

Estudio histomorfométrico de folículos tiroideos humanos con microscopía holográfica digital

Histomorphometric study of human thyroid follicles by digital holographic
microscopy

Nadia Inés Infante Tavio^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-7019-2421>

Rafael Escalona Veloz² <https://orcid.org/0000-0001-5507-3272>

Lillian Sierra Calzado¹ <https://orcid.org/0000-0002-3776-3250>

Guillermo Palacios Roque³ <https://orcid.org/0000-0003-2609-9400>

¹Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. Facultad de Medicina 2.

²Hospital Clínico Quirúrgico “Juan Bruno Zayas Alfonso”. Santiago de Cuba.

³ Universidad de Oriente. Santiago de Cuba.

*Autor para la correspondencia: infantetavio@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: La microscopía holográfica digital ha permitido a la microscopía óptica hacer uso de herramientas numéricas y computacionales; y esto, a su vez, ha favorecido múltiples avances en el estudio de las células y los tejidos en diferentes campos de la medicina y otras ciencias afines.

Objetivo: Describir las características histológicas y morfométricas de los folículos tiroideos humanos con la microscopía holográfica digital.

Métodos: Se realizó, desde el punto de vista histomorfométrico, un estudio descriptivo y transversal de folículos tiroideos humanos utilizando una instalación de microscopía holográfica digital. Se empleó la técnica de inclusión en parafina y tinción de hematoxilina-eosina para el procesamiento de las muestras. Se realizaron de 10 a 12 capturas de hologramas por muestra y el método de doble propagación para la reconstrucción de los hologramas. Se calculó el área, el

perímetro, el diámetro mayor y menor de los folículos y cavidades foliculares y se realizaron reconstrucciones de imágenes holográficas en tres dimensiones. Se determinó como medida de tendencia central la media aritmética y como medida de dispersión la desviación típica o estándar.

Resultados: Parámetros foliculares: área ($5140,31 \pm 1126,71 \mu\text{m}^2$); perímetro ($2961,54 \pm 71,2 \mu\text{m}$); diámetro mayor: ($921,17 \pm 24,34 \mu\text{m}$); diámetro menor: ($746,67 \pm 18,08 \mu\text{m}$); altura del epitelio ($7,92 \pm 0,96$). Cavidades foliculares: área ($3686,18 \pm 1023,52 \mu\text{m}^2$); diámetro mayor: ($698,86 \pm 19,55 \mu\text{m}$) y diámetro menor: ($581,15 \pm 13,82 \mu\text{m}$).

Conclusiones: Existen parámetros foliculares, determinados mediante la microscopía holográfica digital, no reportados por la literatura consultada, que resultan de interés en el estudio histológico de los folículos tiroideos humanos.

Palabras clave: estudio histomorfométrico; tiroides; holografía digital; folículos tiroideos.

ABSTRACT

Introduction: Digital holographic microscopy has made it possible to incorporate the use of numerical and computer tools into optical microscopy. This in turn has led to great progress in the study of cells and tissues in several fields of medicine and related sciences.

Objective: Describe the histological and morphometric characteristics of human thyroid follicles using digital holographic microscopy.

Methods: A descriptive cross-sectional histomorphometric study was conducted of human thyroid follicles using a digital holographic microscopy facility. Sample processing was based on inclusion technique by paraffin and hematoxylin-eosin staining. Ten to twelve holographic captures were made per sample, and the double propagation method was used for holographic reconstruction. Estimation was carried out of the area, perimeter, and greatest and smallest diameter of follicles and follicular cavities, and tri-dimensional reconstructions were made of holographic images. Arithmetic mean was determined as the measure of central tendency, and typical or standard deviation as the measure of dispersion.

Results: Follicular parameters: area ($5140.31 \pm 1126.71 \mu\text{m}^2$); perimeter ($2961.54 \pm 71.2 \mu\text{m}$); greatest diameter ($921.17 \pm 24.34 \mu\text{m}$); smallest diameter ($746.67 \pm 18.08 \mu\text{m}$); epithelial height (7.92 ± 0.96). Follicular cavities: area ($3686.18 \pm 1023.52 \mu\text{m}^2$); greatest diameter ($698.86 \pm 19.55 \mu\text{m}$); smallest diameter ($581.15 \pm 13.82 \mu\text{m}$).

