

# Células deciduales y trofoblásticas: su interacción con la matriz extracelular de fibrinoide

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

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

## RESUMEN

*Con el propósito de estudiar la interacción de matriz extracelular con membranas de células fetales y maternas, se hizo un estudio de microscopía electrónica de transmisión, cultivo primario de tejido de placa basal de placenta humana y tinción con azul alcian. Los resultados revelaron un material microfilamentoso entremezclado con fibras degeneradas de colágeno, fibrina y restos celulares en la periferia celular. Se observaron gránulos electrón-densos secretorios cercanos a las membranas plasmáticas y gránulos electrón-densos, pequeños, aislados, que corren en una compleja red de microfilamentos extracelulares. Una trama de microfilamentos citoplasmáticos, reactivos al azul alcian, semeja ser continua con una red similar extracelular. Dos áreas de desigual densidad electrónica fueron teñidas con el colorante, correspondientes al fibrinoide tipo matriz que rodea a la célula trofoblástica. La interacción de esta matriz es discutida, con énfasis en eventos fisiológicos de notable importancia clínica.*

*Palabras clave: Membrana plasmática. Interacción. Matriz extracelular. Células deciduales-trofoblásticas.*

## SUMMARY

*In order to study interaction of extracellular matrix and plasmamembrane of fetal and maternal cells a transmission electron microscopy study, primary tissue culture of human placental basal plate and staining with alcian blue were made. The findings revealed granulo-filamentous material mixed with degenerating collagen fibers, fibrin and cellular debris at the cellular periphery. Secretory electron dense granules were seen near plasma membrane and electron dense smaller granules run into a extracellular filamentous complex net. A mesh of alcianophilic cytoplasmic microfilaments is in continuity with a similar net at the extracellular space.*

*Two areas of different electron density were stained with alcian blue which correspond to matrix type fibrinoid surrounding trophoblast cell. The interaction of this matrix and plasma membranes is discussed with emphasis in events of clinical and physiological importance.*

*Key words: Plasma membranes. Interaction. Extracellular matrix. Decidual-trophoblast-cells.*

## INTRODUCCIÓN

El fibrinoide es un componente complejo (1) de la matriz extracelular que rodea a las células deciduales, trofoblásticas u otras de la placa basal de placenta humana a término. Este ha sido motivo de intensa discusión sobre su origen, naturaleza, o función desde la década de los años cuarenta hasta la fecha. Se llegó a concluir que era una manifestación morfológica inespecífica de etapas terminales de varios procesos biológicos que surgía como producto de secreción o degeneración de ambas células, deciduales o trofoblásticas, y de la transformación de la substancia intercelular en la que permanecen incluidas (2).

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

\*\*Médico Residente del Departamento de Gineco-Obstetricia del Hospital "Ángel Larralde", IVSS, Valencia, Investigador visitante del CIADANA.

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

En general, en la placenta, los estudios sobre matriz extracelular han sido únicamente realizados en placa coriónica de macaco (3) o estroma de vellosidad de placenta humana inmadura (4). Incidentalmente se han mencionado los componentes de la matriz extracelular en la placa basal en trabajos sobre la ultraestructura de células en esa región.

La matriz extracelular, en tejidos diferentes a la placenta, está compuesta de agua, iones, glucosaminoglucanos/proteoglucanos, glicoproteínas, en la que proteínas fibrilares como colágeno, reticulina, inmersas en ellas, forman una compleja red. Esta se describe como amorfa, homogénea, con actividad enzimática (5), capaz de transportar nutrientes y almacenar agua con electrolitos.

En este trabajo, el ya discutido componente de la matriz celular conocido como fibrinoide será teñido con la técnica, para carbohidratos complejos, del azul alcian (AA) (6) para destacar su presencia a nivel ultraestructural. Se hará una evaluación de la capacidad de las células para la síntesis de proteínas fibrilares, mediante cultivo primario de placa basal, en este estadio del desarrollo.

Dado que las células permanecen empotradas en la matriz extracelular, se mostrarán sectores de membranas en relación con ella y se describirá su interacción, con énfasis en notables eventos de importancia fisiológica y clínica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Microscopia electrónica de transmisión (MET).** Muestras de decidua tomadas de la superficie materna de placenta humana fueron obtenidas de partos de embarazos clínicamente normales, según las orientaciones dadas en trabajo previo (7).

