

Distribución del glucógeno en la placa basal de la placenta humana a término

Drs. *Olivar C Castejón S**, *Renato Belouche***, *Virginia Morett de Castejón****

Centro de Investigación y Análisis Docente Asistencial del Núcleo Aragua CIADANA; Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

RESUMEN

Objetivo. *Precisar la localización de partículas de glucógeno (glucosomas) en células deciduales y trofoblásticas de la placa basal de placenta humana a término para estudiar su distribución, cantidad y rasgos.*

Método. *Tinción con uranilo y plomo, según las técnicas convencionales de microscopía electrónica de transmisión que afecta la parte proteica de los glucosomas observándose como gránulos oscuros.*

Ambiente. *Laboratorio de microscopía electrónica de barrido, CIADANA, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Maracay, Edo. Aragua.*

Resultados. *El glucógeno se encontró ampliamente distribuido en las células; almacenándose en los diferentes tipos celulares, con significativas variaciones en las concentraciones.*

Conclusión. *Esta nueva visión de la distribución del glucógeno en células de placa basal permite comprender, su papel como reserva de energía para células sepultadas por fibrinoide o para que enzimas proteolíticas inicien los cambios degenerativos propios del área cercana a la línea de separación placentaria.*

Palabras clave: Glucosomas. Placa basal. Placenta humana.

SUMMARY

Objective. *To determine the exact location of glycogen in trophoblast and decidual cell of the basal plate of human placenta at term for studying their distribution, features and quantity.*

Method. *U-Pb stains according to conventional transmission electron microscopy stains which stained protein material of glycosomes observed as obscure particles.*

Sitting. *Laboratorio de microscopía electrónica. CIADANA. Fac Cs de la Salud, Universidad de Carabobo, Maracay Edo. Aragua, Venezuela.*

Results. *Glycogen was found distributed dispersed in the different cells with significant variations of concentrations.*

Conclusion. *This new view of the distribution of glycogen in cells of basal plate permit to us understand its role as energy source in this cells buried by fibrinoid or to be used by proteolytic enzymes for beginning degenerative changes own of this area near to the line of placental separation.*

Key words: Glycosomes. Basal plate. Human placenta.

INTRODUCCIÓN

El glucógeno en la placenta humana está incrementado durante el primer trimestre del embarazo y disminuye al final del mismo (1). La placenta diabética se consideró inmadura por contener concentraciones elevadas de glucógeno. Este carbohidrato complejo está ampliamente distribuido en la placenta, como partículas

energéticas, localizándose en las células columnares citotrofoblásticas, envoltura citotrofoblástica, islotes celulares trofoblásticos, en el estroma del tejido conjuntivo mesenquimal que forma la placa coriónica placentaria, en el estroma de las vellosidades coriónicas, la decidua y glándulas de esta última región (2).

*Coordinador General del CIADANA. Prof. Titular en Biología Celular. Fac Cs de la Salud Universidad de Carabobo. Maracay, Edo. Aragua.

**Médico Investigador visitante del CIADANA; Médico I de la Medicatura de la Alcaldía de Valencia, Edo. Carabobo.

***Bioanalista titular del Laboratorio del Hospital "Carabaño Tosta" IVSS Maracay, Edo. Aragua.

Mediante determinaciones histoquímicas de los reactivos de Bauer, Carmin de Best, digestión enzimática, etc., se ha demostrado el glucógeno en amplias zonas de estos tejidos, en forma rápida, lográndose la detección a nivel celular pero con limitada capacidad para conocer detalles de la distribución, organización subcelular y análisis cuantitativo.

La molécula de glucógeno es una estructura muy ramificada, con cadenas de 11 a 18 residuos de α -D-glucopiranososa con enlaces glucosídicos a [1-4] y ramificaciones unidas por medio de enlaces glucosídicos a [1-6] (3). Ésta se asocia covalentemente con enzimas regulatorias formando complejos de glucógeno-proteína o proteoglucanos conocidos como glucosomas (4).

El glucógeno es importante para el bienestar fetal y se requiere de la precisa localización de los lugares donde se almacena (5). Muy poca atención ha sido dada a glucosomas de células que se localizan en la placa basal de la placenta humana a término. Su distribución se ha hecho con especial referencia a vellosidades coriónicas en células endoteliales y pericitos (6).

