneado son necesarios, además de la estandarización de los parámetros, para una apropiada aplicación a la clínica de estas herramientas informáticas morfométricas de análisis de imagen. Sin embargo, a pesar de que todos estos inconvenientes puedan ser corregidos, hay patólogos que creen que el uso de estas herramientas les puede enlentecer o incluso incrementar la posibilidad de error del diagnóstico clínico⁽²³⁾. Por lo tanto, para consolidar la utilización de estas herramientas informáticas para el diagnóstico clínico, se necesitarán un mayor número de estudios de validación diagnóstica del método de análisis de imagen mediante diversos softwares frente al método tradicional subjetivo del microscopio óptico.

Los resultados obtenidos en las imágenes analizadas con los programas informáticos Panoramic Viewer e Image Pro-plus muestran concordancias con los datos conocidos de células derivadas del sistema monocito macrófago (células de Langerhans y macrófagos CD1a positivos dérmicos), así como de las fibras elásticas y colágenas de la dermis. Variables de cantidad, tamaño, morfología y orientación, que han sido obtenidas con gran facilidad y rapidez en las muestras de piel sana utilizadas en este trabajo, deben establecerse en los grupos controles de estudios traslacionales de heridas crónicas y cicatrizaciones patológicas.

En conclusión, proponemos el mayor uso de infraestructura digital morfométrica como alternativa de análisis tisular ya que puede permitir dar un salto de calidad a la investigación en el campo de las heridas y la cicatrización normal y patológica cuantificando y caracterizando los elementos celulares y acelulares presentes en las heridas de la piel.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Histología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia; Red Temática de Investigación Contra el Cáncer RTICC, RD12/0036/0020; Instituto Carlos III ISCIII (PI10/00015). ●

Bibliografía

- [1] SHAW, T.J. AND MARTIN, P. *Wound repair at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 18): p. 3209-13.
- [2] ANGELL, H.K., ET AL. *Digital pattern recognition-based image analysis quantifies immune infiltrates in distinct tissue regions of colorectal cancer and identifies a metastatic phenotype*. Br J Cancer, 2013. **109**(6): p. 1618-24.
- [3] NIELSEN, P.S., ET AL. *Virtual microscopy: an evaluation of its validity and diagnostic performance in routine histologic diagnosis of skin tumors*. Hum Pathol, 2010. **41**(12): p. 1770-6.
- [4] OZAWA, T., HIROYASU, S., AND TSURUTA, D. *The role of hemidesmosomes and focal contacts in the skin visualized by dual-color live cell imaging*. Med Mol Morphol, 2014. **10**: p. p. e1860.
- [5] POINDEXTER, B.J. *Immunofluorescence deconvolution microscopy and image reconstruction of human defensins in normal and burned skin*. J Burns Wounds, 2005. **4**: p. p. e7.
- [6] GUC, E., ET AL. *Long-term intravital immunofluorescence imaging of tissue matrix components with epifluorescence and two-photon microscopy*. J Vis Exp, 2014(86): p. e51388.
- [7] KONDO, Y., IJIMA, T., AND NOGUCHI, M. *Evaluation of immunohistochemical staining using whole-slide imaging for HER2 scoring of breast cancer in comparison with real glass slides*. Pathol Int, 2012. **62**(9): p. 592-9.
- [8] GRAF, B.W., ET AL. *In vivo multimodal microscopy for detecting bone-marrow-derived cell contribution to skin regeneration*. J Biophotonics, 2014. **7**(1-2): p. 96-102.
- [9] TADEO, I., ET AL. *Quantitative modeling of clinical, cellular, and extracellular matrix variables suggest prognostic indicators in cancer: a model in neuroblastoma*. Pediatr Res, 2014. **75**(2): p. 302-14.
- [10] TADEO, I., ET AL. *Biotensegrity of the extracellular matrix: physiology, dynamic mechanical balance, and implications in oncology and mechanotherapy*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 39.
- [11] STUART, K., ET AL. *Collagen-binding peptidoglycans inhibit MMP mediated collagen degradation and reduce dermal scarring*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22139.
- [12] OEHMICHEN, M., ET AL. *Mast cell reactivity at the margin of human skin wounds: an early cell marker of wound survival?* Forensic Sci Int, 2009. **191**(1-3): p. 1-5.
- [13] WANG, J., ET AL. *Human hypertrophic scar-like nude mouse model: characterization of the molecular and cellular biology of the scar process*. Wound Repair Regen, 2011. **19**(2): p. 274-85.
- [14] DE MELO, M.R., JR., ET AL. *Langerhans cells in cutaneous tumours: immunohistochemistry study using a computer image analysis system*. J Mol Histol, 2006. **37**(8-9): p. 321-5.
- [15] JACOBS, J.J., ET AL. *An automated method for the quantification of immunostained human Langerhans cells*. J Immunol Methods, 2001. **247**(1-2): p. 73-82.
- [16] BASIOUNY, H.S., ET AL. *Effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells on healing of induced full-thickness skin wounds in albino rat*. Int J Stem Cells, 2013. **6**(1): p. 12-25.
- [17] CHEN, L., ET AL. *Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1886.
- [18] CHABOT-RICHARDS, D.S., ET AL. *Quantitative image analysis in the assessment of diffuse large B-cell lymphoma*. Mod Pathol, 2011. **24**(12): p. 1598-605.

