

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Ventajas de la microscopia holográfica digital para el estudio de muestras biológicas

Advantages of the digital holographic microscopy for the study of biological samples

Dra. Nadia Inés Infante Tavio,^I Dr. Rafael Escalona Veloz,^{II} Dra. C. Lilian Sierra Calzado^I y Lic. Guillermo Palacios Roque^{III}

^I Facultad de Medicina No. 2, Universidad de Ciencias Médicas, Santiago de Cuba, Cuba.

^{II} Hospital General Docente "Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso", Universidad de Ciencias Médicas, Santiago de Cuba, Cuba.

^{III} Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.

RESUMEN

Se efectuó una revisión bibliográfica exhaustiva sobre la microscopia holográfica digital y se ofrece una información actualizada sobre esta novedosa técnica de registro óptico en el país, así como de sus fundamentos teóricos y principales aplicaciones en el campo de la biología, para que pueda ser consultada por estudiantes y profesionales de la medicina y ciencias afines, con vistas a promover la realización de futuras investigaciones relacionadas con dicha técnica.

Palabras clave: holografía, microscopia holográfica digital, técnica de registro óptico.

ABSTRACT

An exhaustive literature review on the digital holographic microscopy was carried out and an updated information on this novel technique of optic record, its theoretical foundations and main uses in the field of biology in the country is offered, so that it can be consulted by students and professionals of medicine and similar sciences, aimed at promoting the realization of future investigations related to this technique.

Key words: holography, digital holographic microscopy, optic record technique.

INTRODUCCIÓN

El hombre ha desarrollado diversas técnicas para estudiar la estructura de las células, tejidos y órganos que constituyen los componentes del cuerpo humano, a la vez que ha perfeccionado los instrumentos necesarios para conocer con profundidad la morfología y función de los diferentes niveles de organización de la materia. De esta forma, muchos métodos de estudio empleados por la histología fueron aportados también por la física y la química. Así, el que caracteriza a la histología es la observación al microscopio, del cual se conocen 2 grandes grupos en dependencia de las partículas que constituyen su fuente de luz o energía: óptico (fuente de luz: fotones) y electrónico (cuyas partículas son los electrones).^{1, 2}

A finales del siglo XVI los hermanos Hans y Zacarías Janssen construyeron el primer microscopio óptico compuesto, precedido por los globos de vidrio llenos de agua en la antigüedad, las lupas talladas en vidrio por Bacon y las talladas por Divini y Campani, en las cuales ya aparecían ligeramente corregidas las aberraciones. Posteriormente, en 1609, Galileo desarrolló un microscopio compuesto por una lente convexa y una cóncava.²

El aumento obtenido con estos microscopios es reducido debido a la longitud de onda de la luz visible que tiene limitaciones, por lo que la observación en este requiere que la muestra a observar sea muy fina para que la luz pueda atravesarla. Además, su sistema óptico no produce un nivel útil de contraste en la muestra no coloreada, de manera que se hace necesario el empleo de diferentes métodos de tinción,³ razones por las cuales se ha ido perfeccionando hasta llegar a los modelos actuales que pueden alcanzar 0,2 μm de resolución.

Asimismo, el ingenio de los investigadores ha permitido mejorar progresivamente el poder de resolución de los microscopios, en dependencia de la apertura numérica de los objetivos y de la longitud de onda de la luz empleada. Surgen así los microscopios de contraste de fase, de polarización, de campo oscuro, de fluorescencia y de luz ultravioleta, así como el microscopio de barrido por etapas de doble enfoque o confocal. Este último es el proceso de óptica más notable en el siglo XX, que incluye el microscopio confocal láser de barrido, el confocal de disco giratorio (disco de Nipkow) y el de matriz programable.^{1, 3, 4}

Posteriormente, el estudio más detallado de la célula y los elementos subcelulares, moleculares y atómicos se logró a partir de la creación del primer microscopio electrónico de transmisión (MET)^{1, 3, 4} y el microscopio electrónico de barrido o rastreo (MEB), que estudia el relieve de los objetos, mediante la visualización de imágenes tridimensionales.