Conclusions: A number of follicular parameters determined by digital holographic microscopy have not been reported by the literature consulted, and they are of interest to the histological study of human thyroid follicles.

Keywords: histomorphometric study; thyroid gland; digital holography; thyroid follicles.

Recibido: 25/02/2020

Aceptado: 04/04/2020

Introducción

La holografía es una de las ramas más importantes de la óptica moderna y, al proporcionar técnicas que pueden utilizarse casi en cualquier área de investigación pura o aplicada, ha dado lugar a un gran número de aplicaciones científicas y tecnológicas.^(1,2)

La introducción de la holografía digital en la microscopía óptica ha abierto una nueva rama dentro del campo de la visualización y metrología micrométrica: la microscopía holográfica digital (MHD). La misma ha permitido a la microscopía óptica hacer uso de herramientas numéricas y computacionales, y esto, a su vez, ha favorecido múltiples avances en el estudio de las células y los tejidos en diferentes campos de la hematología, neurología, ortopedia y otras ciencias.⁽³⁾

La tiroides es una glándula endocrina que se caracteriza por almacenar sus sustancias secretoras en la luz de folículos, a diferencia de la mayor parte de las glándulas endocrinas, que almacenan sus sustancias secretoras dentro de las células parenquimatosas.^(4,5)

La disposición en folículos de su parénquima permite no solo realizar estudios de las células que lo constituyen, sino también de otros elementos no menos importantes como el coloide, cuyo contenido principal es la tiroglobulina, molécula precursora de las hormonas tiroideas (triyodotironina o T₃ y tiroxina o T₄). Permite además el estudio de las características de la cavidad folicular y su relación morfofuncional con el epitelio.⁽⁵⁾

En 2014, en la provincia de Santiago de Cuba se iniciaron los estudios de muestras biológicas con la instalación de microscopía holográfica digital en la Universidad de Oriente. Por esta razón se decidió realizar el presente estudio histomorfométrico sobre folículos tiroideos humanos con la

microscopía holográfica digital; teniendo en cuenta la escasez en Cuba de investigaciones referentes a esta nueva técnica de registro óptico; el cual podría servir de referencia para próximas investigaciones, tanto de la glándula tiroides como de la técnica holográfica utilizada.

Métodos

Se realizó, desde el punto de vista histomorfométrico, un estudio descriptivo y transversal de la glándula tiroides de pacientes adultos fallecidos por causas ajenas a este órgano. Se utilizó la instalación de microscopía holográfica digital perteneciente al Departamento de Holografía Digital de la Universidad de Oriente de la provincia de Santiago de Cuba, desde enero a diciembre del 2018.

Para procesar las muestras se empleó la técnica de inclusión en parafina, los cortes se realizaron con un grosor de 4 μm en un micrótopo de rotación y se colorearon con hematoxilina-eosina (H-E).

Observación y registro de las muestras con la microscopía holográfica digital

Se realizó en la instalación de microscopía holográfica digital de la Cátedra de Holografía digital perteneciente a la Universidad de Oriente. El holograma digital resultante fue registrado por una cámara o dispositivo de carga acoplada (*charge-coupled device*, CCD) modelo HDCE-10 con 4,65 μm de tamaño de píxel y transmitido a la computadora por medio de la interfase IEEE-1394.

Se realizaron de 10 a 12 capturas de hologramas en cada muestra; utilizando el método de doble propagación (MDP) para la reconstrucción de los hologramas, método propuesto por el Palacios y otros.⁽⁶⁾ En la técnica holográfica para los procedimientos colaterales de cálculo que completan el procesamiento de un holograma se utilizó el *software* HOLODIG® versión 6.0; el cual es soportado por el sistema Matlab® versión R2012a, el que ofrece un conjunto de herramientas numéricas para el procesamiento de hologramas digitales adquiridos en instalaciones holográficas. La interacción entre el usuario y este *software* se realizó a través de una interfase usuario, que garantizó la obtención y manipulación de los resultados. Una vez obtenida la imagen de fase de las células y estructuras estudiadas se realizó la reconstrucción numérica para obtener la imagen en tres dimensiones (3D).

