

El proceso de calcificación en la placenta humana

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

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

RESUMEN

Con el propósito de conocer el inicio del proceso de la calcificación placentaria y su evolución fueron analizadas con microscopía electrónica de transmisión, técnica histoquímica de v. Kossa para calcio y microscopía electrónica de barrido muestras de placa basal procedentes de embarazo prolongado. Vesículas de matriz no fueron vistas. Densos agregados de minerales parecen fusionarse y formar gránulos cada vez mayores en la degeneración fibrinoide intracelular del sincitio, en células de placa basal, matriz extracelular, estroma vellositario y barrera placentaria. Glóbulos rojos, fibrina, fibrinoide y colágena son posibles nucleadores de cristales de hidroxapatita. Gránulos que crecen para formar pequeños filamentos, barras y cuerpos tridimensionales irregulares, se asocian unos a otros por aposición para formar depósitos de minerales en cualquier lugar de la placa basal. Vellosidades que se impregnan uniformemente de estos depósitos se fusionan y forman áreas de infartación calcificada. En conclusión, los resultados presentan imágenes del inicio y desarrollo de la calcificación distrófica.

Palabras clave: Calcificación. Placenta humana.

SUMMARY

With the proposal of knowing as starts the placental calcification and their further evolution, samples of basal plate from prolonged pregnancy were analyzed by transmission electron microscopy, v Kossa histochemical stain and scanning electron microscopy. Matrix vesicles were not seen. Dense masses of mineral are observed aggregating to form bigger deposits in fibrinoid degeneration of syncitium, cells of basal plate, extracellular matrix stroma of villi and placental barrier. Red blood cells, fibrin, fibrinoid, and collagen are nucleators of crystalline hydroxiapatite. Granulles which growth form small filaments, platelets and three-dimensional irregular bodies associated ones with others by an apposition process

originating dense masses of minerales anywhere in the basal plate. Villi impregnated with these deposit are aggregated in areas of calcified infarctation. In conclusion, these findings exhibit images starting the dystrophic calcification during the prolonged pregnancy.

Key words: Calcification. Human placenta.

INTRODUCCIÓN

El proceso de calcificación placentaria ha sido estudiado con respecto a los depósitos, los cuales se han interpretado mediante imágenes que corresponden a diferentes metodologías que exhiben análisis de forma, tamaño, ubicación y distribución (1). Este evento parece ser extensivo a toda la placenta (2).

En los numerosos trabajos que sobre calcificación se han presentado no se ha aclarado cómo son las etapas iniciales de depósito del mineral. Asimismo, se ignoran los mecanismos de la calcificación intra o extracelular y si en ellas participan estructuras vesiculares o membranosas (3,4). En otros tejidos (5) como dentina, hueso y cartílago la biología molecular del proceso de biomineralización ha sido explicado, no así en la placenta.

El propósito de este estudio es dar a conocer el inicio y la posterior evolución del proceso de mineralización que ocurre normalmente en la placenta de pos-término. Para ello utilizaremos las técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET); la técnica histoquímica de v. Kossa para calcio y la microscopía electrónica de barrido (MEB).

El desequilibrio en la entrada de calcio en sentido materno-fetal o viceversa puede producir alteración del metabolismo mineral del feto con graves

consecuencias para la salud materno-fetal y el mecanismo de intercambio placentario durante el embarazo. Si nosotros podemos explicar el inicio de la calcificación estaremos en mejores condiciones para interpretar lo que ocurre con este proceso en la placenta diabética, toxémica, en los infartos placentarios, así como sus implicaciones clínicas.

Diversas entidades han sido consideradas en el inicio de la calcificación en otros sistemas distintos a la placenta. La concentración del ion calcio, el pH, proteínas degeneradas, enzimas, presencia de hidroxiapatita, vesículas de matriz extracelular, cristalinidad del mineral depositado, colágena, nucleadores, inhibidores, glucoproteínas, mucopolisacáridos ácidos y proteoglicanos, son factores que de alguna u otra forma participan en el inicio o nucleación de las primeras moléculas de hidroxiapatita que serán transformadas posteriormente en pequeñas agujas que, al reunirse, incrementan el depósito de minerales (5). Basados en esta información esperamos visualizar con técnicas de MET, v. Kossa y MEB cómo se inicia y desarrolla la calcificación en la placenta humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Dos placentas de pos-término fueron obtenidas inmediatamente después de los partos de embarazos clínicamente prolongados determinados ultrasonográficamente. Pequeños especímenes fueron disecados asépticamente de la placa basal, fijados por inmersión en 2% de glutaraldehído en 0,1 M de buffer fosfato (pH 7,2-7,4) durante dos horas a temperatura ambiente, lavados en buffer similar y deshidratados en la serie de alcoholes y de óxido de propileno. Posteriormente, los tejidos fueron incluidos en Epon 812 (Shell Chemical Corp, Swaren, New Jersey, (EE.UU.)). Secciones de una μm de grosor fueron obtenidas para microscopía de luz y teñidas con el azul de toluidina para orientación topográfica. Secciones ultrafinas fueron obtenidas con un ultramicrotomo Porter Blum MT-2 (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, Tokio, Japón).