En la actualidad, algunos microscopios combinan las características de un MET con las de un MEB y permiten el microanálisis por rayos X con sonda electrónica, de manera que pueden mostrar los átomos individuales de un objeto; otros utilizan una sonda que recorre la superficie de una muestra, como el microscopio de sonda de barrido, que incluye al de túnel de barrido y al de fuerza atómica, que son esenciales en el desarrollo de la nanotecnología para la caracterización y visualización de muestras a dimensiones nanométricas.³⁻⁵

Recientemente se añadió una nueva técnica de registro óptico: la holografía, que hoy día es una de las ramas más importantes de la óptica moderna y ha dado lugar a un gran número de aplicaciones científicas y tecnológicas, así como también ha proporcionado técnicas que pueden utilizarse casi en cualquier área de investigación pura o aplicada, por ejemplo: la microscopia holográfica digital con múltiples aportes al estudio de las células y tejidos en diferentes campos de la hematología, la neurología, la ortopedia y otras ciencias.

La holografía es un concepto físico basado en la superposición de ondas que utiliza un rayo láser y una película fotográfica de alta resolución.⁶ En otras palabras, es un sistema de fotografía tridimensional sin el uso de lentes para formar la imagen. Esta es una de las técnicas ópticas que ya se veían teóricamente posibles antes de la invención del láser, pero que no se hicieron realidad antes de la aparición de este.⁷

Antecedentes de la holografía

Los principios teóricos de la holografía ya estaban descritos en 1816, cuando Auguste Fresnel proporcionó a las teorías de la difracción e interferencia de Thomas Young, un profundo rigor matemático. La holografía en eje fue inventada en 1948 por Dennis Gabor, en la búsqueda de un procedimiento para corregir las aberraciones en el microscopio electrónico de transmisión. Con este descubrimiento notó que podía grabarse información de un volumen completo en un holograma y reconstruirse ópticamente.⁹

Más tarde, a inicios de los 60, los investigadores Emmett Leith y Juris Upatnieks introdujeron la holografía óptica fuera de eje y perfeccionaron el procedimiento de registro y reconstrucción de los hologramas.^{9, 10}

La idea de reconstruir un holograma con una computadora fue propuesta por primera vez en 1967 por Goodman y Laurence; luego, por Cronrod y colaboradores.^{9, 11} En esta época, las principales dificultades para la aproximación numérica de la holografía la constituían el insuficiente desempeño de las computadoras y la carencia de dispositivos adecuados para la adquisición digital de la imagen.

Fundamento físico

Para hacer un holograma, primeramente el objeto a fotografiar es bañado por la luz de un haz láser y luego se hace rebotar un segundo haz láser que refleja la luz del primero y el patrón de interferencia resultante (la zona en la que confluyen ambos haces láser) es captado sobre una película. Cuando se revela la película, semeja una maraña de luz y líneas oscuras desprovista de significado, pero tan pronto se ilumina la película revelada mediante otro haz láser, aparece una imagen tridimensional del objeto original.^{7,8}

La tridimensionalidad de tales imágenes no es la única característica notable de los hologramas. A diferencia de las fotografías convencionales, cada parte de un holograma contiene toda la información que posee el todo.⁸ En realidad, un holograma contiene más información sobre la forma de un objeto que una fotografía simple, ya que permite verla en relieve y al variar la posición del observador obtener diferentes perspectivas del objeto holografiado.⁹

Tipos de hologramas

La holografía ha progresado de una manera impresionante y rápida debido a la variedad de aplicaciones que se le han ido encontrando. Los hologramas se pueden hacer de muy diferentes maneras, pero todos con el mismo principio básico. Entre los principales tipos figuran:^{7, 12}

- Hologramas de Fresnel: estos son los más simples, pero solo pueden ser observados con la luz de un láser.
- Hologramas de reflexión: fueron inventados por el físico ruso Y. N. Denisyuk. Se diferencian de los anteriores en que el haz de referencia, a la hora de tomar el holograma, llega por detrás y no por el frente.
- Hologramas de plano imagen: es aquel en el que el objeto se coloca sobre el plano del holograma. Naturalmente, el objeto no está físicamente colocado en ese plano,

pues esto no sería posible. La imagen real del objeto, formada a su vez por un lente, espejo u otro holograma, es la que se coloca en el plano de la placa fotográfica.

