

UNIONES INTERCELULARES EN MUCOSAS HUMANAS
Estudio al microscopio electrónico

- **Dr. Mario Luzardo-Baptista.**
- **Dr. Jorge García Tamayo.**

Laboratorio de Microscopía Electrónica.
Servicio de Patología.
Hospital General del Sur.
Maracaibo, Venezuela.

INTRODUCCION

La relación célula-célula en tejidos como el epitelial se logra gracias a sustancias cementantes a nivel del espacio intersticial, y a especialidades de la membrana citoplasmática, que actúan al igual que broches, contribuyendo a mantener la unión intercelular.

En epitelios planos simples se han descrito tres tipos de uniones: la zónula ocludens, la zónula adherens y la mácula adherens. En epitelios planos estratificados, tales como la mucosa bucal y exocervical, predomina la mácula adherens o desmosoma. Estas uniones presentan variaciones en su extensión y en su localización con respecto a los ejes de las células en los distintos tejidos, las cuales guardan relación con funciones distintas a la simple unión intercelular, tales como el sellado al paso de sustancias o la transmisión de impulsos.

Por lo importante que es el estado normal de las uniones intercelulares, presentamos la descripción ultraestructural de ellas en algunos tejidos normales y patológicos en los cuales estas estructuras no han sufrido alteraciones. Con esta base morfológica se podrán reconocer las lesiones que se presentan en entidades patológicas cuya principal lesión es el daño de la relación célula-célula, y deducir las alteraciones en la fisiología de los elementos que constituyen las uniones intercelulares.

MATERIAL Y METODO

Se utilizaron para este estudio la mucosa de la cavidad bucal y la del exocérnix humano en condiciones normales; en

gingivitis; y en casos de displasia y carcinoma epidermoide bien diferenciado del cuello uterino.

Las biopsias se fijaron indistintamente en glutaraldehído al 3%, o en cacodilato al 4% en solución reguladora de fosfato de sodio a pH 7,4. Se practicó fijación secundaria en tetraóxido de osmio al 2,5%, pH 7,4. El material se deshidrató en acetona y se incluyó en araldita. Los cortes finos se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se estudiaron al microscopio electrónico.

RESULTADOS

Zónula occludens.

Los ejemplos que corresponden a la descripción clásica de este tipo de unión los vimos en casos de carcinoma epidermoide bien diferenciado de cuello uterino, displasia severa y gingivitis grave. Las dos unidades de membrana, de las dos células implicadas en la unión, se aproximan hasta ocluir el espacio intersticial, fusionándose las dos hojas externas de las unidades de membrana en una sola, en extensiones que pueden alcanzar varias micras (Fig. 10). No se observaron cambios en el citoplasma vecino (Figs. 1 y 2), aunque sí observamos cambios en el grosor de las membranas que constituyen esta unión alcanzando hasta 90 Å de promedio el espesor de sus hojas (Fig. 3).

Zónula adherens.

En algunos casos de gingivitis marginal y en displasia del cuello uterino, se encuentran las células epiteliales unidas por estas formaciones. Consisten en condensaciones del citoplasma aplicadas a la hoja interna de la unidad de membrana y finas tonofibrillas que convergen sobre ellas, en manojos de espesor variable (Fig. 11). La distancia intercelular es de 200 Å, y a este nivel el espacio intersticial es de mediana densidad electrónica (Figs. 4 y 5).

Mácula adherens.

Las células epiteliales del exocérnix y de la endocérnix se encontraban separadas por un espacio intersticial amplio, el cual en



Fig. 1. Microfotografía electrónica a mayor aumento de uniones intercelulares. Un desmosoma cortado tangencialmente se puede ver en un extremo de la foto. Desde uno de sus extremos parte una unión estrecha de gran extensión (fascia occludens). En el otro polo de esta unión se observan las dos unidades de membrana convergiendo. Carcinoma epidermoide de cuello uterino bien diferenciado. Glutaraldehído y osmio. x 102.500.