Se realizó una descripción histológica desde el punto de vista cualitativo de cada preparación observada con la microscopía holográfica digital, con énfasis en los aspectos más relevantes como forma, disposición y aspecto de las estructuras y células constituyentes.

Estudio morfométrico

Las mediciones se efectuaron en tres zonas correspondientes a tres campos consecutivos de cada preparación histológica, los cuales fueron promediados con vista a minimizar el error. Como ya se mencionó, se operó con el sistema Matlab®. Para la calibración lateral se utilizó una escala micrométrica de 1 mm con 100 divisiones de rayado, cuya imagen se capturó con las 3 lentes objetivas utilizadas (4x, 10x y 40x) y la cámara CCD para ambas imágenes (bidimensionales y holográficas) en las mismas condiciones en que fueron capturados los hologramas y las fotomicrografías bidimensionales. Se midió el área, el perímetro, el diámetro mayor y menor de los folículos y de la cavidad folicular, así como la altura del epitelio.

La información obtenida fue procesada de forma automatizada mediante el paquete estadístico EPIDAT (programa para análisis epidemiológico de datos tabulados de la Organización Panamericana de la Salud, v.3.1).

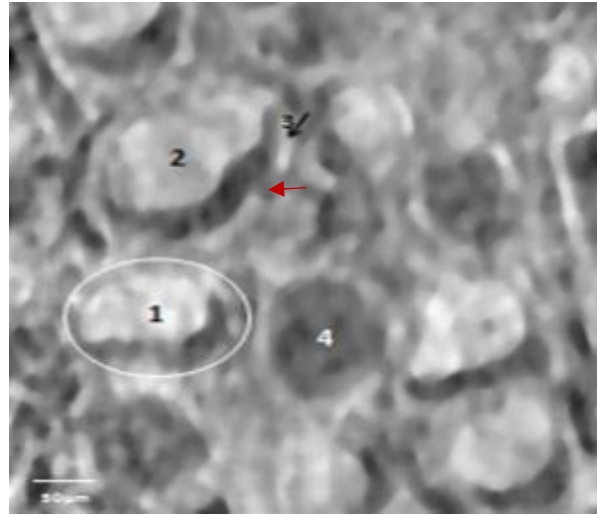
Se determinó como medida de tendencia central la media aritmética y como medida de dispersión la desviación típica o estándar.

Resultados

Al observar la imagen del parénquima de la tiroides con la microscopía holográfica digital (MHD), teniendo en cuenta que la luz láser es coherente y cuasi monocromática, se obtienen diferentes tonos en la escala de grises, los cuales se pueden relacionar con niveles de profundidad, donde las zonas más oscuras son depresiones y las zonas más claras elevaciones o relieves.

En la fotomicrografía de tiroides (Fig. 1), obtenida con la MHD en la visión en dos dimensiones (2D) de la imagen de fase reconstruida, se aprecian varios folículos tiroideos (1) como estructuras de diversos diámetros. El coloide (2) se visualiza de color blanco, mejor delimitado por una zona oscura que se corresponde con el vacío resultante de la retracción del coloide por la fijación; y el epitelio folicular (3) se observa como un relieve impreciso de color blanco también. En este caso