**Cultivo primario de tejido de placa basal.** Especímenes de la cara materna de la placenta fueron obtenidos después del parto espontáneo a término. Seccionados e introducidos en solución salina de Hanks con antibióticos, lavados en dicha solución y dejados en refrigeración hasta la hora de realizar el cultivo primario, de acuerdo con las técnicas convencionales para cultivos de tejidos (8).

Las células obtenidas se cultivaron en el medio mínimo esencial de Eagle (Sigma, Chem Corp St Louis, EE.UU. para cultivos en monocapas (9) suplementado con el 5% de suero fetal y antibióticos. Cuando se obtuvo una monocapa no confluyente a las 46 horas, las células fueron fijadas *in situ* en el

frasco Falcón, con una solución al 2% de glutaraldehído en "buffer" fosfato 0,1M (pH 7,4) y osmolaridad de 300 mOsm/litro, arrastradas por una espátula con punta de goma, lavadas y centrifugadas en "buffer" similar y pos-fijadas en ácido ósmico al 2% en "buffer" fosfato 0,1 M por 30 minutos a 40°C. Después de deshidratación en una serie graduada de alcohol etílico y óxido de propileno, se les incluyó en Epon 812 (Shell Chemical Corp; Swaren, New Jersey, EE.UU.).

Secciones ultrafinas fueron preparadas con cuchilla de diamante con un ultramicrotomo "Porter Blum" MT-2 (Ivan Sorvall Inc, Norwalk, Connecticut, EE.UU.), coleccionadas sobre rejillas no cubiertas, teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo, examinadas en un microscopio electrónico Hitachi H-500 (Nissei Sangyo Co. Ltd, Tokyo, Japón) a 50kV provisto de una apertura de 50 µm en el objetivo y con un aumento en un rango de 2 000 x a 15 000x.

**Histoquímica ultraestructural con 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 AA 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, procedimiento conocido como método GABOUL, ampliamente descrito en trabajo reciente (6).

## RESULTADOS

Fueron vistas células intersticiales trofoblásticas o deciduales rodeadas por matriz extracelular, aisladas o agrupadas en la placa basal. El análisis de la superficie cercana a las membranas celulares reveló la presencia de un material microfilamentoso externo que se asocia en forma continua con ellas, o bien, microfilamentos de matriz hialoplásmica de las prolongaciones celulares que se observan en continuidad con la matriz intercelular. Ésta contiene pequeñísimos gránulos electrón densos aislados o dentro de vesículas de membranas, otros parecen estar disolviéndose. Restos de las células se notan en ella (Figura 1).

En la periferia de células deciduales se observa un material electrón denso gránulo-filamentoso en estrecha asociación con fibras colágenas. En íntima adhesión con la membrana plasmática decidual una

lámina externa electrón densa se interrumpe para dar salida a prolongaciones citoplásmicas en forma de mazo que contienen cuerpos oscuros limitados por membranas (Figura 2). Ocasionalmente se observan en una célula intersticial trofoblástica, gránulos secretorios intracitoplasmáticos limitados por membranas (Figura 3), cercanos a la superficie celular.

Las células trofoblásticas (Figura 4) en cultivo primario no mostraron el material microfilarmentoso-granular que se observó en las deciduales (Figura 5).

Células-X trofoblásticas, caracterizadas por contener abundantes láminas de RER (retículo endoplásmico rugoso) paralelas, se mostraron reactivas al AA y presentaron extensas prolongaciones de membranas que abrazan regiones de fibrinoide. Éstas fueron vistas como fagocitando material extracelular de fibrinoide (Figura 6).

Entre las cisternas de RER y a nivel subcisternal suele observarse un material alcinofílico similar al visto en la matriz extracelular. Ésta, que permanece fuertemente adherida a la membrana celular, se notó en dos tonalidades electrón densas con regiones claras y oscuras (Figura 7). En otros casos, la matriz se separa de la membrana y deja espacios vacíos. Estos logran, a veces, rodear a toda la célula (Figura 8).