Ellos apenas son mencionados en la ultraestructura del componente celular de placenta materna. Con la intención de estudiar la distribución de estos organelos dinámicos en las células trofoblásticas y deciduales de esta región, se seleccionó la técnica de microscopía electrónica de transmisión (MET) que permite con mayor poder de resolución el detalle de los glucosomas, la forma de distribuirse a nivel subcelular y la observación en general de la cantidad observada. Inferencias sobre la participación de estas partículas en los procesos degenerativos que ocurren en la zona; así como la aplicación del estudio para la comprensión de las alteraciones en los casos hipertensivos del embarazo, neoplásicos u otros.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de la decidua que permaneció adherida a la superficie materna de la placenta fueron identificadas por su color más blanco y naturaleza más compacta en contraste a la rojiza y blanda que pertenece a elementos coriónicos. Éstas fueron obtenidas inmediatamente después del parto de embarazos clínicamente normales. Cinco placentas se coleccionaron y los especímenes se disecaron de la región central parabasal fijándose inmediatamente en 2% glutaraldehído en 0,1M de fosfato buffer (pH: 7,2,-7,4) durante dos horas, lavadas en buffer simi-

lar y pos-fijadas en 1% de solución de ácido ósmico en 0,1M de buffer fosfato a 4°C. Después de la deshidratación en una serie graduada de alcoholes y óxido de propileno, los tejidos fueron incluidos en Epon 812 (Shell Chemical Corp. Swaren, New Jersey, EE.UU.). Secciones de una μ m de grosor fueron obtenidas para microscopía de luz y teñidas con azul de toluidina para orientación topográfica. Secciones ultrafinas fueron obtenidas con un ultramicrotomo Porter Blum MT2 (Ivan Sorvall Inc; Norwalk, Connecticut, EE.UU.) equipado con cuchilla de diamante y fueron coleccionadas en rejillas de cobre. Estas secciones fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo y luego examinadas con el microscopio electrónico Hitachi-H-500 (Nissei Sangyo Co Ltd, Tokyo, Japón). Esta tinción con U-Pb permite teñir la porción del glucosoma de naturaleza proteica.

RESULTADOS

Los glucosomas suelen verse distribuidos en la matriz hialoplásmica de diversas células localizadas en la placa basal de la placenta. Entre ellas células gigantes trofoblásticas, intersticiales, basales, células-x, y deciduales. Estas partículas o gránulos se tiñen de oscuro con las sales de U-Pb y aparecen como gránulos de 20-30 nm. Suelen verse aisladas (Figura 1) o formando pequeñas rosetas o agregados de glucosomas fuertemente unidos.

La forma de dispersión de los glucosomas parece típica y variable para cada tipo celular. Su cantidad también. Sectores de la matriz hialoplásmica han sido ampliados ya que el pequeño tamaño de los glucosomas requiere de cierta resolución para observar con nitidez su distribución.

Células gigantes trofoblásticas: se reconocen por la presencia de numerosos desmosomas intracitoplasmáticos cercanos a la periferia celular. Contienen glucosomas en abundancia uniformemente distribuidos en la matriz hialoplásmica con algunas zonas de concentración de partículas rodeadas por mitocondrias o cerca de cisternas de RER (Figura 2).

Células intersticiales trofoblásticas: sepultadas en la placa basal por matriz extracelular de fibrinoide. En éstas, las partículas se concentran en un mayor número de áreas; en otras palabras, hay pequeñas zonas de concentración de glucosomas repartidos entre las diversas organelas. Estas zonas no se observan en el espacio por donde se cruzan los microfilamentos citoplasmáticos (Figura 3).

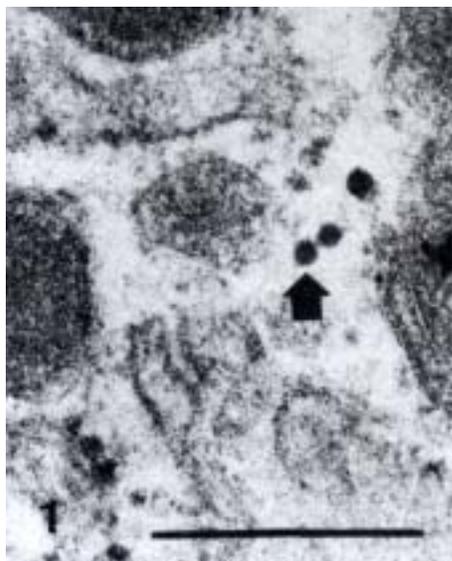


Figura 1. La flecha señala una partícula β de glucógeno a gran aumento en la matriz hialoplásmica. Barra: 0,25 μ m.



