

## Demostración histoquímica ultraestructural de carbohidratos en el trofoblasto de la placenta humana con el azul alcian

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

Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Hospital "Ángel Larralde" y Hospital "Carabaño Tosta".

### RESUMEN

*Para evaluar la potencialidad tintorial del azul alcian en el estudio electronohistoquímico de compuestos polianiónicos en el trofoblasto placentario, fueron obtenidas muestras de vellosidades inmediatamente después del parto y fijadas por inmersión en glutaraldehído. Especímenes fueron cortados en un seccionador de tejidos "Sorvall TC-2" en secciones de 30 µm, previamente incluidos en agar al 8%. Los cortes fueron teñidos con azul alcian 8GX al 1% en solución de ácido acético al 3% (pH=2,5) y procesados según los procedimientos convencionales para microscopia electrónica. Este método tiñe las membranas del sincitiotrofoblasto, la cubierta celular, matriz hialoplásmica, vesículas cubiertas, microfilamentos citoplasmáticos, gránulos secretorios y lisosomas.*

*Un material electrón opaco es observado dentro de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso. El citotrofoblasto demostró una reacción al azul alcian más marcada que el sincitio, lo que sugiere una mayor participación en la síntesis de carbohidratos. Tales hallazgos sugieren que el material teñido corresponde a un polianión que puede corresponder a un polisacárido ácido o a una glucoproteína implicada en el metabolismo del trofoblasto.*

*Palabras clave: Ultrahistoquímica. Carbohidratos. Trofoblasto. Placenta humana.*

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

\*\* Médico residente del Departamento Gineco-Obstetra del Hospital "Ángel Larralde", IVSS. Valencia, Edo. Carabobo.

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

### SUMMARY

*To evaluate the tinctorial potentiality of the alcian blue in the study of polyanionic compounds in placental trophoblast, villi were obtained immediately after delivery and fixed by immersion in glutaraldehyde. Specimens were cut with a "Sorvall TC-2" tissue sectioner in sections of 30 µm previously embedded in 8% agar. The sections were stained with 1% alcian blue dissolved in 3% acetic acid (pH=2.5) and processed according with conventional methods for electron microscopy. This method stains the membranes of trophoblast and the cellular coat, hyaloplasmic matrix, coated vesicles, cytoplasmic microfilaments, secretory granules and lysosomes. An electron dense material was observed into cisterns of endoplasmic rugose reticulum. The cytotrophoblast showed a reaction more marked than sincitio which suggest a higher involvement in carbohydrates synthesis. These findings suggest that the stained material correspond with a polyanion which is a glycosaminoglycan or a glycoprotein involved in trophoblast metabolism. The possible polyanion role is discussed.*

*Key words: Ultrahistochemistry. Carbohydrates, Trophoblast. Human placenta.*

### INTRODUCCIÓN

Mediante métodos histoquímicos con microscopia de luz (ML), microscopia electrónica (ME) e inmunocitoquímica ultraestructural, se han podido demostrar polisacáridos en la placenta humana. Esta investigación previa sobre carbohidratos en la placenta y su posible función permanece escasa e inconclusa. Ellos se localizan en la llamada cubierta celular, la cual está asociada a la membrana formando una estructura muy compleja de soporte o protectora que se organiza en el espacio extracelular.

Estructuran la membrana plasmática, matriz hialoplásmica, se asocian al citoesqueleto y ribosomas, y se observan en el interior de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso (RER) y en el complejo de Golgi. En los estudios de placenta humana a término no se ha reportado el uso del azul alción (AA) como técnica de histoquímica a nivel ultraestructural para teñir los carbohidratos que componen la estructura del trofoblasto o como productos de su metabolismo. El AA es un colorante básico, policatiónico, formado por una ptalocianina de cobre (1) con dos a cuatro grupos isotiourónicos por molécula, que permite la visualización de polianiones presentes en la estructura celular. En 1948, Haddock (2) lo utilizó, por primera vez, como colorante textil. Dos años después fue introducido al campo de la histoquímica como colorante selectivo para mucinas por Steedman (3). Tice y Barrnett (4) en 1962 lo reportaron como colorante para ME. La escasa información sobre carbohidratos, al final del embarazo, nos motiva a realizar un estudio de interés para el conocimiento de la participación de estos compuestos en los mecanismos de transferencia, protección inmunológica y secreción endocrina placentaria, actividades esenciales en el metabolismo placentario para mantener el embarazo y desarrollo embriológico normal.