Microscopía de luz. Técnica de v. Kossa

Las biopsias se tomaron de la región central parabasal, en el plano vertical según las indicaciones dadas en trabajo previo (1). Los tejidos fueron teñidos con hematoxilina-eosina y con la de v. Kossa para calcio.

Microscopía electrónica de barrido

Previamente se buscaron por su color amarillo, conglomerados de vellosidades endurecidas (infartos), con intenso grado de calcificación, con la ayuda de un microscopio estereoscópico Zeiss SV8. Estos semejan pequeñas piedras que se fijaron toda la noche por inmersión en 2% de glutaraldehído en 0,1 M de buffer fosfato, pH 7,4. Después de lavarlos en solución salina se aplicaron los procedimientos convencionales de la MEB y se observó su superficie. Además, regiones de infartos una vez desecados con el desecador de punto crítico, fueron rotas y observadas de nuevo por la superficie de fractura.

RESULTADOS

Las micrografías de MET revelan, en regiones degeneradas del sincitio de vellosidades flotantes o cercanas a la placa basal, la presencia de agregados de minerales de varios tamaños y formas. Espículas o agujas de hidroxiapatita no se observaron aisladas. Suelen reunirse pequeños gránulos donde se entrecruzan para conformar regiones cada vez más grandes. Las vesículas de matriz no se observaron. Algunos cristales parecen formarse directamente en relación con microfilamentos citoplasmáticos derivados del sincitio degenerado (Figura 1).

En células aisladas, trofoblásticas tipo x, precipitados de minerales, a nivel citoplásmico y nuclear se notan con aspecto muy electrón denso (Figura 2). Las vellosidades, en corte transversal demuestran estos agregados de minerales con variabilidad de tamaños en el sincitio, entre las prolongaciones del sincitio (podocitos) y su membrana basal, dispersos en ésta, y en relación con las fibras colágenas que, en el estroma vellositario toman contacto con ella. La imagen de la Figura 3 da una idea de cómo las partículas mineralizadas son de variable tamaño y forma.

CALCIFICACIÓN EN PLACENTA HUMANA

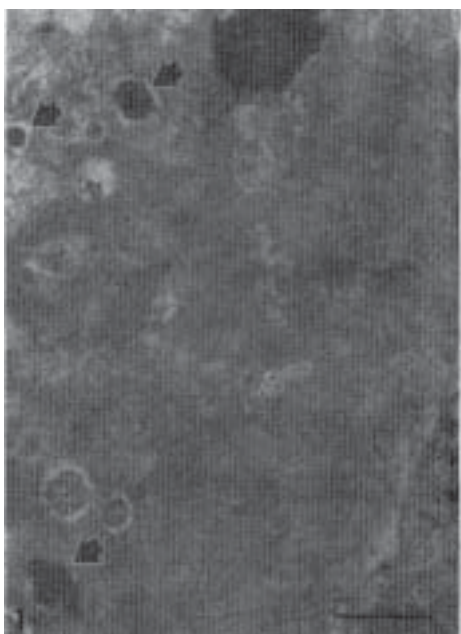


Figura 1. Micrografía de MET del área sincitial donde las flechas indican agrupaciones de cristales cada vez mayores. La flecha curva señala cristales de hidroxipatita en relación a microfilamentos. Barra: 0,5 μm .