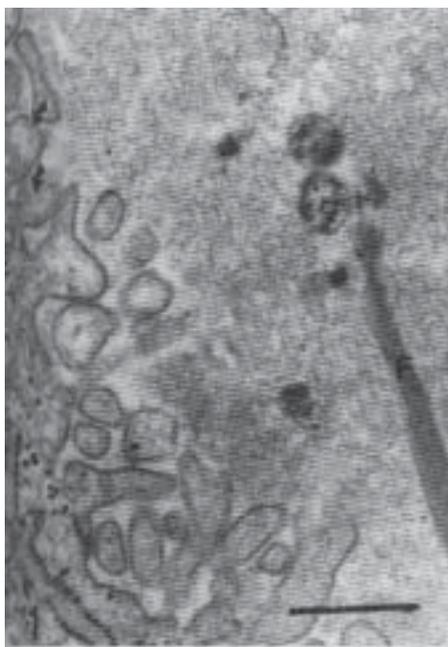


Figura 1. Las flechas indican regiones de microfilamentos de la matriz hialoplásmica en continuidad con los de matriz extracelular. Se observan gránulos densos de diversos tamaños y fibrina (F). Barra: 0.5  $\mu\text{m}$ .



Figura 2. El lado derecho de la micrografía demuestra el fibrinoide tipo matriz con colágeno degenerado. La flecha indica la membrana basal de la célula decidua. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

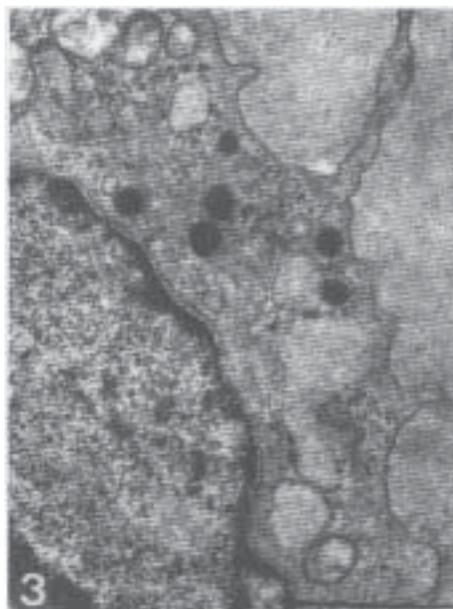


Figura 3. Sector de célula intersticial trofoblástica que contiene gránulos secretorios cercanos a la superficie de la membrana plasmática. Partículas de 60-150 Å en la matriz extracelular (flecha). Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

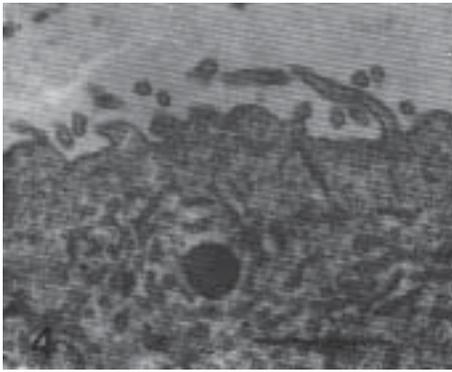


Figura 4. Región de célula trofoblástica en cultivo sin expresión de biosíntesis de material fibrilar. Barra: 1  $\mu$ m.

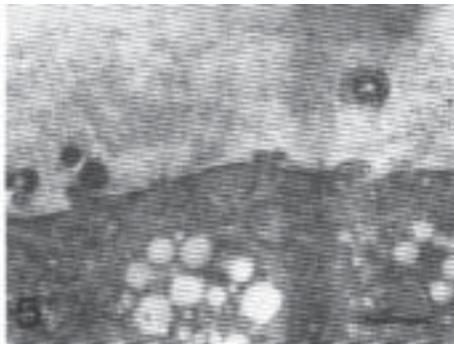


Figura 5. Área de célula decidual con expresión de un material gránulo filamentosos adosado a la superficie celular. Barra: 1  $\mu$ m.



Figura 6. Material microfilamentoso (\*) intracitoplasmático alcianofílico de naturaleza similar al de la matriz extracelular. Prolongaciones citoplásmicas separan regiones de fibrinoide. Barra: 1  $\mu$ m.

