



ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO DE FOLÍCULOS TIROIDEOS HUMANOS CON MICROSCOPIA HOLOGRÁFICA DIGITAL

Autores: MsC. Dra. Nadia Inés Infante Tavio¹, MsC. Dr. Rafael Escalona Veloz², Dra. C. Lic. Lillian Sierra Calzado³.

1. Especialista de I grado en MGI e Histología. Master en Enfermedades infecciosas. Profesor Asistente. Investigador agregado. UCM de Santiago de Cuba, Facultad de Medicina Nº 2. ORCID: 0000-0001-7019-2421.
2. Especialista de II grado en Anatomía Patológica. Master en Medios Diagnósticos. Master en Bioética. Profesor Auxiliar. Hospital General "Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso". ORCID: 0000-0001-5507-3272
3. Licenciada en Biología. Dra. en Ciencias de la Salud. Profesor Titular y Consultante. UCM de Santiago de Cuba, Facultad de Medicina Nº 2. ORCID:

RESUMEN

Introducción: La microscopía holográfica digital ha realizado múltiples aportes al 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. Método: Se realizó un estudio descriptivo y transversal de folículos tiroideos humanos, desde el punto de vista histomorfométrico, utilizando una instalación de microscopía holográfica digital. Se utilizó la técnica de inclusión en parafina, y tinción de hematoxilina-eosina para el procesamiento de las muestras. Se obtuvieron el área, perímetro, diámetros mayores y menores de los folículos y cavidades foliculares; así como, 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 ($5\,140,31 \pm 1\,126,71 \mu\text{m}^2$); Perímetro: ($2\,961,54 \pm 71,2 \mu\text{m}$); Diámetros mayor: ($921,17 \pm 24,34 \mu\text{m}$) y menor: ($746,67 \pm 18,08 \mu\text{m}$); Altura del epitelio: ($7,92 \pm 0,96$). Cavidades foliculares: Área: ($3\,686,18 \pm 1\,023,52 \mu\text{m}^2$); Diámetro mayor: ($698,86 \pm 19,55 \mu\text{m}$) y menor: ($581,15 \pm 13,82 \mu\text{m}$). Conclusiones: Existen parámetros foliculares, determinados con microscopía holográfica digital, no reportados por la literatura consultada que resultan de interés en el estudio histológico de folículos tiroideos humanos.



Segundo Congreso Virtual de
Ciencias Básicas Biomédicas en Granma.
Manzanillo.



Palabras claves: estudio histomorfométrico, tiroides, holografía digital, folículos tiroideos.

INTRODUCCIÓN

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

Recientemente 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 lo que decidimos realizar el presente estudio morfométrico, el cual podría servir de referencia para próximas investigaciones, tanto de la glándula tiroides como de la técnica holográfica utilizada, teniendo en cuenta la escasez en Cuba de investigaciones referentes a ambos temas.

OBJETIVO

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



MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo y transversal, desde el punto de vista histomorfométrico, de la glándula tiroides de pacientes adultos fallecidos por causas ajenas a este órgano, utilizando 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.

Procesamiento de las muestras: Se utilizó la técnica de inclusión en parafina, los cortes se realizaron con un grosor de 4 μm en un micrótomo 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 un microscopio holográfico digital, a través del cual el holograma digital resultante fue registrado por una cámara charge-coupled device o dispositivo de carga acoplada (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 Dr C. Francisco Palacios 6 de la Universidad de Oriente. 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 (programa realizado y patentado por Dr C. Francisco Palacios Fernández y el Lic. Guillermo Palacios Roque), 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, haciendo 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, en las que se utilizó



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 en las mismas condiciones en que fueron capturados los hologramas y fotomicrografías de las muestras estudiadas.

Se midieron el área, perímetro, diámetros 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, versión 3.1).

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

RESULTADOS Y 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.

Al observar una imagen 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 (figura 1), obtenida con la microscopía holográfica digital (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).

Junqueira 10 y Fawcett 11 describen, al microscopio electrónico de transmisión (MET), la presencia en su citoplasma de numerosas vesículas electrodensas limitadas por membranas que contienen calcitonina. Este detalle que las diferencia 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 ambas células, es evidente que son diferentes y al ser atravesados por el haz de luz láser se producen desviaciones del haz objeto que atraviesa la muestra, provocando fluctuaciones.