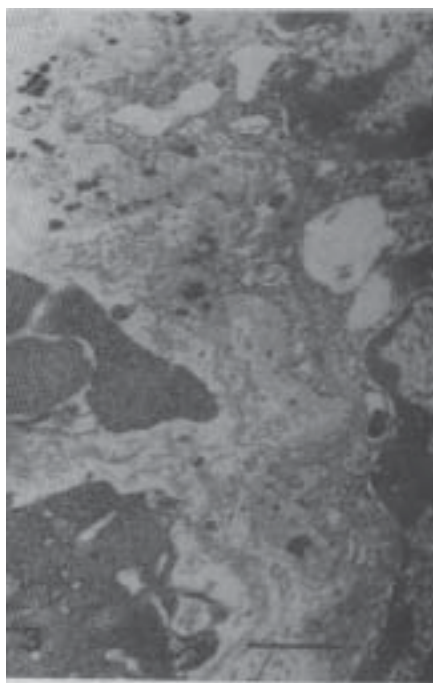


Figura 3. Densos agregados de minerales de variable tamaño y formas se observan en la barrera placentaria. Unos en relación con la colágena de la membrana basal y otros en el interior de ésta. Barra 1 μm .

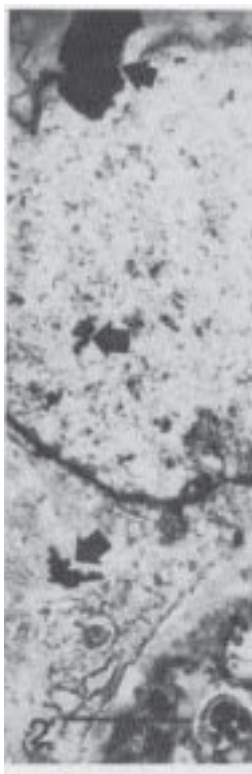


Figura 2. Las flechas señalan densos agregados de minerales a nivel núcleo citoplasmático. Barra: 1 μm .

Con ampliificaciones fotográficas, a nivel de estroma vellositario, área cercana a la pared de un vaso, con la técnica de v. Kossa, podemos detectar el intenso depósito de agregados de minerales en forma de barras, gránulos o filamentos que conforman una intrincada o compleja red en la cual los espacios en blanco observados sugieren que serán llenados a medida que evoluciona el proceso y se adicionan áreas más oscuras o densas (Figura 4).

Los glóbulos rojos observados en la luz de los vasos mostraron una variabilidad en la tonalidad del color desde el amarillo claro, más intenso, marrón, hasta totalmente oscuro o negro. En los acúmulos de estos eritrocitos se observan depósitos irregulares de minerales. Lo que se ha determinado con la técnica de v. Kossa es la presencia de fosfatos o carbonatos, que toman una coloración amarilla, amarilla-marrón para los primeros y negra para los segundos. Estos iones estaban en el tejido unidos al calcio. En la reacción con N03Ag del reactivo, la Ag es reducida, ocupa el lugar donde estaba el Ca y toma un color negro.

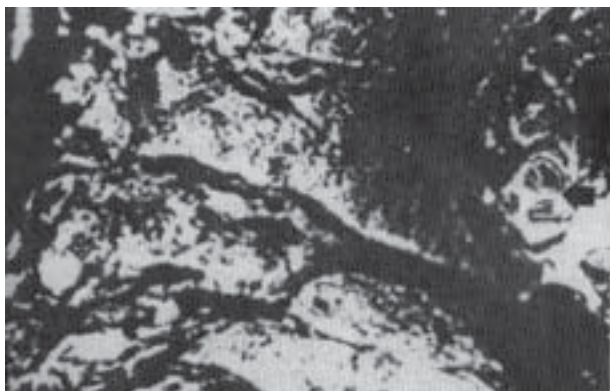


Figura 4. Micrografía de luz, v. Kossa positiva, del área de la pared de un vaso de vellosidad troncal en área de degeneración fibrinoide. A la derecha la flecha indica áreas de eritrocitos con diverso grado de calcificación. 400X.

Cuando se observa una panorámica de placa basal (Figura 5) suelen destacarse puntos oscuros que progresivamente aumentan de tamaño. Vellosidades empotradas en ella, fantasmales, se notan con punteados en el lugar del estroma correspondiente a las fibras colágenas. En algunas, la periferia sincitial ya se ha calcificado. La línea continua que se observa a este nivel es producto de la fusión de los agregados formados en la barrera placentaria vista en la Figura 3. Las de anclaje o flotantes, cerca de la placa basal, están totalmente calcificadas.

En regiones de notable infartación vellosa se notan densas zonas de mineralización que oscurecen el campo (Figura 6) y, en su periferia, todavía pueden verse vellosidades con diverso grado de calcificación. La observación de la superficie de estos infartos, de aspecto rocoso, se exhibe en la Figura 7.