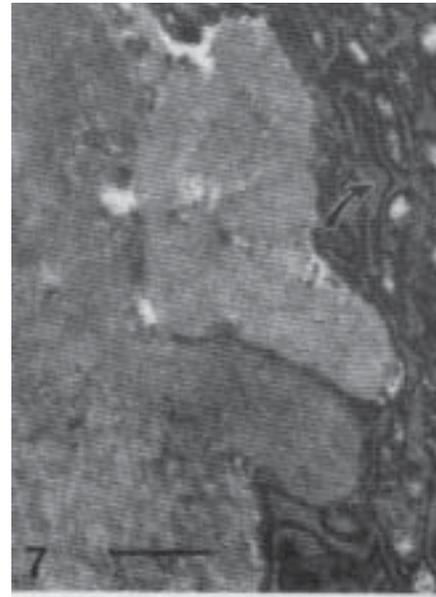


Figura 7. El RER subcisternal (flecha) contiene un material de similar aspecto al de la matriz extracelular. Una región clara de matriz se observa al lado de otra más electrón densa. Barra: 1  $\mu$ m.

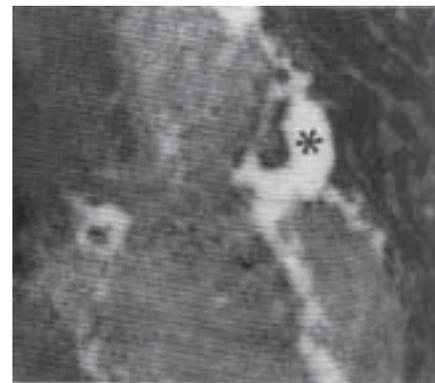


Figura 8. Regiones de separación (\*) de la matriz extracelular o sitios de lisis del fibrinoide tipo matriz con dos regiones electrón densas diferencialmente contrastadas. Barra: 1  $\mu$ m.

## DISCUSIÓN

La matriz aquí estudiada corresponde a un estado coloidal complejo de la materia viva, organizado por una multiplicidad de componentes procedentes,

unos del plasma sanguíneo que incluye agua con proteínas cristaloides, metabolitos, gases y otros, propios de la actividad celular. La placa basal irrigada por vasos, exhibe el fibrinoide clasificado como de Rohr y de Nitabuch. De origen celular, según los resultados aquí obtenidos, permite recibir, almacenar o transportar el producto de la biosíntesis localizada o la derivada de otras células que influyen a distancia.

Las membranas de células trofoblásticas y deciduales permanecen en constante interacción, reciben señales desde la matriz extracelular o descargan productos en ella. Tales eventos son mediados por el citoesqueleto (10). Degeneración y multiplicación celular ocurren simultáneamente en la placa basal al final de su desarrollo, por lo que estas interacciones son la clave en estos eventos.

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 y favorecer los procesos degenerativos (5,11).

En la placa basal, ninguna de las células trofoblásticas se habían observado como en la Figura 3, secretando gránulos de contenido desconocido, el cual, muy probablemente, se descompone en gránulos más pequeños en la matriz intercelular. Esta observación casual probablemente se debe a que fue tomada en el momento en que se recibían señales para la secreción en forma pulsátil (7). Este rasgo 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 (12) con técnicas de inmunocitoquímica. Existe la hipótesis (13) 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 inician las contracciones uterinas durante el trabajo de parto.

Según los resultados obtenidos del medio de cultivo de 46 horas, las células deciduales, a diferencia de las trofoblásticas, son capaces, fuera del mecanismo de control hormonal, de sintetizar parte del componente de la matriz extracelular indicando que poseen un mecanismo en el genoma autónomo de biosíntesis. Sin embargo, las trofoblásticas, en otras condiciones del cultivo, secretan la fibronectina, un componente de la matriz de fibrinoide (14). Korhonen y Virtanem (15) han evidenciado la producción de fibronectina por las células deciduales como respuesta ante la invasión temprana del trofoblasto.