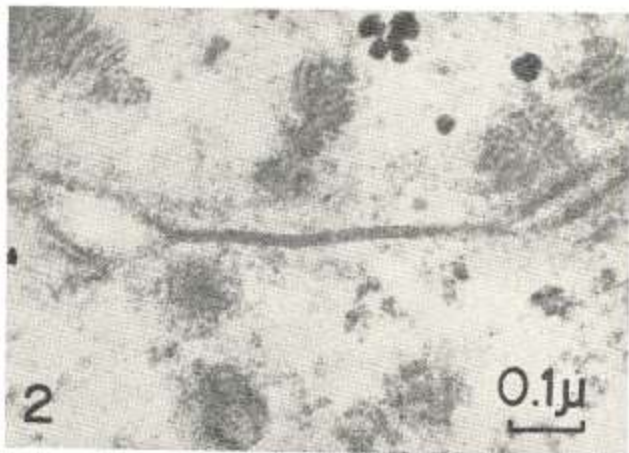


Fig. 2. Microfotografía electrónica a alta resolución de la mácula ocludens. Se observan las cinco líneas que forman esta estructura; dos hojas internas, dos hojas medias y una hoja externa (resultado de la fusión de las dos unidades de membrana). Carcinoma epidermoide bien diferenciado del cuello uterino. Glutaraldehído y osmio. x 105.000.

algunos sitios disminuye de volumen debido a que el ectoplasma se proyecta hacia el espacio intersticial, aproximándose así las células (Figs. 6 y 12). A nivel de estas áreas se encuentran los desmosomas, compuestos de las siguientes estructuras: a) Sobre la membrana celular se observa la placa de unión, representada por una zona electrodensa aplicada a la hoja interna de la unidad de membrana, con espesor aproximado de 100-140 Å. Usualmente la fusión entre la placa de unión y la membrana celular es tan íntima que no se pueden individualizar en las microfotografías (Fig. 7). b) En la superficie citoplasmática de la placa de unión convergen finos filamentos, con un diámetro aproximado de 90-120 Å. Los filamentos se agrupan en manojos y el espesor de estos manojos es moderado, pudiendo alcanzar hasta 1.000 Å; usualmente son menos desarrollados que los que recorren el citoplasma. La hoja media de la unidad de membrana, a nivel del desmosoma, corresponde a la primera zona externa no electrodensa descrita clásicamente en este tipo de unión; luego se encuentra la hoja externa de la unidad de membrana. El ancho de estas dos formaciones es de 30 y 25 Å, respectivamente. c) Equidistante 70 Å de las dos hojas externas de las dos unida-



Fig. 3. Microfotografía electrónica a alta resolución en la que observamos un desmosoma cortado tangencialmente y una fascia occludens, en la cual los elementos osmiofilicos de esta unión presentan un grosor poco usual (100-80-100 A, respectivamente). Este engrosamiento recuerda el sufrido por el queratinocito al cornificarse. Carcinoma epidermoide de cuello uterino. Glutaraldehído y osmio, x 106.250.



Fig. 4. Uniones intercelulares entre dos células epiteliales. Se ven zónulas adherens, que por su gran extensión sería más propio rotular como fascia adherens. Displasia severa del cuello uterino. Glutaraldehído y osmio, x 27.000.



Fig. 5. En esta microfotografía electrónica se pueden observar una mácula adherens y varias zónulas adherens. Displasia severa de cuello uterino. Glutaraldehído y osmio. x 60.000.

des de membrana de las dos células implicadas en la formación del desmosoma, se encuentra un área electrodensa de 25 Å de espesor, cuya longitud es igual a la de las placas de unión (Fig. 7). Estas tres últimas áreas son realmente extracelulares. Hemos tenido oportunidad de ver cómo en este espacio extracelular se encuentran a veces tabiques de 25 Å de diámetro (Figs. 8 y 13).

