

Utilidad de la microscopia holográfica digital para el estudio histomorfométrico de eritrocitos humanos

Usefulness of the digital holographic microscopy for the histomorphometric study of human red blood cells

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

^I Facultad No. 2 de Ciencias Médicas, 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 realizó una investigación descriptiva y transversal para determinar la utilidad de la microscopia holográfica digital en el estudio histomorfométrico de eritrocitos humanos, mediante el análisis comparativo con la microscopia óptica, en el Departamento de Holografía Digital de la Universidad de Oriente de Santiago de Cuba, de abril del 2014 a igual mes del 2015. A tal efecto se seleccionaron muestras de eritrocitos diluidos en las soluciones amortiguadoras Hepes y Hepa, se emplearon el programa Holodig® y el sistema Matlab® para las mediciones en la técnica holográfica, y en el procesamiento estadístico se aplicó la prueba de la t de Student para la comparación de medias entre ambas técnicas microscópicas. Se obtuvo que la microscopia holográfica digital permitiera observar los límites y contornos de los eritrocitos estudiados y las mínimas variaciones en su forma, además de realizar estudios morfométricos, cuyos resultados mostraron similitud a los obtenidos con la microscopia óptica, y de otros parámetros, como el volumen.

Palabras clave: estudio histomorfométrico, eritrocitos humanos, microscopia holográfica digital, microscopia óptica, soluciones amortiguadoras.

ABSTRACT

A descriptive and cross-sectional investigation to determine the usefulness of the digital holographic microscopy in the histomorphometric study of human red blood cells, by means of the comparative analysis with the optic microscopy, was carried out in the Digital Holography Department of Oriente University in Santiago de Cuba, from April, 2014 to the same month in 2015. To such an effect, red blood cells samples diluted in the Hepes and Hepa shock-absorbing solutions were selected, Holodig program and Matlab® system were used for the measurement in the holographic technique, and in the statistical processing the Student t test was applied for the comparison of means between both microscopic techniques. It was concluded that the digital holographic microscopy allowed to observe the limits and contours of the studied red blood cells and the minimum variations in their form, besides carrying out morphometric studies which results showed similarity to those obtained with the optic microscopy, and of other parameters, as volume.

Key words: histomorphometric study, human red blood cells, digital holographic microscopy, optic microscopy, shock-absorbing solutions.

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. Un ejemplo de esto es la microscopia holográfica digital, con múltiples aportes al estudio de las células y los tejidos en diferentes campos de la hematología, neurología, ortopedia y otras ciencias.¹⁻³

De hecho, la introducción de la holografía digital ha abierto una nueva rama en el campo de la visualización y metrología micrométrica, que permite el empleo de herramientas numéricas y computacionales en la microscopia óptica; esta nueva rama, denominada microscopia holográfica digital (MHD) y mencionada previamente, puede ser implementada en una configuración de un microscopio óptico, con el aporte de varias características que la convierten en una alternativa interesante a la microscopia óptica convencional, las cuales incluyen una profundidad focal mejorada y la posibilidad de generar imágenes tridimensionales o pseudotridimensionales e imágenes de contraste de fase.^{4,5}

En otro orden de ideas, los eritrocitos (del griego *erythrós*, "rojo", y *kytos*, "bolsa"), también llamados glóbulos rojos o hematíes, son los elementos con forma cuantitativamente más numerosos de la sangre (96 %). Son células muy diferenciadas, especializadas en el transporte de gases: O₂ y CO₂, para lo cual se encuentran llenos de moléculas de hemoglobina.⁶ A lo anteriormente expuesto, se añade su forma de disco bicóncavo al verlo de perfil y la frecuencia de sus alteraciones en la práctica médica; todo lo cual motivó a seleccionarlo para llevar a cabo la presente investigación.

MÉTODOS

Se efectuó un estudio descriptivo y transversal para examinar morfométricamente eritrocitos humanos a través de la microscopia holográfica digital, y establecer un análisis comparativo con la microscopia óptica (M/O) de campo brillante, durante el periodo comprendido desde abril del 2014 hasta igual mes del 2015.