Frank y col. (1) demostraron la estructura y composición del fibrinoide placentario humano con MET e inmunohistoquímica, encontrando dos subtipos: fibrinoide tipo fibrina y fibrinoide tipo matriz. El primero formado por fibrina y fibronectina celular (secuencia ED-A) como un producto sanguíneo fetal o maternal. El segundo por fibronectina oncofetal (secuencia ED-B), colágeno, laminina y tenascina como un producto de la matriz extracelular producido por células trofoblásticas extravelosas. La fibronectina oncofetal se consideró como un marcador específico para este tipo. La similitud del material alcianofílico subcisternal con el de la matriz extracelular hace pensar que estamos en presencia del segundo tipo de fibrinoide. Dado que los componentes de éste, en su mayoría son glicoproteínas reactivas con el AA (6), se notó un contraste de tonalidades explicado 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 la forma no polarizada. El de tipo fibrina no localizado por Frank y col. (1) en placa basal, que tiene un aspecto semejante al observado en la Figura 1, debería ser motivo de atención en las zonas de intensos cambios degenerativos. En éstas el contacto de células trofoblásticas extravelosas, con mallas de fibrina, procedentes desde el espacio interveloso o de vasos que corren por la zona, es un estímulo para su multiplicación (16,18). Posiblemente, al igual que en etapas tempranas (14), las células-X degradan con metaloproteinasas esta matriz. A término, este evento dejaría espacios alrededor de células que, al morir, crean pseudoquistes que al fusionarse facilitarían el desprendimiento placentario.

REFERENCIAS

1. Frank HG, Malekzadeh F, Kertschanska S, Crescimanno C, Castelluci M, Lang I, et al. Immunohistochemistry of two different types of placental fibrinoid. *Acta Anat Basel* 1994;150:55-68.
2. Movat HZ. The concept of fibrinoid. *Am J Med Sci* 1958;236:373-382.
3. 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.
4. Rukosuev VS. Immunofluorescent localization of collagen types I,III,IV,V, fibronectin, laminin, entactin, and heparin sulphate proteoglycan in human immature placenta. *Experientia* 1992;48:285-287.
5. Alexander CM, Werb Z. Extracellular matrix degradation. En: Hay ED, editor. *Cell biology of extracellular matrix*. New York: Plenum Press; 1991.p.255-302.
6. Castejón OC. Demostración histoquímica ultraestructural de carbohidratos en el trofoblasto de la placenta humana con el azul alcian. *Gac Méd Caracas* 1998;106:7-12.
7. Castejón OC. 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.
8. Kruse PF, Patterson MKL. *Tissue culture: methods and application*. London: Academic Press; 1973.
9. Robinson DG, Ehlers U, Herken R, Herrmann B, Mayer F, Schürmann FW. *Methods of preparation for electron microscopy. An introduction for the biomedical sciences*. Berlin: Springer-Verlag; 1987.
10. Burridge 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. Castejón OC. An electron microscopic study of decidual cells of the human placenta at term. *Rev Mic Elect Biol Cel* 1984;1:49-69.
12. Warren WB, Silverman AJ. Cellular localization of corticotrophin releasing hormone in the human placenta, fetal membranes and decidua. *Placenta* 1995;16:147-156.
13. Gómez TG. Endocrinología del embarazo. En: Rodrigo Cifuentes B, editor. *Obstetricia de alto riesgo*. 4ª edición. Cali, Colombia: Aspromédica; 1994.p.49-63.
14. Burrows TD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update* 1996;2:307-321.
15. Korhonen M, Virtanem I. The distribution of laminins and fibronectins is modulated during extravillous trophoblastic cell differentiation and decidual cell response to invasion in the human placenta. *J Histochem Cytochem* 1997;45:569-581.
16. 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.
17. 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.
18. Nelson DM, Swanson PE, Davison BB, Baskin GB, Enders AC. Ontogenetic and phylogenetic evaluation of the presence of fibrin type fibrinoid in the villous haemochorial placenta. *Placenta* 1997;18:605-608.

Agradecimiento

Los autores agradecen a la Licenciada Gladys de Blanco y Técnica Miriam Romero en el Laboratorio cultivos de tejidos del IIV-Ceniat-Maracay y a los Drs. Francisco Gil y José Esparza, ex-investigadores del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por la asistencia técnica y facilidades de laboratorio. Al CDCHT-UC, por financiamiento de equipos y a la Facultad de Ciencias de la Salud por el fondo fijo institucional.

Dirección de la correspondencia: Prof. Olivar Castejón, CIADANA, Fac Cs de la Salud, Universidad de Carabobo, Maracay, Edo. Aragua. Apdo 45944. Telf: (043) 710627; Fax: 710647.