La unión epitelio-conjuntiva normal es reforzada por los hemidesmosomas (Fig. 9). Su estructura equivale a la mitad de los componentes del desmosoma: un manojito de tonofilamentos, una placa de unión, y una unidad de membrana. Los elementos de la otra célula corresponden en este sitio al conjuntivo y están presentes así: una zona clara con espesor promedio de 300-500 Å denominada lámina lúcida, que corre paralela a la superficie de la célula epitelial vecina y se continúa con el espacio intersticial



Fig. 6. Microfotografía electrónica de la unión intercelular de dos células epiteliales de la mucosa del exocérnix humano. Se observan grandes espacios intercelulares, la membrana citoplasmática y la mácula adherens. En el citoplasma celular se distinguen: un 'pequeño gránulo', una mitocondria, membranas del retículo endoplasmático, ribosomas y gránulos de beta-glicógeno. Mucosa exocervical. Glutaraldehído y osmio, x 60.000.



Fig. 7. Microfotografía electrónica a alta resolución de la mácula adherens. Se observan las placas de unión y los tonofilamentos que convergen sobre ellas, la unidad de membrana y la estructura electrodensa situada en el espacio intersticial a este nivel. Encía humana normal. Buffer cacodilato y osmio. x 106.250.

del tejido epitelial; y una zona electrodensa, la lámina basal de 600 Å de espesor, compuesta por innumerables filamentos entrelazados de 30 - 35 Å. Algunos de estos filamentos se desprenden y atraviesan la lámina lúcida para hacer contacto con la unidad de membrana de la célula epitelial.

A nivel de los hemidesmosomas los filamentos que cruzan la lámina lúcida convergen entre sí, haciendo sincicios, que distan pocos Angströms de la unidad de membrana vecina.

DISCUSION

La amplia terminología moderna con que se designan a las distintas uniones intercelulares nos obligan a presentar un recuen-



Fig. 8. Microfotografía electrónica de la mácula adherens. Se pueden apreciar los finos tabiques que dividen transversalmente el espacio intersticial a este nivel. Gingivitis, Buffer cacodilato y osmio, x 106.250.

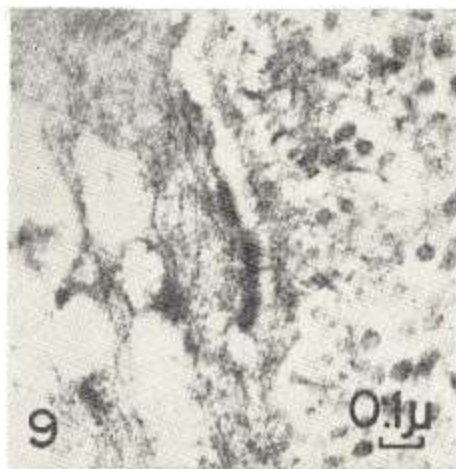


Fig. 9. Unión epitelio-conjuntiva. Se observan los hemidesmosomas, la lámina basal, la lámina lúcida y los filamentos que atraviesan a éste. Encía humana normal. Buffer cacodilato y osmio, x 60.000.

to general de ellas. A estas descripciones basadas en las publicaciones de Fawcett², agregaremos nuestros esquemas para facilitar la comprensión (Figs. 10 - 13).

Zónula ocludens ("tight junction"). Las dos membranas celulares se han unido, no dejando espacio intercelular. Este tipo de unión al igual que un cinturón, rodea todo el perímetro de las células en contacto, sellando así el espacio intersticial, v. g. de un lumen vecino (cinturón de unión estrecha). La mácula ocludens tiene una estructura similar a la zónula ocludens, pero en una extensión muy limitada (son "botones de unión estrecha"). En el músculo se denominan nexus. La fascia ocludens ("close junction"), de estructura similar a las anteriores, se caracteriza por ocupar una gran extensión sin relación al eje mayor de las células ("superficie de unión estrecha"). La estructura descrita por nosotros se asemeja más a la fascia ocludens.