- Preparaciones de las muestras de sangre

Se utilizó la metodología propuesta por Fairbanks⁷ con algunas modificaciones. Cada muestra de 4 mL de sangre (procedente de pacientes del Hospital General Docente "Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso", cuya fórmula hemática había sido normal) con 0,2 mol de EDTA, fue lavada 3 veces con NaCl a 0,09 % y centrifugada a 3 200 rpm a 4 °C durante 10 minutos, eliminando el plasma la primera vez y la primera capa de células cada vez. Luego se realizaron extensiones de la suspensión de eritrocitos diluida 1/40 en la solución amortiguadora Hepes (15 mM Hepes; pH: 7,4; NaCl: 130 mM, KCl: 5,4 mM y 10 mM de glucosa).

También se tomaron preparaciones frescas de una suspensión de eritrocitos diluida 1/40 en la solución amortiguadora Hepa (15 mM HEPES; pH: 7,4; 130 mM de NaCl; 5,4 mM de KCl; 10 mM de glucosa; 1 mM de CaCl₂; 0,5 mM de MgCl₂ y 1 mg/mL de albúmina sérica bovina) y se realizaron extensiones de los eritrocitos ya diluidos.

- Observación y registro de las muestras con la microscopia holográfica digital

Se utilizó la instalación de microscopia holográfica digital, en el Departamento de Holografía Digital de la Universidad de Oriente, a través de la cual el holograma digital resultante fue registrado por una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD, siglas del inglés *charge-coupled device*), modelo HDCE-10 con 4,65 μm de tamaño de píxel, y transmitido a la computadora por medio de la interfase IEEE-1394.

Luego se efectuaron de 10 a 12 capturas de hologramas en cada muestra, utilizando el método de doble propagación (MDP) para la reconstrucción de los hologramas (propuesto por Palacios *et al*⁸). 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, debido a que ofrece un conjunto de herramientas numéricas para el procesamiento de hologramas digitales adquiridos en las instalaciones para tal fin. La interacción entre el usuario y este software se efectuó a través de una interfase "usuario", que garantizó la obtención y manipulación de los resultados. Una vez conseguida la imagen de fase de las células y estructuras estudiadas, se realizó la reconstrucción numérica para obtener la imagen en 3 dimensiones (3D).

- Estudio morfométrico

Las mediciones se efectuaron en 3 zonas correspondientes a 3 campos consecutivos de cada preparación histológica, los cuales fueron promediados, con vistas a minimizar el error, mediante 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 utilizadas (4x, 10x y 40x) y la cámara CCD, en las mismas condiciones en que fueron capturados los hologramas y las fotomicrografías de las muestras.

Luego de la descripción de los eritrocitos en ambas soluciones, se determinaron los parámetros de estos: área, perímetro, diámetro y volumen corpuscular medio, en la solución amortiguadora Hepa con ambas técnicas microscópicas.

El volumen del eritrocito se determinó a partir de los hologramas registrados, y con la imagen de contraste de fase reconstruida se establecieron los contornos de los eritrocitos individuales, a través de un algoritmo clásico de detección de bordes, basado en técnicas de gradientes.

El volumen del eritrocito fue calculado por medio de la expresión:

$$V_c \cong \frac{S_{\text{pixel}}}{M^2} \sum_{i \in S_{\text{cell}}} h_i,$$

Donde:

- S_{pixel} es el área de un píxel de la cámara CCD.
- M es el aumento total de la instalación de la MHD.
- h_i son las alturas de la célula en cada píxel de la imagen de fase y la suma se realiza sobre toda la superficie proyectada del eritrocito S_{cell} .

Calculando el promedio del volumen para todos los eritrocitos detectados, se obtuvo el volumen corpuscular medio.

La información 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), y se determinaron la media aritmética, como medida de tendencia central, la desviación típica o estándar (SD, por sus siglas en inglés), como medida de dispersión, y el modelo de distribución de la t de Student de comparación de medias entre ambas técnicas microscópicas.

RESULTADOS

La figura 1 muestra la reconstrucción en 3D de los eritrocitos diluidos en la solución amortiguadora Hepes. Estos adoptaron una forma mellada con la superficie rugosa (crenecitos), que resultan los relieves de variadas dimensiones, y en diferentes fases de crenación. El proceso que ocurre en los eritrocitos cuando se encuentran en soluciones hipertónicas, como es el caso del amortiguador Hepes, se evidencia mejor en la figura 2, donde se muestran los eritrocitos crenados en su totalidad a los 5 minutos de ser disueltos.