Con estas ideas nos proponemos evaluar las propiedades de tinción del AA en el trofoblasto a término, describir la distribución del material teñido y discutir su significación fisiológica.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Especímenes de tejido placentario humano del área cercana a la placa basal, fueron obtenidos inmediatamente después del parto vaginal normal y se tomaron múltiples muestras de la región central y periférica de dicha zona. Los segmentos de tejidos fueron brevemente lavados en buffer fosfato 0,1M (pH= 6,8) y fijados por inmersión en glutaraldehído al 2% por 24 horas a 4°C. Posteriormente se lavaron de nuevo en el buffer y se colocaron en el disco de polietileno de un seccionador de tejidos "Sorvall TC-2" (Ivan Sorvall Inc; Norwalk, Connecticut, EE.UU.) sobre un papel de filtro en el cual tiras de agar al 8% fueron colocadas para incluir los especímenes y ser cortados. Secciones de 30 µm de espesor se recogen en el buffer y se colocan en una solución de azul alción 8GX (1,4) (CI. N° 74240, Allied Chemical, EE.UU.) al 1% en solución de

ácido acético al 3% (pH=2,5) durante 15 horas. Las secciones de tejidos son colocadas en bolsitas de papel para ser teñidas y evitar su dispersión en la solución colorante. Una vez teñidas se lavan y se deshidratan en una serie creciente de alcohol etílico y óxido de propileno. Posteriormente fueron incluidas en araldita 502. Secciones de 1 µm fueron teñidas con azul de toluidina para orientación e identificación correspondiente. Secciones ultrafinas cortadas con cuchilla de diamante en un ultramicrotomo "Porter Blum" MT-2 (Ivan Sorvall Inc; Norwalk, Connecticut, EE.UU.) fueron coleccionadas sobre rejillas no cubiertas y teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Este conjunto de procedimientos en el cual el material se fija en glutaraldehído, posteriormente teñido en azul alción, posfijado en solución de tetraóxido de osmio y doblemente teñido con acetato de uranilo y citrato de plomo ha sido denominado método GABOUL (5). Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico "Hitachi-H500" (Nissei Sangyo Co. Ltd, Tokyo, Japón) a 80 kv, provisto de una apertura de 50 micrones en el objetivo y con un aumento en un rango de 2 000X a 80 000X. Las micrografías electrónicas fueron ampliadas en un rango de 3X a 6X. Los controles consistieron en secciones fijadas en glutaraldehído y solución de tetraóxido de osmio, sin tinción con azul alción.

#### RESULTADOS

En el análisis general de los cortes gruesos se observó que la periferia de las secciones estaban bien teñidas mientras que su región central era incolora.

Vellosidades placentarias que estaban en la periferia de las secciones fueron comparadas con las vellosidades del control, según se indicó en materiales y métodos. En general, hubo una moderada preservación de las estructuras subcelulares.

#### Sincitiotrofoblasto

Una línea punteada irregularmente, electrón opaca, se observó en la superficie de la membrana del sincitio que mira hacia el espacio intervelloso y hacia la membrana basal.

Microfilamentos y gránulos irregulares electrón opacos, parecen formar una compleja red sobre la microvellosidad de dicha superficie (Figura 1). También suelen observarse microfilamentos teñidos

sobre y bajo la superficie de la membrana. La formación de vesículas suele observarse y en ellas las masas irregulares teñidas por el azul alcian permanecen adheridas a su superficie (Figura 1). Vesículas cubiertas fueron observadas bajo la superficie libre de la membrana sincitial (Figura 2) y cerca de la membrana basal del sincitiotrofoblasto. La matriz hialoplásmica mostró gránulos y masas alcianofílicas de irregular forma y tamaño, dispersas a través de ella. Numerosos microfilamentos fuertemente teñidos cruzan esta matriz sin una orientación definida entre las diversas organelas. Pequeños gránulos secretorios (Figura 2) dan positiva la reacción con el AA a nivel de sus membranas. Vacuolas dilatadas pertenecientes al RER presentaron una línea punteada de material AA