Zónula adherens. En este tipo de unión el espacio intercelular se conserva, alcanzando hasta 200 Å de ancho, con condensaciones ligeras del citoplasma sobre la hoja interna de la unidad de membrana. Se dispone como un cinturón en una gran extensión transversal de la célula, perpendicular al eje mayor de ésta ("cinturón de unión intermedia"). La fascia adherens equivale a una unión similar a la zónula adherens, pero no guarda relación con los ejes de las células y su extensión es limitada.

Mácula adherens (desmosoma). Es un área de unión con un espacio intercelular de 250 Å, dividido por una línea electrodensa; con condensaciones del citoplasma sobre la membrana celular y tonofilamentos ("botón de unión"). Hemos descrito a los desmosomas compuestos por dos placas de unión, en íntima relación a la unidad de membrana, y de una estructura lineal, electrodensa, situada en el espacio intersticial.

Ha sido motivo de interés la composición química de los elementos que constituyen las uniones intercelulares. En trabajos anteriores basados en nuestras observaciones y en la discusión de la literatura actual, consideramos que en el desmosoma las zonas electrodensas de las placas de unión, los tonofilamentos, y la línea osmiofílica situada en el espacio intersticial correspondían a proteínas^{5, 6, 7, 8}; en tanto que las zonas no electrodensas del espacio intersticial estarían formadas por mucopolisacáridos

ácidos similares a los que se observan en el espacio intersticial de todos los epitelios^{6, 8}.

Estudios histoquímicos modernos indican que las placas de unión están compuestas por polipéptidos, sensibles a las proteasas, tal vez muy ricas en aminoácidos aromáticos, con estructura química diferente a las proteínas que constituyen los filamentos, la línea electrodensa del espacio intersticial, o de los que participan en la formación de la membrana plasmática².

Además, entre las placas de unión y la hoja interna de la unidad de membrana, se encuentran pequeñas cantidades de mucopolisacáridos ácidos, mezclados con proteínas proteasas-sensitivas, razón por la cual desaparecerían junto con las proteínas degradadas por la proteasa²; pero que son fácilmente demostrables con técnicas específicas para mucopolisacáridos, tales como el rojo de rutenio⁴. En el espacio intersticial se hallaría el ácido siálico y glicoproteínas¹. A nivel de los hemidesmosomas la composición química sería equivalente: proteínas ricas en aminoácidos insaturados en la placa de unión, mucopolisacáridos ácidos

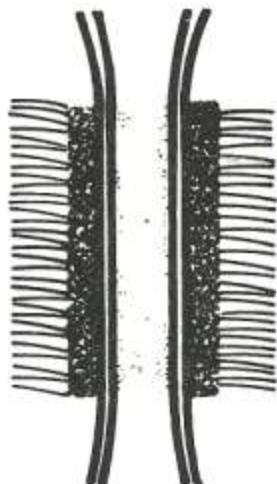
Fig. 10. Esquema que muestra la fusión de las hojas externas de las unidades de membrana que forman la mácula ocludens.

Fig. 11. Esquema en el cual se aprecian los componentes de la zónula adherens: las dos unidades de membrana separadas por una pequeña zona intercelular con un material de mediana densidad electrónica. Sobre la hoja interna de las unidades de membrana un material electrodensó sobre el cual inciden algunos tonofilamentos.