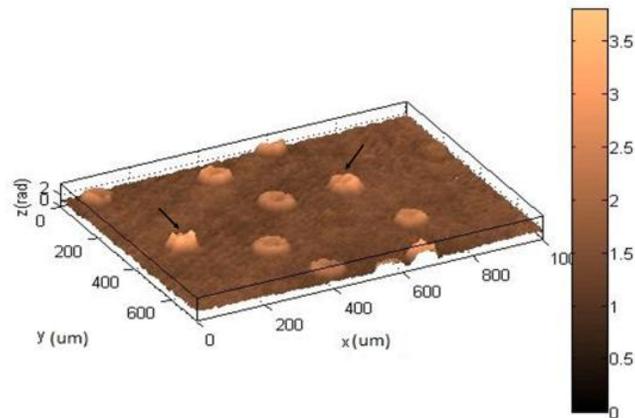


Fig. 1. Imagen en 3D de los eritrocitos al inicio de ser disueltos en la solución amortiguadora Hepes (las flechas señalan 2 eritrocitos totalmente crenados).

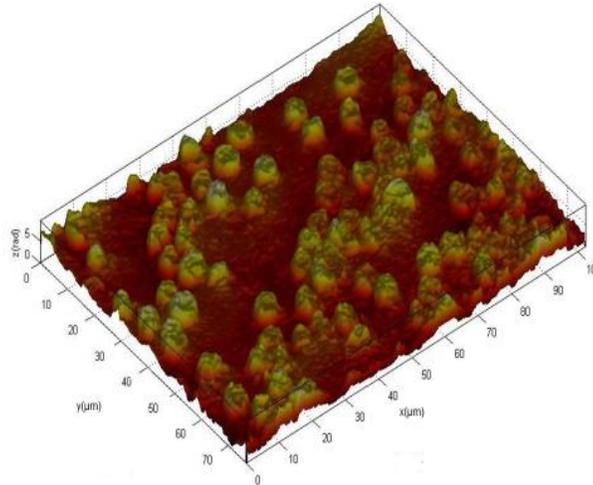


Fig. 2. Imagen en 3D de la muestra de eritrocitos en la solución amortiguadora Hepes

En la figura 3 se muestran los eritrocitos disueltos en la solución amortiguadora Hepa, los cuales presentan la forma normal de disco bicóncavo, con su centro deprimido. En este caso la superficie presenta algunas irregularidades como consecuencia del procesamiento de la imagen para lograr la reconstrucción en 3D.

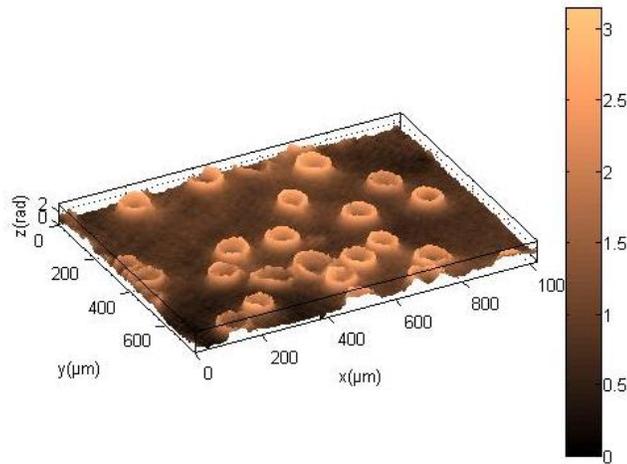


Fig. 3. Imagen en 3D de los eritrocitos disueltos en la solución amortiguadora Hepa

Al analizar los parámetros morfométricos de los hematíes en la solución amortiguadora Hepa (tabla), el área promedio de los hematíes estudiados fue de $46,93 \pm 5,65 \mu\text{m}^2$ con la MHD y $47,4 \pm 6,12 \mu\text{m}^2$ con la M/O; no existieron diferencias significativas entre los valores de las medias de las variables estudiadas ($p > 0,05$). El análisis del perímetro exhibió resultados similares, con valores de $24,28 \pm 1,44 \mu\text{m}$ con la MHD y $24,34 \pm 1,51 \mu\text{m}$ con la M/O. El volumen no se estudió con la M/O, por lo que no se establecieron diferencias de medias.