Figura 2. Célula gigante trofoblástica exhibe áreas de glucógeno (flechas). Barra: 1 μ m.

Células basales trofoblásticas: células que han quedado de la envoltura citotrofoblástica fuertemente unidas y empotradas en la placa basal. Aparecen rosetas y glucosomas aislados uniformemente

distribuidos; existiendo amplias zonas de concentración de las dos formas de presentarse el glucógeno (Figura 4). En estas células ya en etapas degenerativas el edema provoca la separación de las partículas en algunas de ellas. Densas acumulaciones de células ocupan extensas regiones del citoplasma. Los organelos casi no se observan en este estadio (Figura 5).

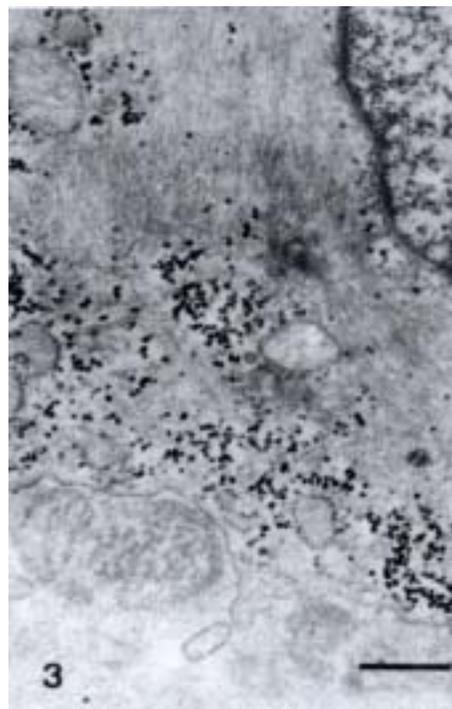


Figura 3. Célula intersticial demuestra varias áreas donde se concentran las partículas. Barra: 0,5 μ m.

Células -X: rodean cavidades pseudoquísticas en la placa basal, con numerosas cisternas de RER dispuestas en forma paralela. En las Figuras 1 a la 5 de un trabajo reciente (7) se notan partículas uniformemente aisladas con algunas áreas de concentración. Estas rodean a dilatadas cisternas de RER en proceso de degeneración.

Células deciduales: se observan con sus típicas "Gap Junctions" demuestran glucosomas aislados y en rosetas distribuidos uniformemente. Ocasionalmente dentro del núcleo un llamativo conglomerado esférico de partículas aparece rodeado por una lámina fibrosa (Figura 6).

En aquellos casos donde el reconocimiento celular es casi imposible, las células se observan con depósitos de grasa, lipofucsina y extensas regiones de glucosomas, como evidencias de cambios post-mortem (Figura 7).



Figura 4. Varios sectores de células trofoblásticas basales son mostrados unidos por desmosomas. La flecha señala glucógeno en roseta. Barra: 1 μ m.

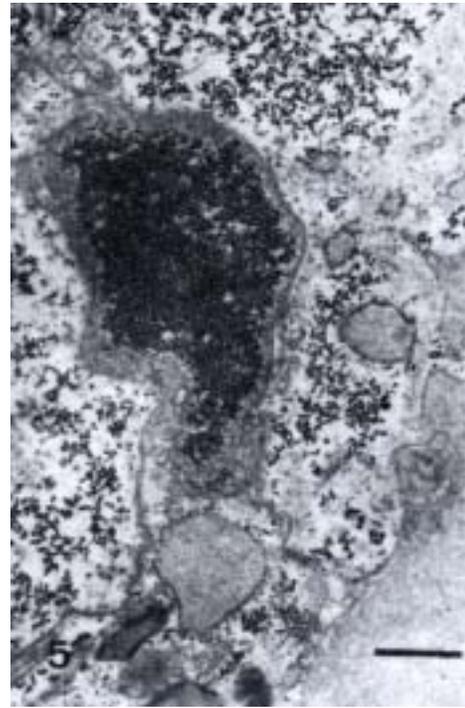


Figura 5. Cuatro sectores de células basales en vía de degeneración son vistas. Las que rodean al sector central parecen diluir los glucosomas por efecto del edema. Barra: 1 μ m.