positivo en sus membranas, donde cada uno de los gránulos oscuros corresponde a los ribosomas asociados (Figura 1). Numerosos ribosomas libres son teñidos a través de la matriz hialoplásmica. Un notable rasgo fue la presencia de un contenido electrón opaco, positivo al AA y de aspecto reticulado dentro de las cisternas de RER (Figura 3). En algunas ocasiones se observó un espacio de baja electrón opacidad entre la membrana del trofoblasto sincitial y la membrana del trofoblasto celular, evidencia de la existencia de edema (Figura 4). Regiones de material alcianofílico denso suelen verse a nivel de los desmosomas ubicados entre el sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto, así como también en los desmosomas remanentes intracitoplasmáticos en el citoplasma del sincitio (Figura 5).



Figura 1. Un material alcianofílico se observa a nivel de la membrana sincitial. La flecha indica el origen de una vesícula cubierta. Ribosomas del RER se observan teñidos (flecha curva). Barra 0,25  $\mu\text{m}$ .

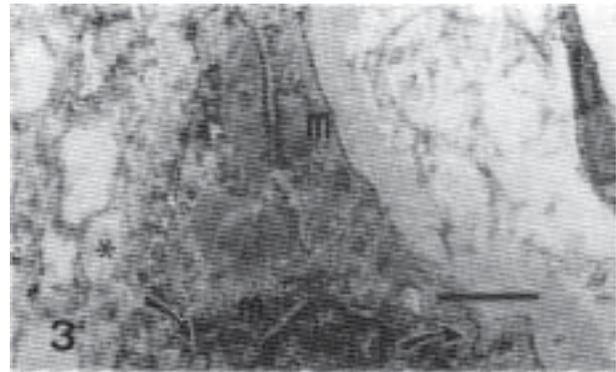


Figura 3. El asterisco indica un material alcianofílico subcisterna en el RER del sincitio. Las flechas señalan vesículas cubiertas y la M regiones de mitocondrias. Barra 0,5  $\mu\text{m}$ .

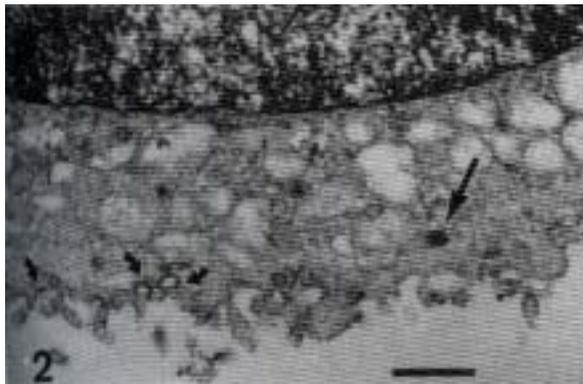


Figura 2. Un proceso de micropinocitosis mediado por vesículas cubiertas se indica mediante flechas pequeñas. La flecha grande indica un gránulo secretorio alcianofílico. Barra 0,5  $\mu\text{m}$ .

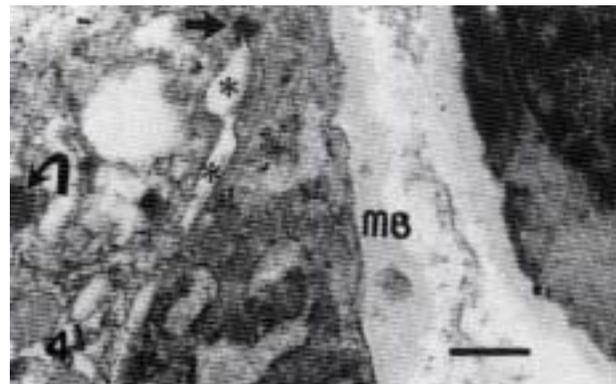


Figura 4. Los asteriscos señalan un espacio claro entre las membranas celular y sincitial del trofoblasto. La flecha indica desmosomas. Un lisosoma en el sincitio (flecha curva) y la membrana basal (MB) no reactiva. Barra 0,5  $\mu\text{m}$ .

Cuerpos electrón densos que semejan lisosomas, fueron vistos con un contenido fuertemente teñido.

La membrana basal se muestra negativa al AA: se observa como una banda uniforme y homogénea, excepto en aquellos sitios donde prolongaciones alargadas del citoplasma del sincitio o celular del trofoblasto suelen verse cortadas transversalmente, incluidas en dicha membrana (Figura 4).