- Hologramas de arcoiris: estos fueron inventados en 1969 por Stephen Benton, de la Polaroid Corporation. Mediante estos, no solamente se reproduce la imagen del objeto deseado, sino también la imagen real de una rendija horizontal sobre los ojos del observador y, a través de esta, que aparece flotando en el aire, se observa el objeto holografiado.
- Hologramas de color: usan varios láseres de diferentes colores durante la exposición y la observación.
- Hologramas prensados: son generalmente de plano imagen o de arcoíris, a fin de hacerlos observables con luz blanca ordinaria; sin embargo, el proceso para obtenerlos es diferente. En lugar de registrarlos sobre una placa fotográfica, se usa una capa de resina fotosensible, depositada sobre una placa de vidrio.^{7,12}

Aplicaciones de la holografía

Actualmente, con el perfeccionamiento de la resolución espacial de las cámaras o dispositivo de carga acoplada (CCD, por sus siglas en inglés) y el incremento de la capacidad de procesamiento de las computadoras personales, la holografía digital comenzó a aplicarse en diversos campos.^{11, 12}

Sobre la base de las consideraciones anteriores, es oportuno señalar que la interferometría holográfica, los elementos ópticos holográficos, las memorias holográficas, el procesado óptico de información, los hologramas generados por ordenador, la holografía digital, la litografía holográfica y los hologramas de seguridad, son solo una pequeña muestra de las numerosas aplicaciones científicas y técnicas basadas en el método holográfico.¹²

Internacionalmente, son numerosas sus aplicaciones en la medicina. Al respecto, científicos de la Universidad Purdue desarrollaron una nueva tecnología de captación de imágenes que ha permitido realizar el primer "paseo visual" a través de un tumor vivo en rata, cultivado en medio especial con nutrientes. La técnica denominada imagen de coherencia óptica usa láseres, hologramas y detectores especiales y podría sustituir a los habituales rayos X, nocivos para los tejidos.^{12,13}

La introducción de la holografía digital en la óptica ha abierto una nueva rama en el campo de la visualización y la metrología micrométrica, que le permite hacer uso de herramientas numéricas y computacionales: la microscopia holográfica digital (MHD).

Esta técnica puede ser implementada en una configuración de un microscopio óptico y aporta varias características que la hacen una alternativa interesante para la óptica convencional, entre las cuales se encuentran: la profundidad focal mejorada y la posibilidad de generar imágenes tridimensionales, pseudotridimensionales o de contraste de fase.^{9, 14}

Fundamentos teóricos de la microscopia holográfica digital

En la microscopia holográfica digital, el holograma se obtiene mediante una instalación óptica, que consiste en un interferómetro de Mach-Zender, al cual se ha acoplado un

microscopio óptico en uno de sus brazos. La obtención del holograma digital es numérica, por lo que conjuntamente con el interferómetro se utiliza la cámara CCD conectada a la computadora, la cual captura el patrón de interferencia.¹⁵

La arquitectura básica lo constituye un interferómetro de Mach-Zhender y como fuente de luz se utiliza un haz linealmente polarizado de un láser de helio-neón (He-Ne) de 10 mW con longitud de onda $\lambda = 632,8$ nm. Dicho haz es filtrado por el filtro espacial (FE), después es dividido por el divisor de haz (DH1) en los 2 brazos del interferómetro.^{15,16}

Uno de los 2 haces incide sobre la superficie del espejo E2, cuyo ángulo de inclinación permite que este haz incida sobre la muestra biológica (M), situada en la platina de un M/O (con lentes objetivos de aumento $\gamma = 40$ y apertura numérica $NA = 0,65$) que se encuentra acoplado a uno de los brazos del interferómetro y que produce una imagen aumentada del objeto; asimismo, la luz que proviene de este lente es considerada haz objeto (O) y puede ser usado un condensador para enfocar la iluminación en la muestra.^{10,15,16}