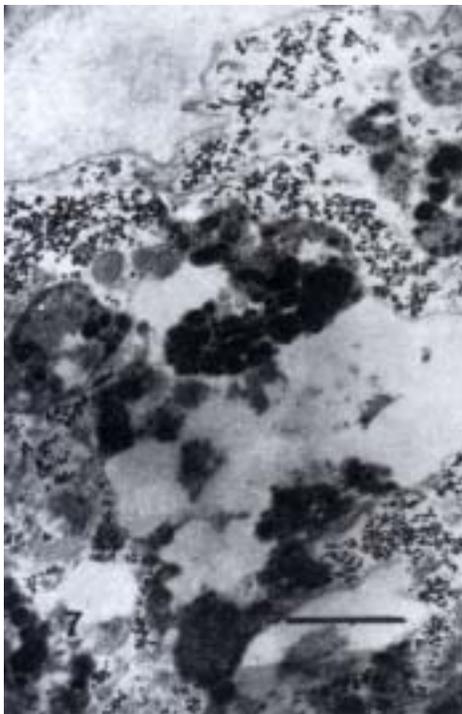


Figura 7. Densos agregados de glucógeno aparecen asociados con la muerte celular en cuyo evento la identificación se dificulta. Barra: 1 μ m.

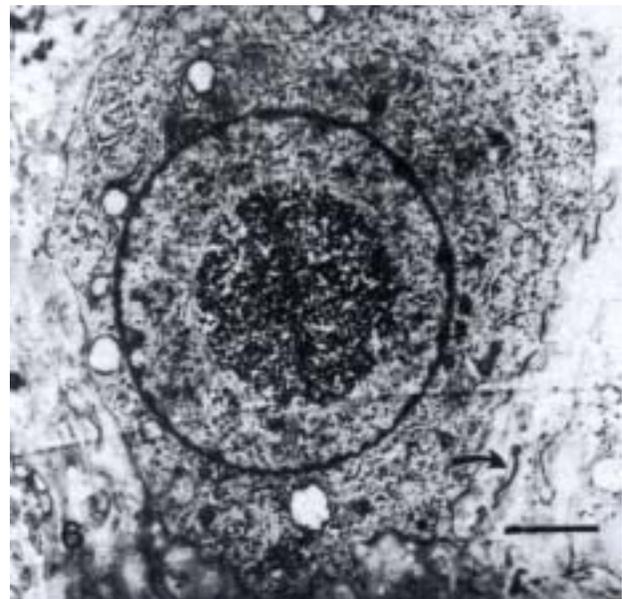


Figura 6. La flecha indica una "Gap Junction". La célula decidual semeja una célula neoplásica. Barra :1 μ m.

DISCUSIÓN

Las partículas aisladas de glucógeno aquí observadas se conocen ampliamente como glucógeno β y las agregadas, en rosetas, como glucógeno α . La previa definición de glucosoma implica que bioquímicamente están formados por glucógeno y proteínas. La técnica del uracilo-plomo, empleada en nuestros procedimientos ha teñido solamente el componente proteico del glucosoma. El glucógeno no puede ser teñido por U-Pb. Se tiñe por un proteínato de platatiosemicarbazida-ácido periódico (PA-TSC-SP) histoquímicamente, en partículas de 2-3 nm, diez veces más pequeñas que los glucosomas observados. Este glucógeno así teñido es diferente a las proteínas observadas con el U-Pb. Esta confusión se debe a que en los años 50 y 60 los glucosomas que fueron teñidos con U-Pb desaparecieron después de la digestión con amilasa y se concluyó que los gránulos representaban glucógeno. Pero subsecuentes hallazgos de que la digestión proteolítica también los hizo desaparecer no cambió en nada aquella opinión. Hasta la fecha no hay indicación de que ambos componentes del glucosoma puedan ser distinguidos con MET. No se conoce el verdadero peso molecular del glucógeno ni si éste se corresponde con las partículas aquí observadas (8) o con aquellas de 2-3 nm.

