

# Microscopía electrónica de la interacción de membranas plasmáticas con la matriz extracelular de fibrinoide placentario\*

Dr. Olivar C Castejón S\*\*

Laboratorio de Microscopía Electrónica. Centro de Investigación y Análisis Docente Asistencial del Núcleo Aragua. (CIADANA). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Maracay, Edo. Aragua

## RESUMEN

**Objetivo:** Estudiar la interacción de la matriz extracelular con membranas plasmáticas de células fetales y maternas con microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido complementada por histoquímica ultraestructural usando azul alcian.

**Método:** Imágenes simultáneas de microfotografías con microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido son correlacionadas en sectores de membranas con relación a la matriz extracelular teñida con azul alcian.

**Ambiente:** Centro de Investigación y Análisis Docente Asistencial del Núcleo Aragua. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Maracay-Venezuela.

**Resultados:** Microfilamentos conectan matriz hialoplasmática con matriz extracelular por intermedio de la membrana. Matriz extracelular de aspecto gránulo-filamentoso; se notó en dos tonalidades contrastadas, gránulos electrón densos de células deciduales o trofoblásticas se observan en la periferia celular. Fibrina, colágena degenerada, fibrinoide y gránulos de diversos tamaños conforman una red compleja en el espacio extracelular.

**Conclusión:** Fibrinoide tipo matriz fue reactivo al azul alcian y conforma parte del espacio extracelular observado simultáneamente con imágenes de microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido a baja resolución, donde reacciones fisiológicas son de notable importancia clínica.

**Palabras clave:** Interacción membranas. Matriz extracelular. Fibrinoide placentario.

## SUMMARY

**Objective:** To study the interaction between extracellular matrix and plasma-membranes of maternal and fetal cells with transmission electron microscopy and scan electron microscopy using alcian blue.

**Methods:** Images of transmission electron microscopy and scan electron microscopy micrographs were correlated in sections of membranes in relationship to extracellular matrix stained with alcian blue.

**Setting:** Centro de Investigación y Análisis Asistencial del Núcleo Aragua. Facultad Ciencias de la Salud. Maracay-Venezuela.

**Results:** Microfilaments connect hyaloplasmic matrix with extracellular matrix through plasma membrane. Extracellular matrix showed a granulo filamentous material with areas differently stained with alcian blue, electron dense granules of decidual and trophoblast cells were observed at cellular periphery. Fibrin, degenerating collagen, fibrinoid and granules of diverse size are forming a complex net in the extracellular space.

**Conclusion:** Fibrinoid type matrix was reactive with alcian blue is forming part of the extracellular space observed simultaneously with both techniques at low resolution where physiological interactions are of clinical importance.

**Key words:** Interaction membranes. Extracellular matrix. Placental fibrinoid

\*En honor al recientemente fallecido Dr. Humberto Fernández Moran, fundador de los estudios de ME en el país.

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

Recibido: 24-03-99

Aceptado para publicación: 07-06-99

## INTRODUCCIÓN

El examen de la placa basal de la placenta humana a término mediante microscopía de luz (ML) y microscopía electrónica (ME) ha demostrado la presencia de una población heterogénea de células

(1) en la decidua basal, superficial y profunda, donde permanecen rodeadas por la matriz extracelular que contiene un componente conocido como fibrinoide, el cual ha sido motivo de intensa discusión sobre su origen, composición y significación biológica (2). En esta zona hemos previamente identificado a las células trofoblásticas y deciduales sepultadas por matriz extracelular (3). Las membranas plasmáticas de estas células interactúan con ésta (4). La matriz posee actividad enzimática, transporta nutrientes y almacena agua con electrolitos, envía señales hacia las membranas provenientes de otras células que actúan a distancia y reciben productos secretados por estas células en cuya interacción el fibrinoide juega un papel fisiológico de importancia. Dado que la composición del fibrinoide abunda en glucoproteínas, una evaluación con el azul alcian (5) será dada en esta zona, para destacar su presencia a nivel ultraestructural y ofrecer una mejor imagen. Estas interacciones inciden en el mantenimiento del embarazo en esta etapa, en la función endocrina de la placenta, en los eventos que inician el parto y en el desprendimiento placentario. No se pretende realizar un estudio de alta resolución donde pudieran estar involucradas las macromoléculas de membranas o las que organizan la matriz extracelular. Hasta la fecha, incidentalmente se han mencionado los componentes de la matriz extracelular de placa basal en los trabajos sobre la ultraestructura de las células en estas áreas de la placenta humana.