- [19] TOZETTI, P.B., ET AL. *Morphometry to identify subtypes of leukocytes*. Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2014. 7(2): p. 69-75.
- [20] FELDMAN, M.D. *Beyond morphology: whole slide imaging, computer-aided detection, and other techniques*. Arch Pathol Lab Med, 2008. 132(5): p. 758-63.
- [21] PANTANOWITZ, L. *Digital images and the future of digital pathology*. J Pathol Inform, 2010. 1: p. 15.
- [22] GHAZNAVI, F. ET AL. *Digital imaging in pathology: whole-slide imaging and beyond*. Annu Rev Pathol, 2013. 8: p. 331-59.
- [23] PATTERSON, E.S., ET AL. *Barriers and facilitators to adoption of soft copy interpretation from the user perspective: Lessons learned from filmless radiology for slideless pathology*. J Pathol Inform, 2011. 2: p. 1.
- [24] SHINDE, V., ET AL. *Applications of pathology-assisted image analysis of immunohistochemistry-based biomarkers in oncology*. Vet Pathol, 2014. 51(1): p. 292-303.
- [25] DIEGELMANN, R.F. AND EVANS, M.C. *Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing*. Front Biosci, 2004. 9: p. 283-9.
- [26] MAXSON, S., ET AL. *Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair*. Stem Cells Transl Med, 2012. 1(2): p. 142-9.
- [27] SINDRILARU, A. AND SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. *Disclosure of the Culprits: Macrophages-Versatile Regulators of Wound Healing*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2013. 2(7): p. 357-368.
- [28] YANG, L., WITTEN, T.M., AND PIDAPARTI, R.M. *A biomechanical model of wound contraction and scar formation*. J Theor Biol, 2013. 332: p. 228-48.
- [29] BARONI EDO, R., ET AL. *Influence of aging on the quality of the skin of white women: the role of collagen*. Acta Cir Bras, 2012. 27(10): p. 736-40.
- [30] MARCOS-GARCES, V., ET AL. *Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing - a morphometric and comparative study*. J Anat, 2014. 225(1): p. 98-108.
- [31] CSIKASZ-NAGY, A., ET AL. *Cooperation and competition in the dynamics of tissue architecture during homeostasis and tumorigenesis*. Semin Cancer Biol, 2013. 23(4): p. 293-8.
- [32] DONNELLY, D.J., ET AL. *An efficient and reproducible method for quantifying macrophages in different experimental models of central nervous system pathology*. J Neurosci Methods, 2009. 181(1): p. 36-44.
- [33] TAFAVOGH, S., ET AL. *Non-parametric and integrated framework for segmenting and counting neuroblastic cells within neuroblastoma tumor images*. Med Biol Eng Comput, 2013. 51(6): p. 645-55.
- [34] BANCHEREAU, J., ET AL. *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. 18: p. 767-811.
- [35] Bonta, M., Daina, L., and Mutiu, G. *The process of ageing reflected by histological changes in the skin*. Rom J Morphol Embryol, 2013. 54(3 Suppl): p. 797-804.
- [36] ZHU, X., ET AL. *Quantified characterization of human cutaneous normal scar using multiphoton microscopy*. J Biophotonics, 2010. 3(1-2): p. 108-16.
- [37] MELIS, P., ET AL. *Rapid alignment of collagen fibers in the dermis of undermined and not undermined skin stretched with a skin-stretching device*. Plast Reconstr Surg, 2002. 109(2): p. 674-80; discussion 681-2.

Conflicto de intereses: Los autores confirman no tener ningún conflicto de interés.