Según Palacios et al,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 la base que ambos tipos celulares 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 Palacios⁸ y Rappaz¹² recomiendan los 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 ésta. 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 colaboradores¹⁴ 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}

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 éstos (1) y algunos folículos vacíos (3); permitiendo apreciar su disposición y estructura reales en la glándula. Detalle que hace a la microscopía holográfica digital una opción de gran utilidad para el estudio de superficies y estructuras individuales.

Los resultados del estudio morfométrico de la tiroides se muestran en las tablas 1 y 2.

La disposición del parénquima tiroideo en folículos facilita el estudio morfométrico de éstos. Las mediciones obtenidas en el presente trabajo coinciden con Gartner¹⁶ que los describe como estructuras semejantes a quistes, que varían de 200 a 900 μm de diámetro. De igual forma Genesser¹⁷ 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.

En la bibliografía revisada no se encontraron referencias sobre las dimensiones normales de la cavidad de los folículos tiroideos en humanos, ni de la altura del epitelio folicular.

CONCLUSIONES

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, diámetros mayor y menor de la cavidad folicular y altura del epitelio, a la vez que se obtuvieron imágenes holográficas en 3D que permitieron una mejor apreciación de los componentes foliculares de la glándula tiroidea.

Los autores certifican la autenticidad de la autoría declarada, así como la originalidad del texto.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Infante Tavio NI, Escalona Veloz R, Sierra Calzado L, Palacios Roque G. Ventajas de la microscopia holográfica digital para el estudio de muestras biológicas. MEDISAN [revista en Internet]. 2017 [citado 2019 Jun 7];21(1):[aprox. 0 p.]. 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 [revista en Internet]. 2016 [citado 2020 Ene 21];20(11):[aprox. 0 p.]. 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 [Internet]. 2017 [citado 2019 Jun 7];21(11):[aprox. 0 p.]. Disponible en: <http://www.medisan.sld.cu/index.php/san/article/view/773>
4. Scarone S. Embriología, Anatomía y Fisiología de la glándula tiroides. Endocrinología médica. [Internet]. 2017 Abril [citado 2019 Jun 7]. 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 [Internet]. 2017 Sep [citado 2019 Mayo 15] ; 36(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002017000300013&lng=es
6. Palacios F. Et al. Alternative reconstruction method and object analysis in Digital holographic microscopy. Disponible en: www.intechopen.org [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, 2013:353-86. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/54022> [Consultado: 14-8-2015].
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. [Internet]. 2016 [citado 2018 Mayo 10];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. Disponible en: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=6182070> [Consultado 14 Jun 2013].
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 [Internet]. 2014 [Citado: 14-8-2015];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. [Internet]. 2017 Oct [Citado: 14-12-2017];7(10):1527–1538. Disponible en: <https://preview.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5623698/>
14. Rong L, Latychevskaia T, Chen C, Wang D, Yu Z, Zhou X et al. Terahertz in-line digital holography of human hepatocellular carcinoma tissue. Sci Rep [Internet]. 2015 [Citado: 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).



Segundo Congreso Virtual de
Ciencias Básicas Biomédicas en Granma.
Manzanillo.



[Internet]. 2018 Apr [Citado:27-12-2018]; 67(2): 55–67. Disponible en:
<https://preview.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6025206/>

16. Gartner LP, Hiatt JL. Histología. 2 ed. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana de España, 2002:297-301.
17. Finn Geneser. Histología. 3ed. Editorial Médica Panamericana, 2000:595-99.