No se encontró una relación de organización entre los microfilamentos citoplasmáticos y los glucosomas.

Si bien podría usarse la distribución del glucógeno como un elemento identificador de las células es necesario considerar el aspecto dinámico de estos cuerpos ya que las enzimas, según sea la emergencia energética de la célula, caen sobre el glucógeno y lo degradan desapareciendo toda la partícula.

Estas imágenes mostradas permiten evaluar en parte, la condición del metabolismo en la cual se encuentra la célula. La placa basal a término sufre compresiones intermitentes durante el trabajo de parto con disminución del flujo sanguíneo. Las células de la placa basal con escaso riego sanguíneo (isquemia) o baja tensión de oxígeno (hipoxia), se observan según los resultados, almacenando glucógeno. Pareciera que el rol del glucógeno sustituye el de la hemoglobina en estas condiciones.

En la placenta es un hecho establecido que las primeras etapas del infarto vellosos cursan con deposición de glucógeno y en sus últimas etapas éste desaparece (9). Hemos visto como en las células trofoblásticas basales, las que están en vías de

degeneración, depositan más glucógeno que las metabólicamente activas. Antes de entrar en franca necrosis depositan grasas y glucógeno para posteriormente desaparecer. El glucógeno libre es tomado por las células vecinas que sobreviven, asegurando la renovación celular.

En base a las imágenes que aparecen en el trabajo mencionado de células - x (7) podemos inferir que tales resultados contrastan con los obtenidos por Ruffolo y col. (10). Ello se explica porque estos autores observaron las células -x que bordearon áreas de degeneración mucoide en las márgenes de cavidades quísticas y notaron densos agregados de glucosomas que oscurecían la mayoría del contenido citoplasmático.

En cuanto al glucógeno intranuclear que aparece en la célula decidual observada, hay varias hipótesis para explicar su localización: a. Los glucosomas disminuyen de tamaño y son capaces de permear los poros de la membrana nuclear. b. Invaginaciones de la membrana nuclear conteniendo glucosomas de la matriz hialoplásmica como falsa inclusión. c. Lugar para la gluconeogénesis.

Células neoplásicas requieren energía adicional para las rápidas divisiones y para el movimiento que favorece la metástasis. Numerosos neoplasmas contienen glucógeno (11) y actividad glucolítica. Los citotrofoblastos de la mola hidatidiforme contienen grandes depósitos. La línea celular Bewo, derivada del coriocarcinoma gestacional humano, cultivada, son citotrofoblastos malignos que demuestran citoplasma oscurecido por la gran cantidad de glucosomas. Estas células vacían el citoplasma de su glucógeno, por un mecanismo de glucogenólisis mientras no se cambie el medio de cultivo y parecen utilizar esta reserva para producir HCG (12).

En cuanto al glucógeno en los estados hipertensivos del embarazo, se esperaba que placentas de madres con severa pre-eclampsia, por cursar ésta con isquemia e hipoxia, tuviesen incrementada la actividad glucolítica con disminución del glucógeno y aumento de la relación lactato/piruvato pero resultados obtenidos por Bloxam y col. (13) en placentas por cesárea, han demostrado que no es así y la glucólisis está inhibida. El glucógeno queda almacenado de manera similar a las imágenes aquí demostradas. Estos últimos resultados han sido confirmados por Arkwright y col. (14). La idea de que el glucógeno placentario fuese una fuente energética para los casos de emergencia no fue comprobada (1). Casos clínicos de diabetes, retardo

del crecimiento fetal, pre-eclampsia, sufrimiento fetal, parto prolongado y factores como glucosa e insulina sanguínea no influyen sobre el metabolismo del glucógeno. En cambio, se ha sugerido su participación en la actividad vasomotora de la placa coriónica, jugando probablemente un papel en la contractilidad (1). Por otro lado, hormonas de crecimiento placentario (HCP) dependen de la concentración de glucosa, según experimentos *in vitro* (15), realizados en vellosidad coriónica. A término, la placenta regula el crecimiento fetal con HCP la cual está disminuida en el suero de mujeres embarazadas con retardo del crecimiento intrauterino (16). Si la glucosa procedente del glucógeno de placa basal también modula la secreción de HCP y por difusión llega al espacio intervilloso para contribuir al igual que las vellosidades coriónicas, no lo sabemos. Este papel pudiera estar disminuido por haber menos células trofoblásticas comparadas con las existentes en las vellosidades coriónicas.