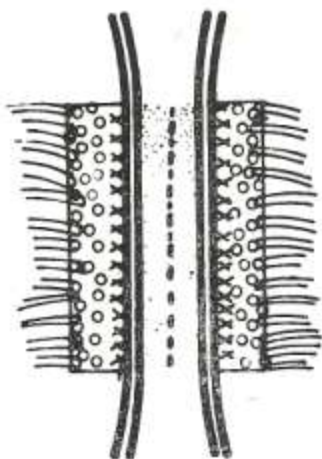
Figs. 12 y 13. Esquema que muestra las características del desmosoma. Las dos unidades de membrana separadas por un espacio intercelular en el cual existe una substancia electrodensa, que se puede organizar como una línea paralela al eje longitudinal de la unión (Fig. 12), o como filamentos que se extienden de una membrana a la otra (Fig. 13). Las placas de unión aplicadas a la unidad de membrana están compuestas de dos substancias diferentes: una que serviría de cemento (cruces) y otra que serviría de anclaje a los tonofilamentos (esferas).



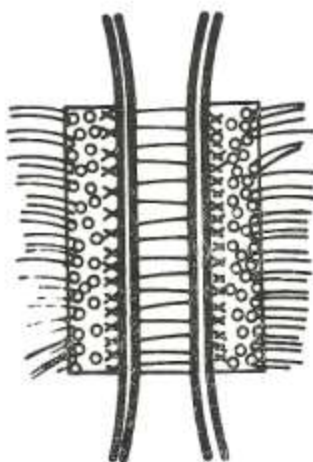
10



11



12



13

que cementarían esta placa de unión a la hoja interna de la membrana, la unidad de membrana con su estructura trilaminar lipoglicoproteica y luego, en este caso, la lámina lúcida con glicoproteínas y la lámina basal con proteínas fibrilares, presentes en la forma de finos filamentos entrelazados sobre una matriz de mucopolisacáridos⁴.

Los mismos constituyentes, aunque en proporciones distintas, constituirían las uniones intermedias y estrechas; por ejemplo, las glicoproteínas faltan casi por completo en las uniones estrechas^{1, 6, 8}.

A mayor resolución se ha visto cómo las dos hojas externas de las unidades de membrana en las uniones estrechas pueden no fusionarse en algunos puntos, manteniendo una separación que fluctúa alrededor de los 20 Å⁹.

Por la recopilación de los datos anteriores podemos concluir, que en las placas de unión se encuentran por lo menos dos tipos de sustancias: proteínas ricas en aminoácidos, que explicaría la fuerte osmiofilia de esta zona; y entre estas proteínas y la hoja interna de la unidad de membrana, mucopolisacáridos ácidos que favorecerían la "cementación" de los anteriores a la membrana celular. Existen además, a este nivel, tonofilamentos compuestos de proteínas fibrilares, que convergen sobre la placa de unión y entrelazan sus cadenas con las moléculas de las proteínas de las placas de unión.

Además, a nuestra manera de ver, las enzimas que se sitúan sobre la hoja externa de la unidad de membrana en la superficie de toda la célula a nivel de la unión intercelular, desaparecerían, deducción que hacemos por no presentar la hoja externa a este nivel el mayor engrosamiento en relación a la hoja interna que es tan visible a otros niveles de la membrana citoplasmática. Igualmente, las sustancias situadas en el espacio intersticial disminuyen hasta desaparecer a manera que la unión intercelular es más estrecha, siendo reemplazadas por nuevas sustancias.

RESUMEN

Por medio del microscopio electrónico se estudiaron las uniones intercelulares a nivel del exocérnix humano normal, en casos

de displasia y carcinoma epidermoide, así como la encía humana normal, y en casos de gingivitis. El material se fijó en glutaraldehído o en buffer cacodilato, y en osmio; se incluyó en Araldita y se tiñó con acetato de uranilo y plomo.

Se encontraron en estos tejidos: la zónula ocludens, tipo de unión en la cual hay fusión de las dos hojas externas de las unidades de membrana. La zónula adherens, con una distancia intercelular de 200 Å. Estas dos se observaron preferentemente en los tejidos patológicos.

En los tejidos normales la unión más frecuente fue la mácula adherens, compuesta de placas de unión, tonofilamentos asociados con éstas; y una zona electrodensa paralela a las placas de unión que divide el espacio intersticial en dos mitades. Los hemidesmosomas se hallaban a nivel de la unión epitelio-conjuntiva.

