

MICROCUERPOS Y VACUOLAS COMO INDICADORES HISTOLÓGICOS DEL ESTADO DE SALUD DE LA PLACENTA. UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO EN TEJIDO DE MOLA HIDATIFORME COMPLETA

Ivonne Martínez ¹, Vicente Signorile ², Marco Álvarez ³

RESUMEN: *Durante la gestación la membrana del Sincitiotrofoblasto libera, hacia la circulación materna, vesículas en forma de exosomas, micro vesículas y cuerpos apoptóticos considerados como indicadores bioquímicos del estado de salud placentaria por su detección en sangre durante el embarazo. Sin embargo, la lectura histológica cuantitativa de las mismas ha sido poco considerada. Se identificaron y cuantificaron las poblaciones de microcuerpos (MC) y vacuolas (V) en preparaciones histológicas de biopsias de tejido placentario con Mola Hidatiforme Completa. La histología del tejido teñido con H&E fue registrada en imágenes digitales y analizada por segmentación a través del Programa ImageJ Fiji. La deconvolución de color permitió seleccionar ambas poblaciones como inclusiones Hematoxilínicas. Su cuantificación fue realizada a través de la Redondez ($R=4 \cdot \text{área} / \pi \cdot \text{eje mayor}^2$) y el Área Radial ($AR = \text{Eje Mayor} / \text{Eje Menor}$), respectivamente. La exactitud de la selección fue estimada en función de la relación de sensibilidad/especificidad determinada por el Área Bajo la Curva (ABC) de una curva ROC con el apoyo del Programa Estadístico GraphPad Prims, seleccionado el ANOVA de una vía como prueba estadística. El 80% de las muestras analizadas presentó vellosidades con borde irregular y degeneración hidrópica en el estroma. Los valores del ABC correspondieron a un 68,75% y 76,25%, respectivamente. Ambos valores presentaron diferencias significativas en intervalos de confianza del 95%. **** $p < 0.0001$. La población de MC presentó inclusiones hematoxilínica condensada, fragmentada y en micro núcleos. La población de V presentó inclusiones fagocitadas. El análisis morfométrico dio una lectura histológica del grado de la salud placentaria.*

PALABRAS CLAVE: *microcuerpos, vacuolas, Mola Hidatiforme Completa, indicadores histológicos, salud placentaria*

ABSTRACT: *During gestation, the Syncytiotrophoblast membrane releases vesicles in the form of exosomes, micro vesicles and apoptotic bodies into the maternal circulation, considered as biochemical indicators of the state of placental health due to their detection in blood during pregnancy. However, the quantitative histological reading of them has been little considered.*

MICROCUERPOS Y VACUOLAS COMO INDICADORES HISTOLÓGICOS DEL ESTADO DE SALUD DE LA PLACENTA. UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO EN TEJIDO DE MOLA HIDATIFORME COMPLETA

*micro body populations (MC) and vacuoles (V) were identified and quantified in histological preparations of complete hydatidiform mole placental tissue biopsies. The histology of the H & E-stained tissue was recorded on digital images and analyzed by segmentation through the Image J Fiji Program. The included color deconvolution will select both populations as hematoxylin inclusions. Its quantification was carried out through Roundness (R) = 4. Area / π . major axis² and Radial Area (RA) = Major Axis / Minor Axis, respectively. The accuracy of the selection was estimated based on the sensitivity / specificity relationship determined by the Area Under the Curve (AUC) of a ROC curve with the support of the GraphPad Prims Statistical Program, selecting the one-way ANOVA as the statistical test. 80% of the analyzed samples presented villi with irregular borders and hydropic degeneration in the stroma. The ABC values correspond to 68.75% and 76.25%, respectively. Both values mean significant differences in 95% confidence intervals. **** p < 0.0001. The MC population presented condensed, fragmented and micro-nuclei hematoxylin inclusions. The population of V presented phagocytosed inclusions. Morphometric analysis gave a histological reading of the degree of placental health.*

KEY WORDS: *microbodies, vacuoles, Complete Hydatidiform Mole, histological indicators, placental health.*

¹ Estudiante PEEI. Escuela de Medicina Luis Razetti. Facultad de Medicina. UCV. ORCID: 0000-0002-9695-5068

² estudiante PEEI. Escuela de Medicina Luis Razetti. Facultad de Medicina. UCV. ORCID:0000-0002-4308-8642

³ Profesor Titular. Licenciado en Biología. MSc., PhD. Director del Instituto Anatómico "José Izquierdo". Facultad de Medicina. UCV. ORCID:0000-0002-17814532

Recibido: 13/01/2021

Aceptado:29/07/2021

INTRODUCCIÓN

Durante la Patología Trofoblástica Gestacional el árbol vellositario de la placenta experimenta un proceso de crecimiento difuso o hiperplasia trofoblástica que le proporciona la característica morfológica de un "racimo de uvas" ¹.