Los procesos degenerativos, que, simultáneamente se dan en esta región con los de división celular, probablemente también requieren de energía procedente de los glucosomas. En conclusión, el glucógeno de placa basal se encuentra ampliamente distribuido en las células que allí se localizan y los resultados indican significativas variaciones en las concentraciones del glucógeno en los tipos celulares. Es posible que el glucógeno de placa basal sea metabolizado liberando la energía para que enzimas proteolíticas inicien los cambios degenerativos propios de esta región cercana a la línea de separación placentaria o como fuente energética para el mantenimiento de hormonas que modulan el crecimiento placentario a término. Además puede ser utilizado para la sobrevivencia de las células que permanecen en esta región sepultadas por fibrinoide.

REFERENCIAS

1. Robb SA, Hytten FE. Placental glycogen. *Br J Obstet Gynaecol* 1976;83:43-53.
2. Demsey EW, Wislocki GB. Observation on some histochemical reactions in the human placenta, with special reference to significance of lipoids, glycogen and iron. *Endocrinology* 1944;35:409-429.
3. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Bioquímica de Harper*, 12ª edición. México: Editorial El Manual Moderno; 1992.p.125-134.
4. Rybicka K. The "Glycogen Granule" Revisited. *Microscopy Today* 1994.p.94-97.
5. Mvumbi L, Manci EA, Ulmer D, Shah AK. Glycogen levels in human term placental disks, umbilical cords, and membranes. *Pediatr Pathol Lab Med* 1996;16:597-605.
6. Jones CJ, Desoye G. Glycogen distribution in the capillaries of the placental villus in normal, overt and gestational diabetic pregnancy. *Placenta* 1993;14:505-517.
7. Castejón OC, Belouche R, de Castejón VC. Filamentos citoplasmáticos y secreción celular en células x-trofoblásticas de placenta humana. *Gac Méd Caracas* 1997;105:520-524.
8. Blows JM, Calder PC, Geddes R, Wills PR. The structure of placental glycogen. *Placenta* 1988;9:493-500.
9. McKay DG, Hertig AT, Adams EC, Richardson MV. Histochemical observations on the human placenta. *Obstet Gynecol* 1958;12:1-36.
10. Ruffolo R, Benirschke K, Covington HI, Munro AB. Electron microscopy study of the: "x-cell" in septal cysts of the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1967;99:1147-1159.
11. Dickersin GR. *Diagnostic Electron Microscopy: A text Atlas*. 1ª edición. New York: Igaku-Shoin Medical Publishers, Inc.; 1988.p.84-95.
12. Garancis JC, Patillo RA, Hussa RO, Schultz J, Mattingly RF. Electron microscopic and biochemical patterns of the normal and malignant trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 1970;108:1257-1268.
13. Bloxam DL, Bullen BE, Walters BNJ, Lao TT. Placental glycolysis and energy metabolism in pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1987;157:97-101.
14. Arkwright PD, Rademacher TW, Dwek RA, Redman CW. Pre-eclampsia is associated with an increase in trophoblast glycogen content and glycogen synthase activity, similar to found in hydatidiform moles. *J Clin Invest* 1993;91:2744-2753.
15. Patel N, Alsat E, Igout A, Baron F, Hennen G, Porquet D, et al. Glucose inhibits human placental GH secretion *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1743-1746.
16. Alsat E, Marcotty C, Gabriel R, Igout A, Frankenne F, Hennen G, et al. Molecular approach to intrauterine growth retardation: an overview of recent data. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:1457-1464.

Agradecimientos

A la coordinación administrativa del Núcleo Aragua por el fondo fijo institucional de la Facultad de Ciencias de la Salud (CIADANA) para reactivos, materiales y servicios. Al Sr. Raúl Colina por su asistencia técnica en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto de Investigaciones Odontológicas-Caracas.