Se discute la composición química de los elementos que constituyen estas uniones. Se consideran las placas de unión compuestas por polipéptidos ricos en aminoácidos aromáticos, y cuya estructura es diferente a la de las proteínas que forman los tonofilamentos. Las placas de unión presumiblemente están cementadas a la unidad de membrana por mucopolisacáridos ácidos. El ácido hialurónico y glicoproteínas se hallarían en el espacio intersticial; disminuyendo su cantidad a manera que el espacio se reduce de tamaño.

SUMMARY

In cases of dysplasia, epidermoid carcinoma and normal human exocervix, the intercellular unions were studied with the electron microscope. Normal human gum with gingivitis was also studied. The material was fixed in glutaraldehyde or cacodylate buffer and osmium, embedded in araldite and stained with uranyl acetate and lead citrate.

In these tissues we found the zonula occludens which is a type of union where there is a fusion of the two external leaves of the unit membrane, and the zonula adherens with an intercellular space 200 Å wide. These two were preferably observed in pathologic tissue.

In the normal tissues the most frequent union was the macula adherens, comprised of attachment plaques, tonofilaments associated to the plaques, and an electrodense area parallel to the attachment plaques which divides the interstitial space into two halves. The hemidesmosomes were found at the level of the conjunctive - epithelium union.

The chemical composition of the elements which constitute these unions is discussed and we consider the attachment plaques, made up of polypeptides, rich in aromatic amino acids, and whose structure is different from that of the proteins which form the tonofilaments. The attachment plaques are presumably cemented to the unit membrane by acid mucopolysaccharides. The hyaluronic acid and glycoproteins will be found in the interstitial space, diminishing their quantity as the space is reduced in size.

AGRADECIMIENTO

A los Sres. Jesús Vivas y Eduardo Añez por su asistencia técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 — BENEDETTI, E. L.; EMMLOT, P. "Structure and function of plasma membrane isolated from liver". *The Membrane*. Pag. 33-120. A. J. Dalton y F. Haguenuau, editores. Academic Press. New York. 1968.
- 2 — DOUGLAS, W. H. J.; RIPLEY, R. C.; ELLIS, R. A. "Enzymatic digestion of desmosomes and hemidesmosomes plaques performed on ultrathin section". *J. Cell Biol.* 44: 211-215. 1970.
- 3 — FAWCETT, D. W. "Specializations of the cell-to-cell attachment". *The Cell*. Pag. 365-382. W. B. Saunders Comp. Philadelphia. 1966.
- 4 — KELLY, D. F. "Fine structure of desmosomes, hemidesmosomes, and an adepidermal globular layer in developing newt epidermis". *J. Cell Biol.* 28: 51-72. 1966.
- 5 — LUZARDO-BAPTISTA, M. J.; GARCIA TAMAYO, J. "Ultraestructura de las células espinosas de la mucosa bucal humana normal". *Invest. Clín.* 27: 17-38. 1968.
- 6 — LUZARDO-BAPTISTA, M. J.; GARCIA TAMAYO, J. "Ultraestructura de la lámina basal y células basales del epitello de la mucosa bucal humana normal". *Invest. Clín.* 28: 23-40. 1968.

- 7 — LUZARDO-BAPTISTA, M. J.; CASTEJON, O. "Epithelial junction in the stratum spinosum of the human oral mucosa". *Parodontologie*. 23: 117-182. 1969.
 - 8 — LUZARDO-BAPTISTA, M. J.; GARCIA TAMAYO, J.; NUNEZ, J. T. "Anatomía submicroscópica del exocérvix humano normal". *Invest. Clín.* 30: 23-56. 1969.
 - 9 — UEHARA, Y.; BURNSTOCK, G. "Demonstration of 'gap junctions' between smooth muscle cell". *J. Cell Biol.* 44: 215-217. 1970.
-