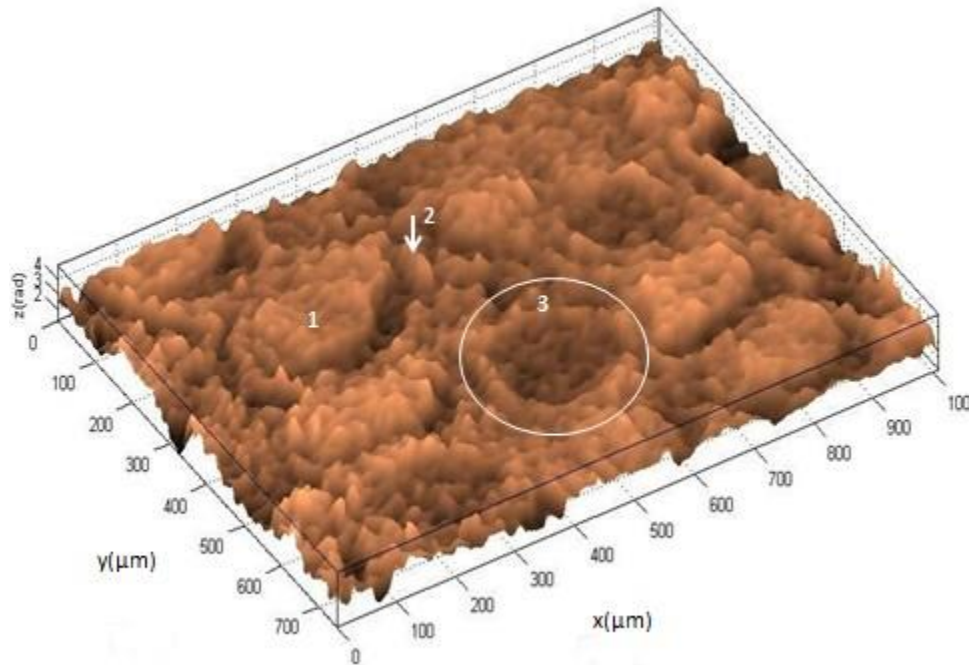
el menor contraste se observa en el sitio de localización de las células parafoliculares en el epitelio. Estas células difieren de las células foliculares en su morfología, características tintoriales y función. Se visualizan algunos folículos sin coloide en su interior (4).



1. Folículo tiroideo (en círculo). 2. Coloide. 3. Epitelio folicular (flecha negra). 4. Folículo vacío.
Célula parafolicular (flecha roja).
Coloración H-E. Objetivo 10x.

Fig. 1 - Corte de glándula tiroides observada con MHD.

En la reconstrucción en tres dimensiones (3D) representada en la figura 2, se precisa mejor el epitelio de los folículos (2) el cual hace relieve, el coloide en el interior de estos (1) y algunos folículos vacíos (3); permitiendo apreciar su disposición y estructura reales en la glándula. Estos detalles hacen a la microscopía holográfica digital una opción de gran utilidad para el estudio de superficies y estructuras individuales.



1. Coloide. 2. Epitelio folicular. 3. Folículo vacío.

Fig. 2 - Corte de glándula tiroides. Visión en 3D de la imagen de fase reconstruida.

Los resultados del estudio morfométrico de la tiroides se muestran en la tabla.

Tabla - Parámetros morfométricos de folículos tiroideos y cavidades foliculares con MHD

Parámetros morfométricos	Valor promedio	SD
<i>Folículos tiroideos</i>		
Área (μm^2)	5140,31	1126,71
Perímetro (μm)	2961,54	71,2
Diámetro mayor (μm)	921,17	24,34
Diámetro menor (μm)	746,67	18,08
Altura del epitelio (μm)	7,92	0,96
<i>Cavidades foliculares</i>		
Área (μm^2)	3686,18	1023,52
Diámetro mayor (μm)	698,86	19,55
Diámetro menor (μm)	581,15	13,82

N = 360

Discusión

Los últimos estudios desarrollados en la Universidad de Oriente desde el punto de vista físico demuestran, a la luz de las ecuaciones matemáticas, que la tridimensionalidad de la holografía realmente corresponde a un criterio de apariencia visual.^(4,7)

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, espermatozoides.^(4,8,9)

En la presente investigación se observaron diferencias en las imágenes obtenidas de las células foliculares y parafoliculares; estas últimas fueron imprecisas. Las células parafoliculares difieren de las células foliculares o tirocitos en su morfología, características tintoriales y función. *Mescher*⁽¹⁰⁾ y *Fawcett*⁽¹¹⁾, utilizando el microscopio electrónico de transmisión (MET), describieron la presencia en el citoplasma de las células parafoliculares, numerosas vesículas electrodensas limitadas por membranas que contienen calcitonina. Este detalle que diferencia a las células parafoliculares de los tirocitos, los cuales presentan otra ultraestructura celular, con numerosos lisosomas y múltiples vesículas con tiroglobulina como resultado de la absorción de coloide, podría explicar la diferencia en el contraste observado. En este caso, aunque se desconoce el índice de refracción del medio intracelular de las células parafoliculares y tirocitos; es evidente que son diferentes y al ser atravesadas por el haz de luz láser, se producen desviaciones del haz objeto, que atraviesa la muestra, provocando fluctuaciones.