Dentro de esta patología destaca la Mola Hidatiforme Completa (MHC), caracterizada por la presencia de vellosidades hidrópicas, avasculares y de notable hiperplasia trofoblástica ². Estos cambios son menos marcados en la Mola Hidatiforme Parcial ³. Las

diferencias histológicas han dificultado la identificación de parámetros morfológicos que puedan contribuir con un mejor conocimiento de la salud placentaria. Durante el proceso de gestación, inclusiones celulares como las vesículas extracelulares unidas a la membrana de Sincitiotrofoblasto (ST), epitelio derivado del Citotrofoblasto (CT)⁴, son liberadas en forma de exosomas, micro vesículas y cuerpos apoptóticos desde la superficie de la placenta hacia la circulación materna. Esta liberación de exoproductos celulares conlleva también la liberación de otros factores derivados del ST, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que en su conjunto podrían ser indicativos de la condición del embarazo, ya que desencadena procesos inflamatorios y disfuncionalidad del endotelio vascular causante en parte de los síntomas en la patología del embarazo y/o el riesgo para vida de la gestante⁵. A pesar que estos exoproductos han sido promovidos como posibles indicadores del estado placentario, siendo analizados a nivel bioquímico en biopsias tomadas del ST circulante y disponible en una muestra de sangre durante el embarazo⁶, una lectura histológica cuantitativa de los

mismos, hasta donde se conoce han sido poco considerados. Dicha lectura pudiera contribuir a disminuir la cantidad de evaluaciones diagnósticas que dejan incompleto un buen estado de la salud placentario en este tipo de patología; patologías que si bien, han sido descritas como benignas, un diagnóstico poco claro de las mismas traería consecuencias el desarrollo a futuro de mayores lesiones que comprometerían a escalas superiores la vida de las pacientes que la padecen. En los últimos tiempos el análisis histológico de regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés), a nivel del tejido o de la célula, se ha visto favorecido con las técnicas de segmentación en todas sus modalidades⁷. La aplicación de protocolos de segmentación a través de umbrales de densidad⁸, realizada sobre cortes histológicos contrastados con Hematoxilina y Eosina (H&E), ha proporcionado información cuantitativa más precisa de este complicado y variable patrón anatómico e histológico del epitelio vellosos de la MH⁹. El objetivo de la investigación fue identificar y cuantificar las poblaciones de microcuerpos (MC) y vacuolas (V) en preparaciones histológicas de biopsias

MICROCUERPOS Y VACUOLAS COMO INDICADORES HISTOLÓGICOS DEL ESTADO DE SALUD DE LA PLACENTA. UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO EN TEJIDO DE MOLA HIDATIFORME COMPLETA

de tejido placentario con Mola Hidatiforme Completa.

MÉTODOS

Muestras histológicas

Se realizó un estudio retrospectivo con muestreo no probabilístico de muestras de histopatología provenientes de biopsias de tejido placentario con diagnóstico de MHC, de un grupo de 10 pacientes, y criterios histopatológicos cualitativos descritos en fuentes literarias previas ¹⁰. Las muestras fueron autorizadas y entregadas por el Dr. Rafael Cortés-Charry, con el respectivo consentimiento informado de acuerdo con las directrices y la aprobación del Comité de Ética de Investigación del Hospital Clínico Universitario. Universidad Central de Venezuela

Adquisición de las imágenes

Las muestras consistieron en preparaciones de cortes histológicos seriados de 5 micras, teñidos con Hematoxilina y Eosina. Estos fueron registrados en imágenes digitales adquiridas a través de un sistema de captura Capture IC.22. Imaging Source,

incorporado a un Microscopio Olympus BX50, en un número de 5 cinco imágenes por cada corte, siguiendo la trayectoria longitudinal de la región periférica. Se hizo énfasis sobre la población de microcuerpos (MC) y la población de vacuolas (V) de la región del ST.