Las mitocondrias y el complejo de Golgi fueron de difícil observación debido a problemas de preservación causados posiblemente por la acidez del colorante.

### Citotrofoblasto

Al igual que en el sincitio, fue observada una línea punteada en el lugar correspondiente a la membrana celular (Figura 3). Se observan vesículas cubiertas que se originan en la superficie de la membrana que mira hacia el sincitio y hacia la superficie basal. La matriz hialoplasmática se mostró mucho más opaca comparada con la del sincitio y la del control (Figura 3). Numerosos ribosomas son fuertemente teñidos con el AA y muchos de ellos están libres en el citosol. Cisternas de RER son vistas con un contenido interior electrón opaco. Las mitocondrias son fácilmente observables con una matriz muy densa dividida en regiones alternas, claras y oscuras (Figura 3). Microfilamentos citoplasmáticos alcianofílicos que cruzan la matriz en diversas direcciones le dan un aspecto oscuro al citoplasma. Gránulos secretorios también son teñidos con el AA. Así mismo, cuerpos semejantes a lisosomas presentaron una matriz electrón densa. Prolongaciones protoplasmáticas de estas células suelen introducirse en la membrana basal y los cortes transversales permiten observar los gránulos AA positivos adosados a sus membranas.

El núcleo, en algunos casos, mostró dilatación de la cisterna perinuclear, como a manera de un edema subcelular. En general, el trofoblasto celular presentó las mismas características de tinción observadas para el sincitio, pero su citoplasma fue mucho más reactivo al AA (Figura 5).

### Membrana vásculo-sincitial

En las regiones vásculo-sincitiales, el endotelio presentó vesículas de micropinocitosis tanto en la superficie luminal como basal teñidas con el AA (Figura 6).

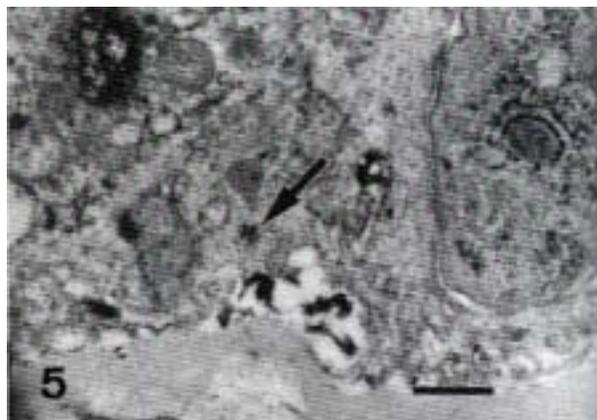


Figura 5. Se muestra desmosoma remanente intracitoplasmático (flecha). A la derecha, una región de trofoblasto celular más reactiva que la del sincitio. Barra 0,5 µm.



Figura 6. Parte del sincitio y su MB en la región superior derecha. La célula endotelial exhibe vesículas cubiertas en ambas caras y en tránsito (flechas). Barra: 1 µm.

### DISCUSIÓN

El método GABOUL (5) empleado ha permitido la visualización de carbohidratos integrados a la estructura molecular de la membrana plasmática del trofoblasto, dispersos en la matriz hialoplasmática o asociados a estructuras subcelulares en forma de pequeñas masas amorfas osmiofílicas correspondientes al producto de la reacción entre el AA y el carbohidrato precipitado, deshidratado y fijado. El mecanismo de tinción del AA, sus propiedades histoquímicas, factores que regulan la reacción, su selectividad para determinados polianiones localizados en las células, penetración y la fijación más adecuada han sido ampliamente descritos en