Los estudios específicos sobre matriz extracelular han sido únicamente realizados en placa coriónica de macaco (6) o estroma de vellosidad de placenta humana inmadura (7). Recientemente ha sido expuesta, con la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB), a baja resolución, las membranas plasmáticas de células trofoblásticas y deciduales (3) en relación con la matriz extracelular. De igual manera fueron descritas con técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET) (4). Nuestro propósito en este estudio es exponer la superficie de las membranas plasmáticas de células deciduales y trofoblásticas sepultadas por una matriz extracelular, que contiene fibrinoide, usando imágenes simultáneas de MEB y MET. Sectores de membranas en relación con la matriz serán mostradas y su interacción descrita haciendo énfasis en notables eventos de importancia fisiológica y clínica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Microscopía electrónica de barrido

Especímenes de decidua tomados de la superficie materna de placenta humana fueron obtenidos de partos a término, de embarazos clínicamente normales y procesados según los procedimientos convencionales de MEB y orientaciones dadas en trabajo previo (3).

### Microscopía electrónica de transmisión

Siguiendo las técnicas convencionales dadas en trabajos previamente realizados (4,8) se tomaron muestras de la decidua materna placentaria de partos normales y sus imágenes fotográficas correlacionadas con las obtenidas de la misma zona con la técnica anterior.

Se observaron sectores de la membrana plasmática en íntimo contacto con la matriz extracelular cuyas imágenes de MEB y MET simultáneamente presentadas dará al lector una visión de corte ultrafino y a la vez tridimensional de la zona que presenta un aspecto semejante.

Las microfotografías exhibidas en forma simultánea con la MEB y MET, fueron tomadas en un rango de magnificaciones diferentes no siendo la correlación perfecta.

### Histoquímica ultraestructural con azul alcian (AA)

Especímenes de placa basal fueron sometidos a un conjunto de procedimientos en el cual el material se fija en glutaraldehído, posteriormente se tiñe con azul alcian 8GX (CIN° 74240, Allied Chemical, EE.UU.), pos-fijado en solución de tetraóxido de osmio y doblemente teñido con acetato de uranilo y citrato de plomo; conocidos como método de Gabouli ampliamente ya descrito en trabajo reciente (5). Éste permite una imagen de mejor contraste de la región en la cual se da la interacción.

## RESULTADOS

Sectores de células intersticiales trofoblásticas, células X-trofoblásticas y deciduales rodeadas por matriz extracelular fueron vistas en la placa basal de la placenta humana a término. Análisis del área cercana a la membrana plasmática de la célula intersticial trofoblástica reveló, con la MET, la presencia de un material microfilamentoso externo asociado en forma continua con ella. En la matriz hialoplasmática de microvellosidades irregulares de

la membrana, microfilamentos semejantes a la actina, se observaron en continuidad con la matriz extracelular. Esta última contiene bandas de fibrina, pequeñísimos gránulos electrón densos aislados o dentro de vesículas de membranas; otros parecen estar disolviéndose. En general la matriz es de aspecto gránulo-filamentoso. Huecos cubiertos se observaron en la membrana (Figura 1). Con la MEB la matriz extracelular, la que estaba asociada a la superficie de membrana observada, casi ha desaparecido y restos de ella se observaron sobre la membrana (Figura 2). En la superficie de las células deciduales un material electrón denso, gránulo-filamentoso, se observa en estrecha asociación con fibras colágenas degeneradas. En íntima adhesión con la membrana plasmática decidual, una lámina externa electrón densa se interrumpe para dar salida a prolongaciones citoplasmáticas en forma de mazo que contienen cuerpos oscuros limitados por membranas (Figura 3). Por MEB, se observaron restos celulares en el lugar donde estaba la matriz



Figura 1. Las flechas indican regiones de microfilamentos de matriz hialoplásmica en continuidad con los de matriz extracelular. Fibrina (F) y gránulos densos de diversos tamaños se observan. Barra: 1 $\mu$ .

extracelular y la lámina externa electrón densa no se observó en la célula decidual (Figura 4).

Ocasionalmente, se notó en una célula intersticial trofoblástica gránulos secretorios intracitoplasmáticos limitados por membranas (Figura 5) cercanos a la superficie celular. Mediante MEB se observaron pequeñas vejigas esféricas sobre la superficie de estas células así como una membrana densamente poblada de microvellosidades irregulares (Figura 6).