Tabla. Parámetros morfométricos de los eritrocitos en solución amortiguadora HEPA con la microscopia holográfica digital y la microscopia óptica

Parámetros celulares N=60	MHD		M/O		t	p
	Valor promedio	SD	Valor promedio	SD		
Área celular (μm^2)	46,93	5,65	47,4	6,12	0,4371	0,6628
Perímetro celular (μm)	24,28	1,44	24,34	1,51	0,2227	0,8241
Diámetro celular (μm)	7,72	0,46	7,75	0,49	0,3458	0,7301
Volumen (μm^3)	83,85	5,06				

DISCUSIÓN

Los eritrocitos o hematíes presentan forma de disco bicóncavo vistos de perfil y redondeada de frente; dicha forma está influida por fuerzas osmóticas, y existe un equilibrio entre el contenido del hematíe y el plasma o medio en que se encuentra; por lo que en soluciones hipertónicas, como es el caso de la solución amortiguadora Hepes, disminuyen de tamaño por la pérdida de agua y adoptan una forma mellada característica (crenócitos), en un proceso denominado crenación.^{6,9} Fawcett¹⁰ lo define como un cambio en la forma del hematíe, en la cual adopta en su superficie de 10 a 30 proyecciones cónicas cortas. Este proceso puede ser inducido *in vitro* también, por la exposición de los eritrocitos a compuestos como ácidos grasos o la lisolecitina.

En este caso se evidencia como la reconstrucción en 3D que brinda la microscopia holográfica digital, proporciona una imagen de la forma de los hematíes crenados con mayor exactitud. Ello se debe a que se captan las mínimas variaciones en los valores de la imagen cuantitativa de contraste de fase de las diferentes porciones de los hematíes, lo cual no es posible con la microscopia óptica.

Según un estudio comparativo¹¹ entre la microscopia con focal y la MHD, realizado en Brasil, con ambos tipos de solución amortiguadora y muestras de sangre secas, el mejor método de preparación de muestras para el análisis con la técnica de MHD es la suspensión de eritrocitos diluidos en la solución amortiguadora Hepa, pues al ser una solución isotónica mantiene la forma discoidal bicóncava del hematíe, lo que permite obtener valores fieles de su forma normal; razones por las cuales en la presente investigación se decidió determinar los parámetros histomorfométricos en esta solución.

Bianco *et al*¹² afirman que en el estudio de fluidos en los que se encuentran objetos (en este caso células), se producen retardos de fase impredecibles que provocan una distorsión del frente de onda, perturbadora *per se*, lo que impide la formación de la imagen de los elementos detrás de dicha capa obstructora.

Otros autores, como Dapore *et al*¹³ y Chen *et al*¹⁴ refieren, además, que la habilidad de extraer información a partir de la imagen de contraste de fase para la reconstrucción en 3D, con un mínimo de distorsión, es una ventaja innegable de la MHD; por lo que el uso de la microscopia holográfica digital y sus herramientas computacionales para el análisis de estos objetos, proporciona una mejora en términos de resolución numérica y supresión de ruido, y así se obtienen imágenes cuya calidad es superior.

En cuanto al estudio morfométrico con la MHD, los resultados coincidieron con los referidos por Rappaz *et al*,¹¹ quienes efectuaron mediciones con diferentes técnicas como la MHD, la microscopia con focal y el analizador volumétrico de impedancia. Sin

embargo, Fawcett¹⁰ señala (aunque no aclara el método utilizado en su medición) que los hematíes presentan una superficie de aproximadamente $140 \mu\text{m}^2$, determinada por su forma bicóncava, lo que los hace muy eficaces en el transporte de oxígeno y dióxido de carbono. No se encontraron, en la bibliografía revisada, datos sobre el perímetro de los eritrocitos.

Desde el punto de vista clínico, el conocimiento de la forma, el número y las proporciones de las células sanguíneas, no solo de los hematíes, posee gran importancia, porque constituyen indicadores del estado de salud de una persona; por ejemplo, en las anemias no solo se afecta el número, sino también su diámetro, volumen y color.

Respecto al diámetro, Mescher⁶ y otros autores^{10,15} describen los eritrocitos con un diámetro longitudinal de 7 a 8 μm en los frotis sanguíneos.