Procesamiento de la imagen

El análisis por segmentación de la población nuclear, a través del Programa ImageJ Fiji, comenzó con la deconvolución de color para seleccionar solo cuerpos con propiedades tintóreas en el espectro de Hematoxilina. Seguidamente se realizó la transformación hacia imágenes en blanco y negro de 8 bit, se ajustó el contraste y se realizó la calibración respectiva. Una vez realizada la transformación de la imagen original se procedió a la segmentación y selección de las áreas de interés, particularmente la población de microcuerpos y la población vesicular, a través de los parámetros histomorfométricos tales como la Redondez $(R)=4 \cdot \text{área} / \pi \cdot \text{eje mayor}^2$ y el Área Radial $(AR)=\text{Eje Mayor} / \text{Eje Menor}$; valores estos

obtenidos en función de la intensidad del umbral en escala de grises reflejado en la imagen binaria o máscara. La exactitud del proceso de selección de MC y de V, fue estimada en función del valor arrojado de la relación sensibilidad/especificidad expresada en el Área Bajo la Curva (ABC) de una curva ROC (Receiver-Operating Characteristic, por sus siglas en inglés)¹¹, con el apoyo del Programa Estadístico GraphPad Prims, seleccionado el ANOVA de una vía como prueba estadística.

RESULTADOS

El 80% de las muestras analizadas presentó hipertrofia trofoblástica con vellosidades de borde irregular, así como degeneración hidrópica en el estroma de la vellosidad (Figura 1A). La hipertrofia trofoblástica mostró una fuerte actividad proliferativa con presencia de numerosos microcuerpos (MC) y vacuolas (V), destacados por segmentación (Figura 1A.1 y 1A.2), respectivamente. Las poblaciones de MC y V quedaron seleccionadas por su R (Figura 2) y AR (Figura 3), con una exactitud de 68,75% (Figura 4) y 76,25% (Figura 5), respectivamente. Ambos

valores presentaron diferencias significativas enmarcados en intervalos de confianza de 95%. Respecto a la población de los MC, esta presentó un mayor pico de frecuencia por selección con el parámetro R respecto al parámetro AR. Hubo diferencias significativas entre ambos perfiles de frecuencia **** $p < 0.0001$. A nivel morfológico la población de MC presentó varios patrones de conformación con distinta frecuencia de distribución (Figura 6). Así, se pudo identificar cuerpo de intensidad hematoxilínica condensada (T1), de intensidad con distribución fragmentada de bordes irregulares (T2 y T3), así como micronúcleos de hematoxilina condensada en micronúcleos (T4). Estos últimos en una mayor frecuencia respecto a T2, T3 y T1. La población de vesículas presentó un mayor pico de selección por segmentación con el parámetro AR respecto al parámetro histomorfometría R. Hubo diferencias significativas entre ambos perfiles de frecuencia **** $p < 0.000$. A nivel morfológico la población de V presentó varios patrones; uno caracterizado por una población de baja frecuencia conformada por

MICROCUERPOS Y VACUOLAS COMO INDICADORES HISTOLÓGICOS DEL ESTADO DE SALUD DE LA PLACENTA. UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO EN TEJIDO DE MOLA HIDATIFORME COMPLETA

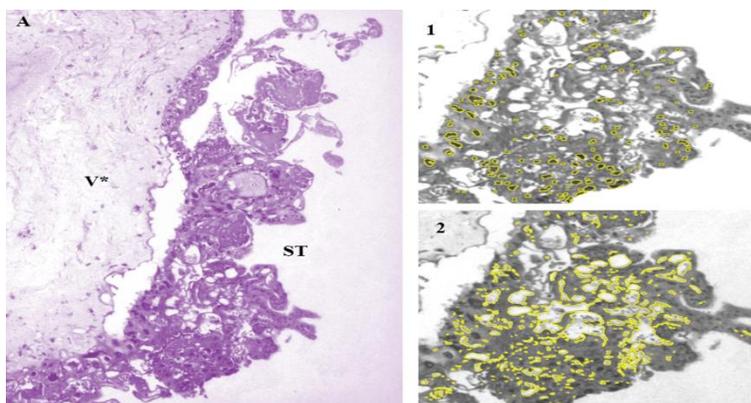


Figura 1. Tejido de Mola Hidatiforme Completa (MHC). Sincitiotrofoblasto (DT) Estroma hidrópico (V*). Imágenes RGB-Hematoxilina-8-bit (A). Segmentación de la población de microcuerpos (MC) (1) Vesículas (V) (2), respectivamente. X 250.

Fuente: Elaboración propia.