Células-X trofoblásticas caracterizadas por contener abundantes láminas de retículo endoplasmático rugoso (reR) paralelas se mostraron reactivas al azul alcian y presentaron extensas prolongaciones de membranas que abrazan regiones de fibrinoide. Éstas fueron vistas como fagocitando material extracelular (Figura 7). Entre las cisternas de reR y a nivel subcisternal un material alcianofílico similar al observado en la matriz extracelular suele notarse. Ésta permaneció fuertemente adherida a la membrana celular y se notó en dos tonalidades electrón densas observándose regiones claras y oscuras (Figura 7). En otros casos, la matriz se separa de la membrana dejando espacios vacíos. Estos logran, a veces, rodear a toda la célula (Figura 8).

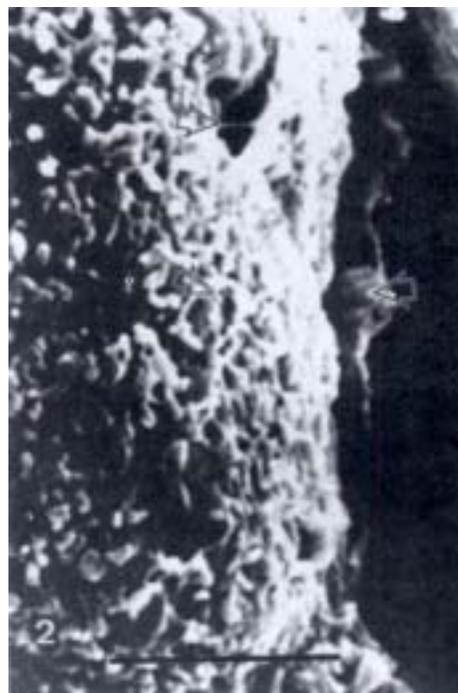


Figura 2. Sobre pliegues irregulares de membrana plasmática un material fijado, deshidratado y desecado se observa sobre la superficie (Flechas) Barra 5 $\mu$ .



Figura 3. Al lado derecho de la micrografía se observa el fibrinoide tipo matriz (\*) con colágena degenerada. La flecha indica la membrana basal de la célula decidua. Barra: 1 $\mu$ .



Figura 4. Región de la superficie de célula decidua con estructuras de forma de mazo o bacilos. Las flechas indican extensiones de la membrana semejantes a agrupaciones de bacterias. Barra: 2,5  $\mu$ m.



Figura 5. Sector de célula intersticial con rasgos de elevada actividad de biosíntesis y gránulos secretorios cercanos a la superficie de la membrana plasmática. Barra: 1 $\mu$ .



Figura 6. Pequeñas vejigas esféricas (flecha) parecen liberar un producto mediante exocitosis hacia la matriz extracelular.



Figura 7. Se observa un material intracitoplasmático (\*) alcianofílico de naturaleza similar al de la matriz extracelular. Prolongaciones citoplasmáticas separan regiones de fibrinoide claras y oscuras. Barra: 1µm.

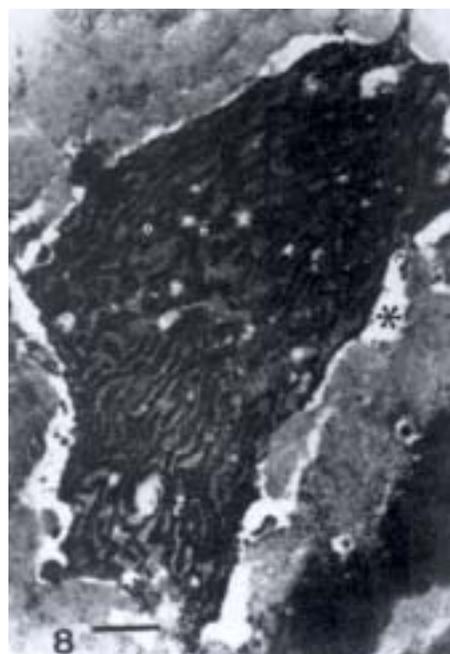


Figura 8. Dos regiones electrón densas diferencialmente contrastadas se observan abajo y a la derecha. Zonas de separación de fibrinoide de la membrana plasmática o áreas de lisis (\*) se notan alrededor de la célula. Barra: 1µm.

## DISCUSIÓN

Las imágenes aquí presentadas con MET y MEB contribuyen a identificar, esclarecer o mejorar el entendimiento sobre el papel que cumplen las membranas de los tipos celulares, genéticamente diferentes, en la zona materno-fetal; o lo que sería de interés para las investigaciones que actualmente se realizan en esta área de interacción con la matriz extracelular. Lo realmente nuevo en este trabajo es la exhibición simultánea de imágenes, en la región de Nitabuch, con las técnicas de MET y MEB, que dan una imagen más informativa del sector de la membrana que interrelaciona con la matriz intracelular no lograda hasta la fecha al final del embarazo.