El segundo haz proveniente del divisor DH1 incide sobre la superficie del espejo E3 y su ángulo de inclinación hace posible que el haz, denominado de referencia R que no interactúa con la muestra, interfiera con el haz objeto O y produzca un patrón de interferencia entre las ondas O y R.¹⁶

Posteriormente, en la salida del interferómetro, los 2 haces son combinados por el divisor de haz (DH2) y se forma en el plano de la cámara CCD el patrón de interferencia. De este modo, el holograma digital es registrado por dicha cámara y transmitido a la computadora por medio de una interfase.^{15,16}

El registro de este patrón de interferencia por un medio sensible a la luz es lo que se llama holograma. Por tanto, el holograma digital es el registro de la distribución de intensidad del patrón de interferencia entre el haz objeto O y el haz de referencia R, realizado por el sensor CCD. Esta cámara CCD está conectada a una computadora personal para la reconstrucción en 3 dimensiones (3D).^{15,16}

Significa entonces que con las 2 combinaciones de los polarizadores P1, P2 y P3, mejora considerablemente el contraste de la interferencia entre ambos haces. Se aconseja realizar de 10-12 capturas de hologramas, los cuales son denominados hologramas plano-imagen. Posteriormente se debe reconstruir el holograma mediante el método de doble propagación (MDP).^{10,15,16}

En la holografía digital, todo el algoritmo de reconstrucción del holograma se realiza de forma numérica, de manera que con esta técnica los resultados se han obtenido a través de medios de cómputo, por lo cual se utiliza un software especializado para realizar el proceso de reconstrucción y otros procedimientos colaterales de cálculo que completan el procesamiento de un holograma (figura).

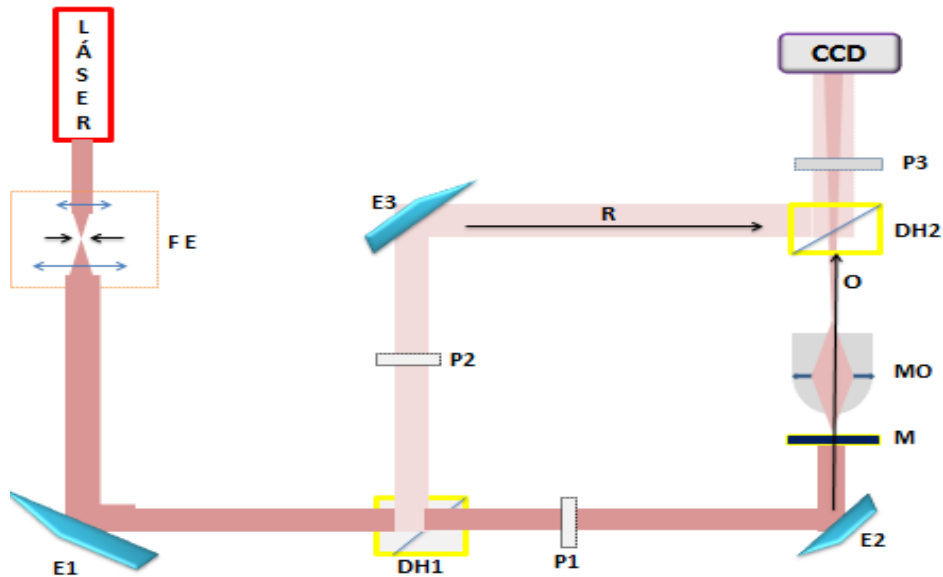


Fig. Esquema de una instalación de microscopía holográfica digital (configuración para transmisión)

Leyenda:

FE: Filtro espacial

E: Espejos con sus aditamentos para regular su inclinación

DH1: Divisor de haces 1

DH2: Divisor de haces 2

P: Polarizadores 1, 2 y 3

R: Haz de referencia

M: Muestra

MO: Microscopio óptico

O: Haz objeto

CCD: Cámara CCD

Aplicaciones de la microscopía holográfica digital

La MHD es una técnica eficaz para la obtención cuantitativa de imágenes de contraste de fase en tiempo real, a partir de una imagen de intensidad; el holograma es muy útil para la obtención de imágenes internas del cuerpo por medios tecnológicos en 3D, así como de objetos transparentes microscópicos.^{14,17,18}

Muchas veces, múltiples especímenes biológicos, como las células vivientes y sus componentes intracelulares, presentan una amplitud de contraste muy pequeña, que dificulta la visualización de sus contornos mediante los microscopios de campo brillante convencionales.