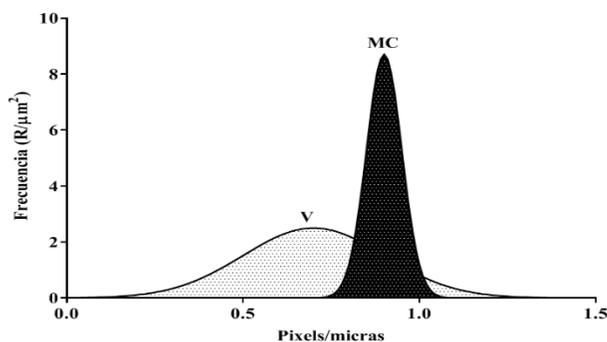


Figura 2. Frecuencia de distribución de los MC y V. Media= 9.9 ± 0.0057 (MC) y 0.7 ± 0.2 (V) respectivamente N=200.

Fuente: Elaboración propia.

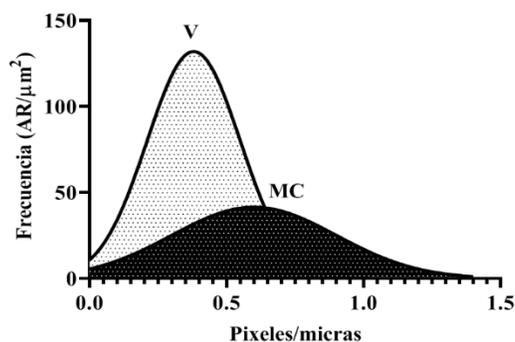


Figura 3. Frecuencia de distribución de MC y V. Parámetro AR. Media= 0.19 ± 0.32 y 0.69 ± 0.30 respectivamente N=200.

Fuente: Elaboración propia.

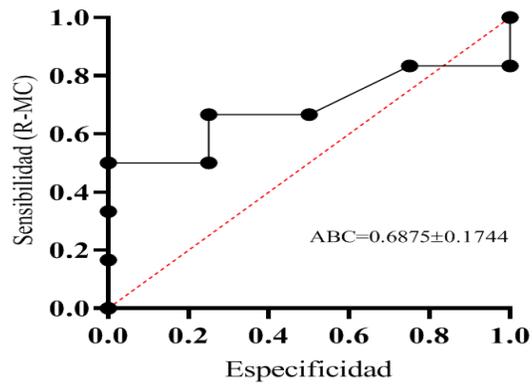


Figura 4. Precisión del parámetro $R=4 \cdot \text{area} / \pi \cdot \text{eje mayor}^2$ en la segmentación de MC. $ABC=0.6875 \pm 0.744$. IC 95% 0.3457 a 1.000. $p=0.3374$.
Fuente: Elaboración propia.

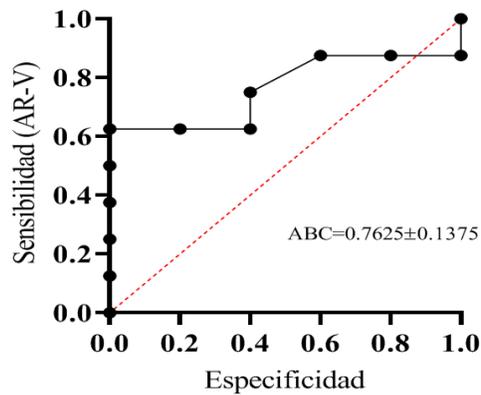


Figura 5. Precisión del parámetro $AR=\text{Eje mayor}/\text{eje menor}$ en la segmentación de V. $ABC=0.7625 \pm 0.1375$. IC 95% 0.4931 a 1.000. $p=0.1243$.
Fuente: Elaboración propia.

MICROCUERPOS Y VACUOLAS COMO INDICADORES HISTOLÓGICOS DEL ESTADO DE SALUD DE LA PLACENTA. UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO EN TEJIDO DE MOLA HIDATIFORME COMPLETA

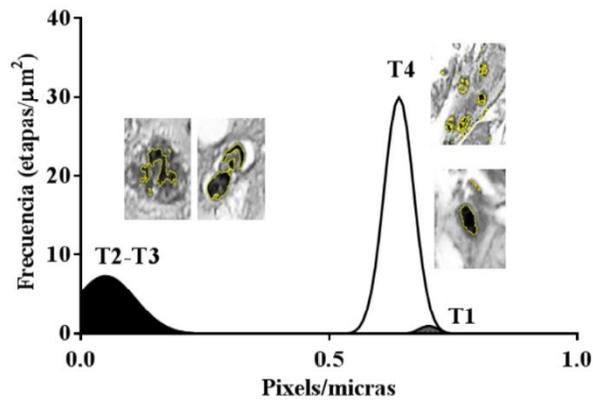


Figura 6. Histograma de frecuencia de microcuerpos (MC) en diferentes etapas T1 (cuerpos condensados), (T2 y T3) cuerpos fragmentados, T4 (microcuerpos).