numerosos trabajos aplicados al sistema nervioso central mencionados en la referencia N° 5. Este es el primer estudio con ultraestructura que evidencia carbohidratos en la placenta humana con el uso del AA. La reacción, similar a la del hierro coloidal, resulta en una mejor preservación de la ultraestructura y nos permitiría, si ajustamos las condiciones de pH, diferenciar carbohidratos complejos ácidos sulfatados de los no sulfatados, y es así el AA mucho más específico cuando es comparado con el hierro coloidal. De hecho, esta técnica al ser controlada a pH 2,5 sólo tiñe polianiones carboxilados o fosfatados. Spicer y col. (6) en 1979, caracterizaron una glucoproteína rica en manosa asociada al ácido hialurónico en la membrana del sincitiotrofoblasto. Posiblemente, el AA reaccionó con este complejo macromolecular el cual pudiera corresponder a la inmunoglobulina G (IgG) puesto que ésta, por presentar dos residuos de ácido siálico en los extremos de las dos cadenas de oligosacáridos, expone grupos carboxilos para la reacción con el AA. Ha sido bien establecido con técnicas de ME e inmunocitoquímica que la IgG es tomada por receptores de membrana, incorporada a la célula con participación del citoesqueleto, llevada mediante vesículas cubiertas, las cuales se fusionan con la membrana en la región basal del trofoblasto y descargan por exocitosis la IgG en la membrana basal. Desde aquí, por difusión, hacia la membrana basal del endotelio en el estroma vellositario (7). Esta misma ruta de la IgG ha sido comprobada con la peroxidasa de rábano (8). Los ácidos siálico y hialurónico enmascaran los antígenos del trofoblasto y lo protegen de una reacción inmunológica materna. Estos carbohidratos teñidos por el AA, cumplen así una función inmunoprotectora.

La no observación de una capa de glicocálix continua y uniforme sobre la superficie puede haber sido producto de un efecto de extracción, debido a los continuos lavados en buffer o porque la producción de carbohidratos superficiales es escasa a término. De interés para la investigación sería la aplicación de AA en las etapas tempranas del embarazo. Los carbohidratos teñidos son productos del metabolismo del trofoblasto, pertenecen a su estructura o son captados desde el espacio intervelloso. Muchos de estos son carbohidratos complejos o glucoproteínas sintetizados en el citotrofoblasto. Las glucoproteínas específicas del embarazo, algunas sintetizadas en el citotrofoblasto del grupo de las inmunoglobulinas, son más de treinta y, de acuerdo a la variabilidad del dominio

del carboxilo terminal (COOH), unas permanecen en el interior del citoplasma y otras se secretan (9). Es un hecho establecido que el citotrofoblasto tiene una mayor participación que el sincitio en la síntesis de glucoproteínas. Esto explica por qué se notó mucho más alcianofílico. La importancia clínica de estas glucoproteínas se infiere de los elevados niveles encontrados en el plasma de pacientes con cáncer endometrial o cervical como ocurre con la glicoproteína PP-4 considerada como marcador tumoral (10).

Una molécula que también pudo haber reaccionado con el AA es la transferrina, B1-globulina, una glucoproteína plasmática que al asociarse a su receptor en la membrana sincitial regula la captación de hierro (Fe) (11). La expresión de un elevado número de receptores con elevada afinidad por transferrina saturada de Fe explicaría el eficiente transporte del Fe en sentido materno fetal (12). Estos complejos macromoleculares son incorporados a la célula mediante depresiones y vesículas cubiertas con una proteína periférica de membrana llamada clatrina.

El material subcisternal del RER observado en el trofoblasto puede ser la expresión de la hormona glicoproteica hCG. Esta regula la diferenciación de citotrofoblasto en sincitio y participa en el crecimiento placentario (13).

Las diversas posibilidades de reacción del AA a diversos carbohidratos nos indica la limitación del método empleado, el cual no pretende ser específico para determinado compuesto. En este estudio preliminar se comprobó la capacidad del AA para teñir diversos polianiones presumiblemente carbohidratos complejos ácidos no sulfatados, glicoproteínas o proteoglicanos en la vellosidad placentaria tanto intra como extracelularmente. Si queremos ser más selectivos con el método es necesario verificar si en el tejido realmente existe una reacción del AA con el polianión; bloqueando el producto de la reacción mediante digestión enzimática u otro tratamiento bioquímico, objeto de futura investigación. De acuerdo con los resultados obtenidos, una parte del material teñido tendría su origen en el RER. Posiblemente desde allí, mediante vesículas cubiertas, se traslada a la membrana plasmática para fusionarse con ella y formar parte de la superficie externa del sincitio. Aquí habrá de permanecer soportando los fuertes choques con la entrada y salida de sangre en el espacio intervelloso durante las contracciones uterinas al final del parto, para cumplir un papel lubricante y protector. Además, estos carbohidratos