DISCUSIÓN

Nuestra hipótesis en este estudio es que el proceso de biomineralización en la placenta humana pudiera ser iniciado mediante vesículas de matriz en una forma similar a la que ocurre en el hueso, cartílago o dentina (5). Las vesículas de matriz constituyen el foco inicial de la calcificación, formadas por unidades de membranas con un contenido de enzimas como fosfatasa alcalina, ATPasa y agujas o cristales monoclinicos de hidroxiapatita, considerados como centros de nucleación para el depósito de minerales. Ellas son de origen intracelular, formadas en el citosol, con participación mitocondrial, redondas o

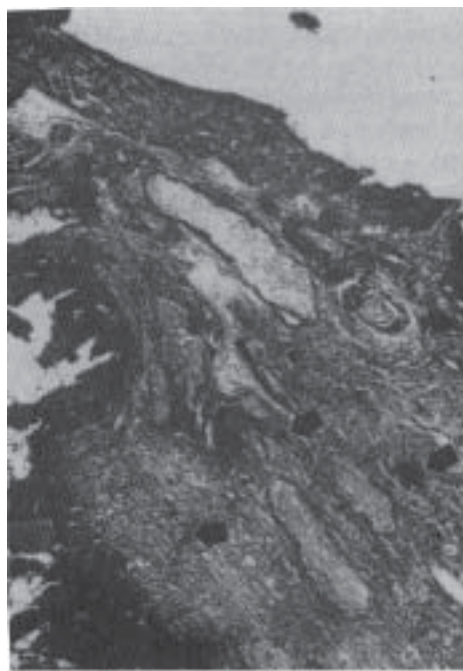


Figura 5. Panorámica de placa basal con regiones de v. Kossa positivas. Vellosidades fantasmales y de anclaje totalmente calcificadas. Las flechas señalan regiones cada vez más grandes de depósitos 100X.

ligeramente alargadas, con diámetro de 250 a 2500 Å. Para su observación en detalle se requieren aumentos del 78 000 a 180 000x con el uso de la MET. Aunque Croley (6) reportó inequívocamente la presencia de calcio en las membranas celulares de la barrera placentaria y en agregados electron densos mitocondriales, sus imágenes tampoco evidenciaron las vesículas de matriz. Es un hecho ya establecido mediante difractogramas de rayos-x que los minerales depositados en el inicio son de hidroxiapatita, fosfato cálcico o carbonatos. Pareciera que el depósito de cristales se realiza directamente sobre alguna estructura intracelular, probablemente microfilamentos citoplasmáticos, glicoproteínas o fibrinoide en etapas de degeneración (calcificación distrófica) de notable visualización en la placenta humana a término (7). O bien, que en este órgano como ocurre en otros sistemas de calcificación, la nucleación se realice sin participación de la membrana de la vesícula de matriz. No es descartable que los procedimientos aquí empleados hayan disuelto esta membrana.



Figura 6. Región de infarto calcificado. La región de la flecha curva corresponde con lo observado en la Figura 7. 100X.



Figura 7. Micrografía de MEB de regiones de la superficie de vellosidades íntimamente fusionadas y petrificadas.

La deposición de cristales también puede realizarse extracelularmente (8) en relación con fibrinoide o fibras de colágeno, que son localizadas en el estroma vellositario, en el conjuntivo de la placa basal y la capa media de los vasos de vellosidades troncales. Además, la superficie de los glóbulos rojos en la luz de los vasos, por contener espectrin fosforiladas que se unen al calcio, se convierten, al empaquetarse los eritrocitos, en posibles sitios de nucleación de cristales de

hidroxiapatita. Como lo expresan las imágenes aquí demostradas hay una primera fase durante el proceso en el cual se expresan pequeños gránulos, formados muy probablemente por entrecruzamiento de cristales separados de su solución, producto de grupos reactivos en interacción con una serie de factores, arriba enunciados, en un lugar conocido como sitio de nucleación. Estos se reparten en la placenta en una diversidad de áreas que han sido muy bien descritas como superficie de sincitio, citoplasma sincitial, citotrofoblasto, membrana basal del trofoblasto, estroma vellositario y placa basal. Una segunda fase corresponde a la multiplicación en esa diversidad de zonas de los sitios de nucleación. Estos, muchos más pequeños se agregan a medida que se incrementa el depósito de minerales en el tiempo y forman gránulos mayores, filamentos, barras placas o concreciones reportados por diferentes métodos. Estos eventos a nivel microscópico también ocurren a nivel macroscópico desde los conocidos estudios de Grannum y col. hasta el más reciente por Hamilton (9).