Para vencer este problema, algunas técnicas de contraste de fase, como Zernike, Normarsky y la microscopía de campo oscuro, han tenido que desarrollar y mejorar la visibilidad del espécimen sin alterarlos desde el punto de vista químico o físico por el proceso de coloreado. De cualquier modo, la desventaja de estas técnicas es que no permite la imagen de contraste de fase cuantitativa directa; sin embargo, la microscopía holográfica digital aumenta el contraste aparente de los objetos transparentes o semitransparentes en los especímenes biológicos y permite, además,

determinar la variación de la densidad óptica a partir de la distancia óptica calculada y la longitud de onda corregida.¹⁹

Resulta oportuno señalar que este aporte extiende los campos de la microscopia en la investigación biológica e histológica y la bacteriología, ya que constituye una herramienta valiosa para el conocimiento de las diversas respuestas celulares ante variados estímulos, específicamente de las células nerviosas; igualmente, el procesamiento secuencial de imágenes cuantitativas de fase permite identificar y segmentar las células individuales, así como mantener el curso de los experimentos, lo cual hace posible la visualización de componentes subcelulares, imposible de lograr con los microscopios ópticos convencionales.^{20,21}

El análisis de la información suministrada por esta técnica, acerca de la morfología y las variaciones del índice de refracción de células vivas, es la base del desarrollo de nuevos métodos ópticos para el diagnóstico biomédico no invasivo, por lo que ha sido aplicada con éxito en el estudio de eritrocitos humanos, fibroblastos y espermatozoides.^{21, 22}

La MHD también constituye un instrumento muy útil para efectuar medidas sumamente precisas ya que proporciona información cuantitativa del objeto en estudio, además de los parámetros morfométricos patognomónicos, que permiten la identificación de determinadas células y microorganismos móviles.^{22,23}

Además de la morfología, según Mihailescu *et al*²⁴ y Lenz *et al*,²⁵ es posible conocer las características de la adhesión, orientación y alineación de las células, así como el estudio dinámico de procesos básicos como la apoptosis e inflamación. En la farmacología, ha permitido el estudio dinámico de diversos fenómenos celulares inducidos por drogas y las tempranas alteraciones producidas en ellas.^{15, 24,25}

CONCLUSIONES

La microscopia holográfica digital proporciona imágenes de contraste de fase y pseudotridimensionales, con una profundidad focal mejorada, por lo que resulta una alternativa útil e interesante para el estudio de muestras biológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas. 12 ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.
2. Museumoptischer instrumente [citado 14 Jun 2013].
3. Iglesias Ramírez BZ, Rodríguez Obaya T. Métodos de estudio en Histología. En: Iglesias Ramírez BZ, Valentí Pérez JR, Rodríguez Pérez IC, Pomares Bory EJ, Dovale Borjes A, Rodríguez Obaya T. Histología. Células y tejidos [citado 4 May 2014].
4. Wang Z, Su Chun I, Li X, Ong ZY, Pop E, Millet L, *et al*. Topography and refractometry of nanostructures using spatial light interference microscopy. *Opt Lett*. 2010;35(2):208-10.
5. Giewekemeyer K, Thibault P, Kalbfleisch S, Beerlink A, Kewish CM, Dierolf M, *et al*. Quantitative biological imaging by ptychographic x-ray diffraction microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(2):529-34.