pueden retener potasio, calcio y Fe cerca de la membrana plasmática para después ser bombeados hacia el espacio intracelular, así como transportar selectivamente a proteínas tomadas por pinocitosis y regular el paso de moléculas como filtros muy activos. El trofoblasto es capaz de mantener, durante el embarazo, un intercambio neto de agua en dirección fetal a pesar de que la presión hidrostática en los capilares fetales es mayor que la existente en el espacio intervelloso. La capacidad de los glucoaminoglucanos en fijar el agua a nivel del conjuntivo de la vellosidad, explica este evento. La importancia clínica de estos estudios radica en que cualquier falla en el metabolismo de estos carbohidratos origina serios trastornos al desarrollo placentario con consecuencias sobre la salud materno-fetal. Así, por ejemplo, la caracterización de la hCG en el coriocarcinoma revela ausencia de ácido siálico o valores muy bajos (14); la detección bioquímica de esta alteración es útil en el diagnóstico precoz. Además, para asegurar el embarazo, glicoproteínas como las integrinas, funcionan como receptores en las membranas del trofoblasto que interactúan, durante la implantación, con proteínas de la decidua para permitir su migración e invasión (15).

#### REFERENCIAS

1. Lewis PR, Knight DP. General cytochemical methods. En: Lewis PR, Knight DP, editores. Staining methods for sectioned material. 6ª edición. The Netherlands: North-Holland Publishing Co.; 1990.p.77-135.
2. Haddock NH. Alcian blue, a new phthalocyanin dye-stuff. *Research* 1948;1:685-689.
3. Steedman HF. Alcian blue 8GS: A new stain for mucin. *Quart J Microscop Sci* 1950;91:477-479.
4. Tice LW, Barnett RJ. Alcian blue staining for electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1962;10:688-689.
5. Castejón OJ, Castejón HV. Scanning electron microscope, freeze etching and glycosaminoglycan cytochemical studies of the cerebellar climbing fiber system. *Scanning Microsc* 1988;2:2181-2193.
6. Spicer SS, Sannes PL, Katsuyama T. Cytochemical characterization of secretory and cell surface glycoconjugates by light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1979;27:1182-1184.
7. Leach L, Eaton BM, Firth JA, Contractor SF. Immunocytochemical and labelled tracer approaches to uptake

and intracellular routing of immunoglobulin-G (IgG) in the human placenta. *Histochem J* 1991;23:444-449.

8. Leach L, Eaton BM, Firth JA, Contractor SF. Uptake and intracellular routing of peroxidase conjugated immunoglobulin-G by the perfused human placenta. *Cell Tissue Res* 1990;261:383-388.
9. Chen H, Chan WY, Chen CL, Mansfield BC, Chou JY. The carboxyl-terminal domain of the human pregnancy-specific glycoprotein specifies intracellular retention and stability. *J Biol Chem* 1993;268:22067-22075.
10. Gocz PM, Szabo DG, Than GN, Csaba IF, Keller G, Vahrson H, Bohn H. Initial experience with placental protein 4 (PP-4) as tumor marker in cervical and endometrial cancer. *Strahlenther Onkol* 1991;167:538-544.
11. Starreveld JS, Abdoel AM, van-Dijk JP, Kroos MJ, van-Eijk HG. The effect of different iron compounds on transferrin receptor expression in term human cytotrophoblast cells. *Biol Trace Elem Res* 1992;35:55-63.
12. Kennedy ML, Douglas GC, King BF. Expression of transferrin receptors during differentiation of human placental trophoblast cells in vitro. *Placenta* 1992;13:43-53.
13. Shi QJ, Lei ZM, Rao CV, Lin J. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 1993;132:1387-1395.
14. Mochizuki M, Maruo T. Biology of trophoblast and its endocrinological profiles. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 1992;68:724-735.
15. Burrows JD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update* 1996;2:307-321.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen a los Drs. Orlando Castejón y Haydeé de Castejón por facilitar los ensayos preliminares en el Laboratorio de Citoquímica e Histoquímica del Instituto de Investigaciones Biológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia. A la Maternidad Castillo Plaza de Maracaibo, por la obtención de muestras; al CODECIHT-UC por financiamiento de equipos de microscopía electrónica y a la Sra. Keyla Aguilar por mecanografiar el manuscrito.

Dirección de la correspondencia: CIADANA. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Maracay, Edo. Aragua. Apdo. 4944. Tlf.: (043) 710627; 710647.