La matriz aquí estudiada corresponde a un complejo macromolecular de la materia viva organizado por una multiplicidad de componentes procedentes unos del plasma sanguíneo y otros de la actividad celular (4).

Un componente de esta sustancia extracelular es el fibrinoide tipo matriz formado por fibronectina oncofetal (Secuencia ED-B), colágeno IV, laminina y tenascina; producido por células trofoblásticas extravelosas ya descrito, con técnicas de MET e inmunohistoquímica por Frank y col. (9). Estos autores no detectaron la fibrina en la zona de estudio aquí descrita contrastando con nuestros resultados.

Las membranas plasmáticas se relacionan con la matriz extracelular en un mecanismo mediado por el citoesqueleto (10).

En la placa basal a término ocurren simultáneamente degeneración y multiplicación celular. La interacción de las membranas plasmáticas de células trofoblásticas con mallas de fibrina estimulan su mitosis (11). Es un hecho conocido que la muerte de éstas se acompaña con deposición de fibrina, evento que viene incrementándose desde los inicios del embarazo. Estos eventos parecen participar en un proceso permanente de remodelación, al nivel de

la placa basal, hasta llegar el momento del parto. Por otro lado, es posible que las células -X degraden esta matriz con metaloproteinasas. A término, este evento dejaría espacios alrededor de células, las que al morir crean pseudoquistes que se fusionan facilitando el desprendimiento placentario (4). La deposición de fibrina en la matriz extracelular no solamente favorece la integridad de la pared de los vasos, que circulan por la placa basal, sino también que al final del embarazo facilita el cierre de ellos después de la separación placentaria. Una disminución del colágeno tipo IV y de fibrina en la matriz extracelular ha sido causa de aborto espontáneo; de allí la importancia de estos estudios.

Glicoproteínas transmembranales denominadas integrinas son receptores de las proteínas como colágeno, fibronectina y laminina que se expresaron en estas células y regularon la migración e invasión en las etapas tempranas de la implantación (12). Además ayudan a formar la matriz extracelular recibiendo señales moleculares enviadas por transducción desde ella. Mientras el trofoblasto invade la decidua, se ancla a la fibronectina que le sirve de plataforma para su migración; siendo detenida ésta por tenascina que interfiere cuando cesa el movimiento. La alteración de este mecanismo fisiológico tiene una enorme repercusión clínica. En los casos de acretismo placentario; el escenario aquí descrito para estas interacciones está notablemente disminuido por una reducción de la decidua que provoca una interacción defectuosa, anclándose el trofoblasto en el miometrio y creando un embarazo de alto riesgo ante la imposibilidad de desprenderse la placenta. Las células deciduales secretan cuerpos electrón densos limitados por membranas, con actividad lisosómica cuya liberación en la matriz extracelular puede provocar la lisis de sus componentes o de otras células favoreciendo los procesos degenerativos (13,14).

En la placa basal, ninguna de las células trofoblásticas se había observado como en la Figura 5, secretando gránulos de contenido desconocido, el cual muy probablemente, se descompone en gránulos más pequeños en la matriz extracelular. Esta observación casual probablemente se debe a que fue tomada en el momento en que se recibían señales para la secreción de forma pulsátil (8). Este trabajo asigna un papel endocrino a la placa basal de la placenta humana y expresa la evidencia ultraestructural de secreción no demostrada hasta la fecha en esta región. Esto ha sido confirmado por la

localización de gránulos de hormona liberadora de corticotropina (CRH) en esta zona (15) con técnicas de inmunocitoquímica. Existe la hipótesis (16) de que esta CRH actúa a nivel de la pituitaria fetal activando la hormona estimulante de la corteza adrenal (ACTH) responsable del aumento de los glucocorticoides fetales que a su vez estimulan la producción de estradiol y progesterona en la placenta.

Estos dos compuestos activan la síntesis de prostaglandinas y oxitocina, sintetizadas, en parte, por las células aquí estudiadas, cuya acción inicia las contracciones uterinas durante el trabajo de parto. La similitud del material alcianofílico subcisternal con el de la matriz extracelular hace pensar que estamos en presencia del fibrinoide tipo matriz de Frank y col. (9). Dado que la mayoría de los componentes de éste son glicoproteínas reactivas con el AA (5) se notó un contraste de tonalidades explicada por una mayor concentración de glicoproteínas en la imagen oscura y una menor en la imagen clara. Este estudio permitió la tinción del fibrinoide tipo matriz depositado en forma no polarizada. El de tipo fibrina no localizado por Frank y col. (9) en la placa basal, que tiene un aspecto semejante al observado en la Figura 1, debería ser motivo de atención (7) en las zonas de intensos cambios degenerativos.