6. ¿Qué es la holografía? [citado 4 May 2014].
7. La holografía [citado 4 May 2014].
8. El universo holográfico ¿Existe la realidad objetiva? [citado 4 May 2014].
9. Calabuig A, Matrecano M, Paturzo M, Ferraro P. Common-path configuration in total internal reflection digital holography microscopy. *Opt Lett.* 2014;39(8):2471-4.
10. Palacios F, Font O, Ricardo J, Muramatsu M, Soga D. Alternative reconstruction method and object analysis in digital holographic microscopy. En: Naydenova I. *Advanced holography-metrology and imaging.* Croatia: In Tech; 2011:183.
11. Álvarez Palacios D, García Sucerquia J. Digital in-line holographic microscopy with partially coherent light: micrometer resolution. *Rev Mex Fis.* 2010 [citado 14 Ago 2015]; 56(6):445-8.
12. Introducción al holograma. Técnica holográfica.
13. Beléndez A. Holografía: ciencia, arte y tecnología. *Rev Bras Ensino Fís.* 2009 [citado 16 Mar 2013]; 31(1).
14. Kolman P, Chmelik R. Coherence-controlled holographic microscope. *Opt Express.* 2010; 18(21): 21990-22003.
15. Palacios F, Font O, Palacios G, Ricardo J, Escobedo M, Ferreira Gomes L, *et al.* Phase and polarization contrast methods by use digital holographic microscopy: applications by different types of biological samples. In: Mihaylova E. *Holography- basic principles and contemporary applications.* Croatia: In Tech; 2013.p.353-86.
16. An R, Turek J, Matei DE, Nolte D. Live tissue viability and chemosensitivity assays using digital holographic motility contrast imaging. *Appl Opt.* 2013 [citado 14 Ago 2015];52(1):300-9.
17. Ebrahimi S, Moradi AR, Anand A, Javidi B. Digital holographic microscopy with coupled optical fiber trap for cell measurement and manipulation. *Opt Lett.* 2014; 39(10): 2916-9.
18. Fatih T, Pache C, Parent J, Kühn J, Egli M, Depeursinge C. Dual-mode digital holographic and fluorescence microscopy for the study of morphological changes in cells under simulated microgravity. *Proc SPIE.* 2010 [citado 14 Ago 2015]; 7570.
19. Zikmund T, Kvasnica L, Týè M, Křížová A, Colláková J, Chmelík R. Sequential processing of quantitative phase images for the study of cell behaviour in real-time digital holographic microscopy. *J Microsc.* 2014; 256(2): 117-25.
20. Mir TA, Shinohara H. Label-free observation of three-dimensional morphology change of a single PC12 cell by digital holographic microscopy. *Anal Biochem.* 2012;429(1):53-7.

21. Shi K, Edwards PS, Hu J, Xu Q, Wang Y, Psaltis D, *et al.* Holographic coherent anti-stokes raman scattering bio-imaging. *Biomed Opt Express*. 2012;3(7):1744-9.
22. Wilson LG, Carter LM, Reece SE. High-speed holographic microscopy of malaria parasites reveals ambidextrous flagellar waveforms. *Proc Natl Acad Sci USA* [citado 14 Ago 2015];2013;110(47):18769-74.
23. Monaldi AC, Romero GG, Alanis EE, Curkovic GJ. Microscopía holográfica digital aplicada a la detección de microorganismos móviles. *An AFA*. 2009;21(1):74-80.
24. Mihailescu M, Popescu RC, Matei A, Acasandrei A, Paun IA, Dinescu M. Investigation of osteoblast cells behavior in polymeric 3D micropatterned scaffolds using digital holographic microscopy. *Appl Opt*. 2014 [citado 4 Ene 2015];53(22).
25. Lenz P, Bettenworth D, Krausewitz P, Brückner M, Ketelhut S, von Bally G, *et al.* Digital holographic microscopy quantifies the degree of inflammation in experimental colitis. *Integr Biol*. 2013 [citado 4 Ene 2015];5(3):624-30.

Recibido: 26 de marzo de 2016.

Aprobado: 19 de septiembre de 2016.

Nadia Inés Infante Tavio. Facultad de Medicina No. 2, avenida Cebreco, km 1 ½, reparto Pastorita, Santiago de Cuba, Cuba. Correo electrónico: ninfante@medinew.scu.sld.cu