Si este proceso ocurre en numerosas vellosidades flotantes como hemos descrito (1), se conforman conglomerados fuertemente petrificados, que toman un color amarillo y son quebradizos al ser desecados. Estas regiones conocidas como infartos calcificados, al ser observados con MEB, se notan con el aspecto de una superficie rocosa en la cual son vistas microvellosidades degeneradas y restos del estroma fibroso todavía. La fractura de estas zonas origina el mismo aspecto, lo que indica uniforme impregnación de minerales que mantiene la integridad de la vellosidad y no como pudiera interpretarse que la intensa calcificación lleva a una superposición de láminas de calcita como ocurre en la naturaleza. Lo más probable es que en las imágenes observadas también se encuentren otros minerales o elementos como Mg, Fe, Pb, Cd y no sólo Ca. Esto, con el uso de la técnica de EDX, con microanalizador computarizado, aclara el problema y motiva investigaciones futuras.

Se ha confirmado en la placenta a término que estructuras vesiculares y membranosas, que contienen Ca u otros cationes, han sido demostradas dentro del citosol de la placenta mediante técnicas histoquímicas que se sugieren como un medio de transporte en la barrera placentaria (3,4). De aquí la razón de la hipótesis planteada. Repitiendo las observaciones en material procedente de abortos del segundo trimestre es posible encontrar resultados

diferentes. Falta mucho por aprender del proceso de biomineralización de la placenta humana y se requieren estudios más detallados con MET de alta resolución para elucidar el problema de la nucleación.

La calcificación simultánea con el proceso de infartación vellosa agrava mucho más las posibilidades del intercambio materno-fetal de nutrientes.

Muerte, subnutrición, retardo del crecimiento fetal, sub-óptima ganancia de peso de la embarazada y separación placentaria prematura, pueden ser las consecuencias derivadas de estos eventos simultáneos cuando un 25% o más de la placenta está afectada. Por otro lado, los procesos aquí observados ayudan a comprender lo que a nivel macroscópico ocurre durante la evolución de las calcificaciones placentarias (10) durante todo el embarazo, cuya correlación con la edad de gestación y madurez fetal es de notable importancia clínica para predecir retardo del crecimiento intrauterino (9,11).

REFERENCIAS

1. Castejón OC, Morett de Castejón V, Mijares de Méndez M. Morfología de las calcificaciones placentarias: un estudio con el microscopio electrónico. *Rev Obstet Ginecol Venez* 1990;50:92-97.
2. Benirschke K, Petarske SI. Placental pathology casebook extensive calcification of the umbilical cord and placenta. *J Perinatol* 1995;15:81-83.
3. Whitsett JA, Tsang RC. Calcium uptake and binding by membrane fractions of human placenta: ATP-dependent calcium accumulation. *Pediatric-Res* 1980;14:769-775.
4. Kamath SG, Smith CH. $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ exchange, Ca^{2+} binding, and electrogenic Ca^{2+} transport in plasma membranes of human placental syncytiotrophoblast. *Pediatric Res* 1994;36:461-467.
5. Scheweiger HG. *International cell biology 1980-1981. Second International Congress on Cell Biology Berlin*: Springer-Verlag; 1981.p.949-1003.
6. Croley TE. The intracellular localization of calcium within the mature human placental barrier. *Am J Obstet Gynecol* 1973;117:926-932.
7. Emmrich P. Pathology of the placenta X. Syncytial proliferation, calcification, cysts, pigments and metabolic disorders. *Zentralb Pathol* 1992;138:77-84.
8. Weiner S. Organization of extracellular mineralized tissues: A comparative study of biological crystal growth. *Crit Rev Biochem* 1986;20:365-208.
9. Hamilton J. Graduo placentaria simplificada. *Rev Brasil Ginecol Obstet* 1996;18:37-43.
10. Sherer DM, Allen TA, Metlay LA, Abromowicz JS. Linear calcification in placental infarct causing complete distal sonographic shadowing. *J Clin Ultrasound* 1994;22:212-213.
11. Cunningham FG, MacDonald PC, Leveno KJ, Gant NF, Gilstrap LC. *Williams Obstetrics 19ª edición*. Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange; 1993.p.744.

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 MET del IIO, Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas.

Dirección de la correspondencia: Prof. Olivar C Castejón, CIADANA, Facultad Ciencias de la Salud, UC; Apdo. 4944, Núcleo Aragua, Maracay. Tlfs: 710627. Fax: 710647.