Anexos:

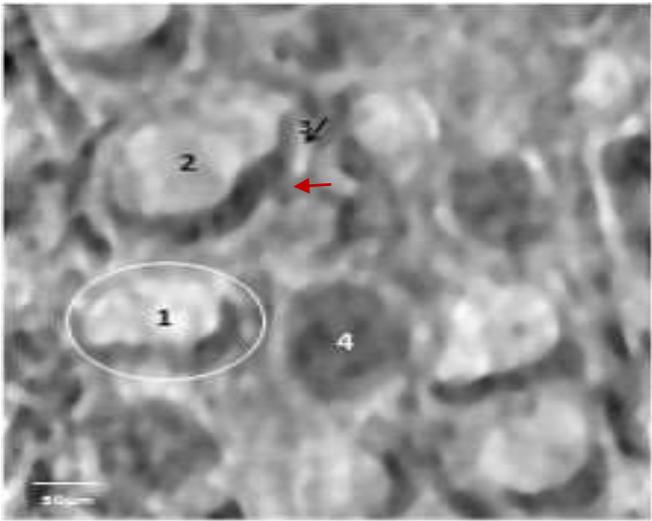


Fig. 1. Corte de glándula tiroides observada con MHD. 1. Folículo tiroideo (en círculo). 2. Coloide. 3. Epitelio folicular (flecha negra). 4. Folículo vacío. Célula parafolicular (flecha roja). Coloración H-E. Objetivo 10x.

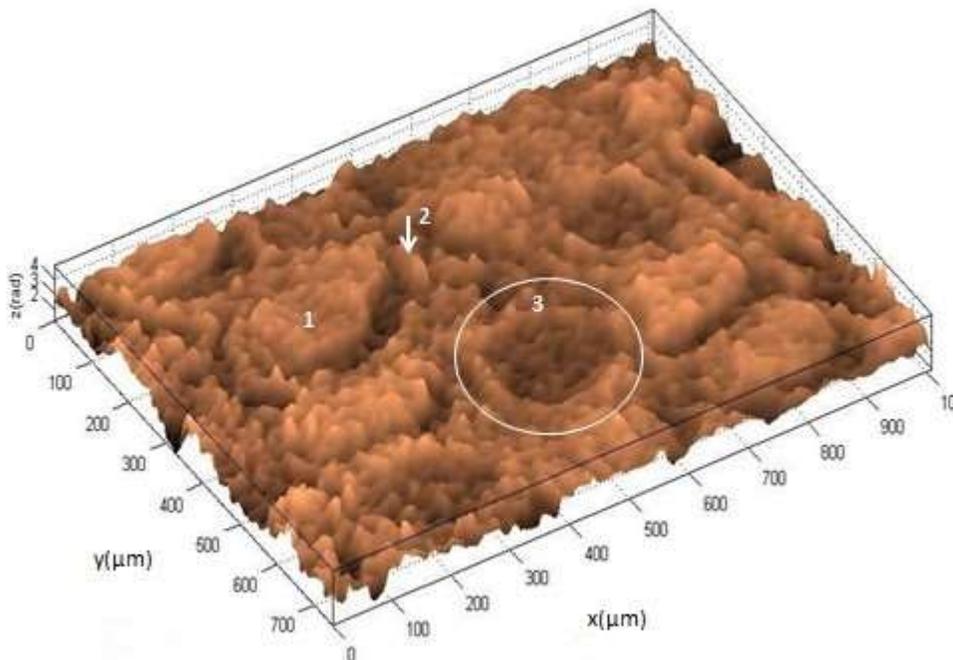


Fig 2. Corte de glándula tiroides. Visión en 3D de la imagen de fase reconstruida. 1. Coloide. 2. Epitelio folicular. 3. Folículo vacío.



Tabla 1. Parámetros morfométricos de folículos tiroideos con MHD

| Parámetros foliculares | Valor promedio | SD |
|---------------------------------------|----------------|----------|
| Área (μm^2) | 5 140,31 | 1 126,71 |
| Perímetro (μm) | 2 961,54 | 71,2 |
| Diámetro mayor (μm) | 921,17 | 24,34 |
| Diámetro menor (μm) | 746,67 | 18,08 |
| Altura del epitelio (μm) | 7,92 | 0,96 |

N = 360

Tabla 2. Parámetros morfométricos de cavidades foliculares con MHD

| Parámetros | Valor promedio | SD |
|----------------------------------|----------------|----------|
| Área (μm^2) | 3 686,18 | 1 023,52 |
| Diámetro mayor (μm) | 698,86 | 19,55 |
| Diámetro menor (μm) | 581,15 | 13,82 |

N = 360

Los autores certifican la autenticidad de la autoría declarada, así como la originalidad del texto.

No existen conflictos de intereses.