Según *Palacios* y otros,⁽⁸⁾ en algunos casos en que el contenido celular se encuentra aumentado de determinadas sustancias o moléculas insolubles, se pueden producir fluctuaciones en la imagen de fase reconstruida, lo que conduce a un menor contraste. Exponen, además, que en estudios comparativos de muestras teñidas y sin teñir se obtiene un mejor contraste en aquellas que no han sido teñidas. En esta investigación, partiendo de que ambos tipos celulares, parafoliculares y tirocitos, han sido teñidos con H-E en la misma preparación, se considera que la causa del menor contraste se deba al contenido celular diferente que produce fluctuaciones en la imagen.

En el procesamiento de las muestras *Palacios* y otros⁽⁸⁾ y *Rappaz* y otros⁽¹²⁾ recomiendan cortes muy finos teniendo en cuenta que la imagen cuantitativa de fase está relacionada con el índice de refracción del contenido predominante dentro de la célula y el espesor de esta. Por otro lado, el

procesado de la muestra biológica, que incluye la fijación e inclusión en parafina, influye en la calidad de la imagen. En el campo de la medicina, este detalle es importante, ya que podría dificultar los diagnósticos de diversas enfermedades, como por ejemplo el cáncer y la inflamación.^(12,13)

En la actualidad el uso de la holografía digital en línea con ondas de Terahertz ha proporcionado un mejor contraste. *Rong* y otros⁽¹⁴⁾ plantean que en el futuro podrían usarse nuevas técnicas que permitan la adquisición de hologramas significantes sin deshidratación de la muestra.

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.^(1,2,15)

La disposición del parénquima tiroideo en folículos facilita el estudio morfométrico de estos. Las mediciones obtenidas en el presente trabajo coinciden con las de *Gartner* y otros,⁽¹⁶⁾ que describe a los folículos tiroideos, como estructuras semejantes a quistes y con variación de 200 a 900 μm de diámetro. De igual forma *Genesser*⁽¹⁷⁾ plantea que suelen tener un tamaño variable con un diámetro desde 50 μm hasta 1 mm, siendo posible visualizar a simple vista los más grandes.

Finalmente, sobre la base de los planteamientos anteriores, se concluye que en un estudio realizado durante el año 2018 en el Departamento de Física de la Universidad de Oriente, utilizando su instalación de microscopía holográfica digital, se determinaron en cortes de tiroides de pacientes humanos eutiroideos, mediciones análogas a lo reportado por la literatura y otras no reportadas por los autores consultados, como son el área, perímetro, diámetro mayor y diámetro menor de la cavidad folicular y altura del epitelio. Asimismo, se obtuvieron imágenes holográficas en 3D que permitieron una mejor apreciación de los componentes foliculares de la glándula tiroidea.

Referencias bibliográficas

1. Infante Tavio NI, Escalona Veloz R, Sierra Calzado L, Palacios Roque G. Ventajas de la microscopía holográfica digital para el estudio de muestras biológicas. MEDISAN 2017 [acceso: 07/06/2019];21(1). Disponible en: <http://www.medisan.sld.cu/index.php/san/article/view/786>