Acerca del volumen, los hallazgos coincidieron con los de otros investigadores.^{6,10,11,15} En la actualidad la clasificación morfológica más utilizada de las anemias tiene en cuenta el volumen corpuscular medio (VCM), cuyo rango de normalidad se halla entre 80 a 100 fL (un femtolitro equivale al volumen de $1 \mu\text{m}^3$).⁹ La determinación de este parámetro en los eritrocitos mediante la técnica de gradiente con la MHD, pone de manifiesto las ventajas de este programa, pues permite de manera selectiva elegir las células que serán procesadas. Esto es de gran importancia, porque solo se consideran aquellas células con la forma característica de un eritrocito en buen estado clínico, lo cual es una ventaja respecto a otras tecnologías que no poseen este tipo de discriminación.

Con referencia a lo anterior, en este trabajo no se estudió el volumen con la microscopía óptica. Se ha sugerido que el cálculo de este debe partir de 2 dimensiones, que incluyen el diámetro mayor y menor de la estructura, pero no se ha considerado esta posibilidad para las imágenes con M/O, basado en la forma tan característica del hematíe de disco bicóncavo.

En la actualidad ya se ha determinado el índice de refracción de la hemoglobina; así, el conocimiento de este y la obtención del VCM permitieron a Rappaz *et al*¹¹ y Moon *et al*¹⁶ la determinación de otros parámetros, como la hemoglobina corpuscular media y la concentración hemoglobínica corpuscular media, y la realización de comparaciones mediante el analizador volumétrico de impedancia.

Moon *et al*¹⁶ destacan, en su investigación, las variaciones del índice de refracción de la hemoglobina y su repercusión en la forma de los eritrocitos estudiados en 3D luego de largos períodos de almacenamiento; detalle que se debe considerar en las transfusiones sanguíneas por las posibles complicaciones.

Sobre la base de todo lo expuesto, pudo concluirse que la microscopía holográfica digital proporcionó una imagen de contraste de fase y en 3 dimensiones, que permitió observar con detalles, a manera de relieve, los límites y contornos de los eritrocitos estudiados y las mínimas variaciones de su forma, a la vez que brindó una imagen y concepción más cercana a la estructura y disposición de estos elementos en el organismo humano; asimismo, posibilitó la realización de estudios morfométricos, cuyos resultados fueron similares a los obtenidos con la microscopía óptica, y la determinación directa de otros parámetros, como el volumen, lo que facilitó, a través de la técnica de gradientes, seleccionar las células que fueron procesadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. 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 Feb; 7570.
3. Zikmund T, Kvasnica L, Týč 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.
4. 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.
5. Kolman P, Chmelik R. Coherence-controlled holographic microscope. *Opt Express*. 2010; 18(21): 21990–2003.
6. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas*. 12 ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.
7. Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1971; 10(13): 2606-17.
8. Palacios F, Font O, Ricardo J, Muramatsu M, Soga D, et al. Alternative reconstruction method and object analysis in digital holographic microscopy. En: *Naydenova I. Advanced holography-metrology and imaging*. Croatia: InTech; 2011: 183.
9. Prieto Valtueña JM, Yuste Ara JR. *Balcells. La clínica y el laboratorio*. 22 ed. Madrid: Elsevier; 2015.
10. Fawcett W. *Tratado de Histología*. 12 ed. México, D.F.: Interamericana; 2004.
11. Rappaz B, Barbul A, Emery I, Korenstein R, Depeursinge C, Magistretti P, et al. Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy, and impedance volume analyzer. *Cytometry A*. 2008; 73(10): 895-903.
12. Bianco V, Merola F, Miccio L, Memmolo P, Gennari O, Paturzo M, et al. Imaging adherent cells in the microfluidic channel hidden by flowing RBCs as occluding objects by a holographic method. *Lab Chip*. 2014; 14(14): 2499-504.
13. Dapore BR, Rabb DJ, Haus JW. Phase noise analysis of two wavelength coherent imaging system. *Opt Express*. 2013; 21(25): 30642-52.
14. Chen X, Zhao J, Wang J, Di J, Wu B, Liu J. Measurement and reconstruction of three-dimensional configurations of specimen with tiny scattering based on digital holographic tomography. *Appl Opt* 2014; 53(18): 4044-8.
15. Finn Geneser. *Histología*. 3 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2000. p. 595-99.

16. Moon I, Yi F, Lee YH, Javidi B, Boss D, Marquet P. Automated quantitative analysis of 3D morphology and mean corpuscular hemoglobin in human red blood cells stored in different periods. *Opt Express*. 2013; 21(25): 30947-57.

Recibido: 17 de marzo de 2016.

Aprobado: 25 de junio de 2016.

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