Fuente: Elaboración propia.

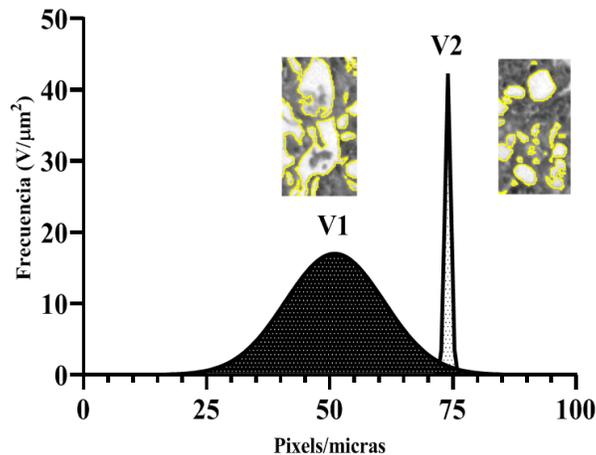


Figura 7. Segmentación de vacuolas. V1. Vacuolas con elementos fagocitados. V2. Vacuolas vacías. Imagen 8-bit hiperplasia.

Fuente: Elaboración propia.

vesículas con inclusiones fagocitadas, y otra de mayor frecuencia conformada por una población de vacuolas sin las inclusiones fagocitarias (Figura 7).

DISCUSIÓN

El análisis morfométrico del tejido placentario con MHC, permitió dar una lectura histológica cuantitativa de las poblaciones de MC y V, presentes en el

ST, permitiendo así identificarlas como unos posibles índices histológicos con potencial predictivo del grado de la salud placentaria. Dicha cuantificación morfométrica pudiera ser complementaria a la cuantificación bioquímica de dichos componentes para un mejor diagnóstico asociado con la Patología Trofoblástica Gestacional. Dicho potencial quedó fortalecido o por el nivel exactitud obtenido durante la selección de ambas inclusiones a través de los parámetros R y AR obtenidos por la segmentación del tejido placentario analizado. Las inclusiones celulares descritas, recuerdan la fina morfología de los cuerpos de hematoxilina, que a nivel de la microscopía fotónica, han sido descritas como cuerpos pleomorfos y predominantemente de origen celular, en donde los componentes nucleares, responsables de las propiedades tintóreas características, aparecen como micro cuerpos de agregados de cromatina aglomerada y / o masas irregulares de material lobulado, finamente granular y moderadamente denso, mientras que los componentes citoplasmáticos aparecen como una multitud de vesículas, vacuolas, gránulos en degeneración y glucógeno, como ha

sido descrito por otros autores ¹² . Cabe destacar que el ST, corresponde a una monocapa epitelial que reviste la superficie vellositaria coriónica y que forma parte de la barrera placentaria que separa la sangre materna, que circula libremente en la cámara hemática, de la sangre fetal. Se caracteriza por cubrir ininterrumpidamente la superficie del árbol vellositario, así como las superficies internas de la placa coriónica. Esta capa sincicial se origina por fusión de las células del Citotrofoblasto (CTB) y está representada por células de citoplasma con múltiples núcleos. A nivel fisiológico el ST cumple con el intercambio metabólico madre-feto y viceversa, además de poseer una gran actividad endocrina, liberadora de distintas hormonas que participan en la homeostasis del embarazo. Sin embargo, no posee actividad proliferativa, esta se mantiene funcionalmente activa a través de la incorporación continua de células desde el CTB mediante el proceso de fusión sincicial ¹³ . Durante dicho proceso de fusión sincicial se activa la cascada apoptótica ¹⁴ del CTB, dando origen a un material celular envejecido que es desechado y vertido desde la superficie