2. Infante Tavio NI, Escalona Veloz R, Sierra Calzado L, Palacios Roque G. Utilidad de la microscopia holográfica digital para el estudio histomorfométrico de eritrocitos humanos. MEDISAN 2016 [acceso: 21/01/2020];20(11). Disponible en: <http://www.medisan.sld.cu/index.php/san/article/view/774>
3. Infante Tavio NI, Escalona Veloz R, Sierra Calzado L, Palacios Roque G. Estudio histomorfométrico de la corteza cerebelosa con microscopia holográfica digital. MEDISAN 2017 [acceso: 07/01/2019];21(11). Disponible en: <http://www.medisan.sld.cu/index.php/san/article/view/773>
4. Scarone S. Embriología, Anatomía y Fisiología de la glándula tiroides. EM: Tuendocrinologo. 2017 [acceso: 07/01/2019]. Disponible en: <http://tuendocrinologo.com/site/endocrinologia/tiroides/embriologia-anatomia-y-fisiologia-de-la-glandula-tiroides.html>
5. Aguilar Chasipanta WG, Barquin Zambrano CR, Washington Jordán Sánchez J, Espinoza Álvarez EI, Bayas Cano AG, Vaca García MR. Efectos del deporte sobre la glándula tiroides. Rev Cubana Invest Bioméd. 2017 [acceso: 15/05/2019];36(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002017000300013&lng=es
6. Palacios F, Font O, Ricardo J, Palacios G, Mikiya Muramatsu M, Soga D et al. Alternative Reconstruction Method and Object Analysis in Digital Holographic Microscopy. In: Naydenova I. Advanced Holography - Metrology and Imaging. Croatia: In Tech; 2011. Disponible en: <https://books.google.com/cu/books?id=ooqfDwAAQBAJ&pg=PA183&lpg=PA183&dq=Alternative+Reconstruction+Method+and+Object+Analysis+in+Digital+Holographic+Microscopy&source=bl&ots=JhAmfwrQX1&sig=ACfU3U3yhYj9YCC8rGq0aV9w0stxSFUF8w&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwibndnx8KnqAhXrhOAKHT3JDZgQ6AEwA3oECAsQAQ#v=onepage&q=Alternative%20Reconstruction%20Method%20and%20Object%20Analysis%20in%20Digital%20Holographic%20Microscopy&f=false> [Consultado: 14-8-2015].
7. Somavilla Bolado B. Estudio para la aplicación de la holografía digital a la caracterización de tejidos biológicos. [Tesis]. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales y de Telecomunicación. Universidad de Cantabria; 2017. Disponible en: <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/12191/400844.pdf?sequence=1>

8. 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. pp.353-86. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/54022>
9. Lenz P, Brückner M, Ketelhut S, Heidemann J, Kemper B, Bettenworth D. Multimodal Quantitative Phase Imaging with Digital Holographic Microscopy Accurately Assesses Intestinal Inflammation and Epithelial Wound Healing. *J. Vis. Exp.* 2016 [acceso: 10/05/2018];1(115). Disponible en: <https://www.jove.com/video/54460/multimodal-fase-cuantitativa-de-imagenes-con-digital-holografica?language=Spanish>
10. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas. 12 ed. New York: McGraw-Hill; 2010 [acceso: 14/06/2013]. Disponible en: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=6182070>
11. Fawcett W. Tratado de Histología. 12 ed. México, D. F.: Interamericana; 2004.
12. Rappaz B, Breton B, Shaffer E, Turcatti G. Digital holographic microscopy: a quantitative label-free microscopy technique for phenotypic screening. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2014 [acceso: 14/08/2015];14(1):80-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3894694/>
13. Calin VL, Mihailescu M, Scarlat EI, Baluta AV, Calin D, Kovacs E, *et al.* Evaluation of the metastatic potential of malignant cells by image processing of digital holographic microscopy data. *FEBS Open Bio.* 2017 [acceso: 14/12/2017];7(10):1527-38. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5623698/>
14. Rong L, Lатычевская Т, Chen C, Wang D, Yu Z, Zhou X *et al.* Terahertz in-line digital holography of human hepatocellular carcinoma tissue. *Sci Rep.* 2015 [acceso:14/12/2017];5:8445. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep08445>
15. Tahara T, Quan X, Otani R, Takaki Y, Matoba O. Digital holography and its multidimensional imaging applications: a review. *Microscopy (Oxf).* 2018 Apr [acceso: 27/12/2018];67(2):55-67. Disponible en: <https://academic.oup.com/jmicro/article/67/2/55/4868623>
16. Gartner LP, Hiatt JI. Histología. 2 ed. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana; 2002. pp.297-301.
17. Geneser F. Histología. 3ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2000. pp. 595-9.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Nadia Inés Infante Tavio: conceptualización y diseño metodológico del estudio. Investigación: estudio morfométrico y descripción histológica de las muestras. Análisis formal: procesamiento estadístico. Escritura del informe final y del artículo para publicar.

Rafael Escalona Veloz: investigación: procesamiento histológico de las muestras. Revisión de la escritura del informe final y del artículo para publicar.

Lillian Sierra Calzado: coordinación de la planificación y ejecución de la actividad de investigación. Revisión de la escritura del informe final y del artículo para publicar.

Guillermo Palacios Roque: implementación y manejo del software para la captura de hologramas y reconstrucción en tres dimensiones (3D). Revisión de la escritura del informe final y del artículo para publicar.