En conclusión, una demostración en la región deciduo-trofoblástica de la placa basal de placenta humana, ha sido lograda, por primera vez, con imágenes simultáneas de MET y MEB en sectores de membrana plasmática en estrecha relación con la matriz extracelular en un esfuerzo por entender múltiples interacciones que tienen repercusión fisiológica y clínica. La tinción mediante la técnica de histoquímica ultraestructural con el azul alcian permitió teñir el fibrinoide tipo matriz en dos áreas diferencialmente contrastadas según el contenido de glicoproteínas depositadas en forma no polarizada.

#### **Agradecimiento**

A los Dres. Orlando Castejón y Haydee de Castejón por facilitar la infraestructura de laboratorio para la técnica del azul alcian en el IIB, Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia (LUZ). A los técnicos Italo Pacheco del Laboratorio de MET de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Central de Venezuela, Maracay; Raúl Colina y Milagros Díaz del Instituto de Investigaciones Odontológicas

de la Universidad Central de Venezuela, Caracas por su asistencia técnica. A la Sra. Keyla Aguilar por mecanografiar el manuscrito; y a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo por el fondo fijo institucional.

#### REFERENCIAS

1. Panigel M. Anatomy and morphology. En: Chard T, editor. *Clinics in obstetrics and gynaecology. The human placenta*. London: WB Saunders Co.; 1986;13:421-445.
2. Movat HZ. The concept of fibrinoid. *Am J Med Sci* 1958;236:373-382.
3. Castejón OC, Belouche CR, Morett de Castejón V. Identificación celular en la placa basal de placenta humana. *Rev Obstet Ginecol Venez* 1998;58:77-81.
4. Castejón OC, Belouche CR, Morett de Castejón V. Células deciduales y trofoblásticas: su interacción con la matriz extracelular de fibrinoide. *Gac Méd Caracas* 1998;106:231-236.
5. Castejón OC, Belouche CR, Morett de Castejón V. Demostración histoquímica ultraestructural de carbohidratos en el trofoblasto de la placenta humana con el azul alcian. *Gac Méd Caracas* 1998;106:7-12.
6. King BF, Blankenship TN. Differentiation of the chorionic plate of the placenta: Cellular and extracellular matrix changes during development in the macaque. *Anat Rec* 1994;240:267-276.
7. Rukosuev VS. Immunofluorescent localization of collagen types I,III,IV,V, fibronectin, laminin, entactin, and heparan sulphate proteoglycan in human immature placenta. *Experientia* 1992;48:285-287.
8. Castejón OC, Belouche CR, Morett de Castejón V. Filamentos citoplasmáticos y secreción celular en células trofoblásticas X de la placa basal de placenta humana a término. *Gac Méd Caracas* 1997;105:520-524.
9. Frank HG, Malekzadeh F, Kertschanska S, Crescimanno C, Castelluci M, Lang Y, et al. Immunohistochemistry of different types of placental fibrinoid. *Acta Anat Basel* 1994;150:55-68.
10. Burrige K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. Focal adhesions: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Ann Rev Cell Biol* 1988;4:487-525.
11. Nelson DM, Crouch EC, Curran EM, Farmer DR. Trophoblast interaction with fibrin matrix. Epithelialization of perivillous fibrin deposits as a mechanism for villous repair in the human placenta. *Am J Pathol* 1990;136:855-865.
12. Burrows TD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update* 1996;2:307-321.
13. Alexander CM, Werb Z. Extracellular matrix degradation. En: Hay ED, editor. *Cell Biology of extracellular matrix*. New York: Plenum Press; 1991.p.255-302.
14. Castejón OC. An electron microscopic study of decidual cells of the human placenta at term. *Rev Microelect Biol Cel* 1984;1:49-69.
15. Warren WB, Silverman AJ. Cellular localization of corticotrophin releasing hormone in the human placenta, fetal membranes and decidua. *Placenta* 1995;16:147-156.
16. Gómez TG. Endocrinología del embarazo. En: Rodrigo Cifuentes B, editor. *Obstetricia de Alto Riesgo*. 4ª edición. Cali, Colombia: Aspromédica; 1994.p.49-63.
17. Caltabiano S, Wu S, Strauss JF, Kliman HJ. The human villous cytotrophoblast: Interactions with extracellular matrix proteins, endocrine function, and cytoplasmic differentiation in the absence of syncytium formation. *Dev Biol* 1988;130:693-702.

Dirección de la Correspondencia:

Prof. Olivar Castejón. Laboratorio de Microscopía Electrónica. CIADANA. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Maracay-Aragua. Apdo. 4944 Telfs. (043) 710627; Fax: 710647