MICROCUERPOS Y VACUOLAS COMO INDICADORES HISTOLÓGICOS DEL ESTADO DE SALUD DE LA PLACENTA. UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO EN TEJIDO DE MOLA HIDATIFORME COMPLETA

apical del ST hacia la circulación materna como agregados de cromatina o cuerpos apoptóticos y numerosas vesículas o cuerpos vacuolados ¹⁵. De manera que, si la interpretación de nuestras observaciones es correcta, en este estudio se corrobora que las inclusiones celulares, clasificadas como cuerpos de hematoxilina, por el proceso de deconvolución de color aplicado durante el procesamiento de las imágenes, podrían ser correlacionados con los cuerpos apoptóticos liberados al torrente sanguíneo y detectados en biopsias de muestras sanguíneas, pero que en el presente trabajos han sido cuantificados a nivel histológico con su ubicación en el tejido por segmentación ¹⁶. La cuantificación morfométrica de estas inclusiones celulares podría por tanto complementar la cuantificación de los mismos realizada a por vía sanguínea, sumándole así una mayor resolución al proceso diagnóstico del estado placentario en el caso de enfermedades trofoblástica como la MHC.

CONCLUSIONES

La lectura histológica cuantitativa tejido placentario con diagnóstico de mola hidatiforme completa permitió valorar a la población de microcuerpos y vacuolar como unos posibles índices morfométricos de la salud placentaria, contribuyendo así al aumento de la resolución durante el proceso diagnóstico de enfermedades trofoblástica como la MHC.

REFERENCIAS

1. Candelier JJ. The hydatidiform mole. Cell Adh Migr. 2016; 10 (1-2): 226-235.
2. Ezpeleta J M, Causillas L A. Enfermedad Trofoblástica Gestacional. Aspectos clínicos y morfológicos. Rev Esp Patol.2002; 35 (2): 187-200.
3. Fernández E A, Espinoza A F, Del Valle F R. Actualización en patología trofoblástica gestacional: mola Hidatiforme y neoplasias. Revista Médica Sinergia. 2019; 4 (5): pp. 44-59.
4. Tannetta D, Collett G, Vatish M, Redman C, Sargent I. Syncytiotrophoblast extracellular vesicles Circulating biopsies reflecting placental health. Placenta. 2017; 52:134-138.
5. Tong M, Kleffmann T, Pradhan S, Johansson C.L, De Sousa J, Stone P.R.

Proteomic characterization of macro-micro- and nano-extracellular vesicles derived from the same first trimester placenta: relevance for feto-maternal communication. *Hum. Reprod.* 2016; 31(4): 687–699.

6. Tannetta D, Masliukaite I, Vatish M, Redman C, Sargent I. Update of Syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* 2016; S0165-0378 (16): 30388-6.

7. Auer G, Askensten U, Ahrens O. Cytophotometry. *Hum Pathol.* 1989; 20(6): 518-527.

8. Schwendy M, Unger RE, Bonn M, Parekh SH. Automated cell segmentation in FIJI® using the DRAQ5 nuclear dye. *BMC Bioinformatics.* 2019; 20(1):20–39.

9. Sezgin M, Bulent S. Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. 2004; 13(1): 146-165.

10. Cortés-Charry R, Aleydah S, García-Barriola V, Dabed P, Figueira L M, Izildinha M D. Hydatidiform Mole in Ectopic Pregnancy Clinical, Imaging, Pathological and Immunohistochemical Characteristics. *The Journal of Reproductive Medicine.* 2012; 57 (7-8):329-332.

11. Domínguez A E, González S R. Análisis de las curvas receiver-Operating

Characteristic: un método útil para evaluar procederes diagnósticos. *Rev cubana Endocrinol* [Internet] 2002 [Citado 14 de Agosto de 2020]; 13(2). Disponible en:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532002000200010&lng=es.

12. Cohen AH, Zamboni L. Ultrastructural appearance and morphogenesis of renal glomerular hematoxylin bodies. *Am J Pathol.* 1977; 89(1):105-118.

13. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol* 2008; 61:1296-302.

14. Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korr H, Kaufmann P. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: Analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Invest* 1999; 79:1687-702.

15. Hardy K. Apoptosis in the human embryo. *Rev Reprod* 1999; 4:125-34.

16. Xing F., Yang L. Detección robusta de núcleos / células y segmentación en patología digital e imágenes de microscopía: una revisión exhaustiva. *IEEE Rev. Biomed. Ing.* 2016; 9: 234–263.

CORRESPONDENCIA

Marco Álvarez. Dirección: Instituto Anatómico “José Izquierdo” Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Teléfono: 0212 6053449. Dirección de correo electrónico: alvarezmenator@gmail.com.