

ORIGEN, FUNCION Y DESTINO DE LOS "PEQUEÑOS GRANULOS"
EN LA ENCIA HUMANA NORMAL

— **Dr. Mario Luzardo Baptista.**

— **Dr. Jorge García Tamayo.**

Laboratorio de Microscopía Electrónica.
Servicio de Patología,
Sanatorio de Maracaibo,
Maracaibo - Venezuela.

INTRODUCCION

Los "pequeños gránulos" fueron descritos por primera vez por Selby¹. Años más tarde Matoltsy y Parakkal² los denominaron gránulos "recubiertas de membrana" (membrane-coating granules), término ampliamente usado hoy en día.

Estos organoides están usualmente situados a nivel de las células superficiales del estrato espinoso, tanto en la epidermis¹, como en las mucosas^{1, 4, 5}. A nivel del estrato granuloso, es frecuente verlos cerca a invaginaciones de la membrana citoplasmática².

Por ser este organoide un hallazgo común en todos los epitelios pluriestratificados del hombre y de los animales, se ha despertado el interés en su estudio para establecer sus posibles funciones. No existiendo aún un conocimiento completo de éstas, y habiendo nosotros hallado en su interior actividad enzimática sobre la cual sólo hemos leído una publicación previa, reportamos nuestros hallazgos, que creemos pueden contribuir a una mejor comprensión de la fisiología normal de este organoide.

MATERIAL Y METODO

Se tomaron diez biopsias de encía marginal y fija al reborde alveolar, y se sometieron al siguiente tratamiento:

1) El tejido se fragmentó en trozos no mayores de dos milímetros, y se fijó durante dos horas en gutaraldehído al 4% en una solución de fosfato de sodio, pH 7,4 y 747 mOs/L; fijación secundaria en tetraóxido de osmio al 2,5% en una solución

tamponada de fosfato de sodio, pH 7,4 y osmolaridad de 298. El tejido después de deshidratado se incluyó en Araldita.

2) Las biopsias se cortaron en finas tiras y se fijaron en una solución tamponada de glutaraldehído al 6,25% en cacodilato, 677 mOs/L., a 4°C durante tres horas; se lavaron en buffer caco-

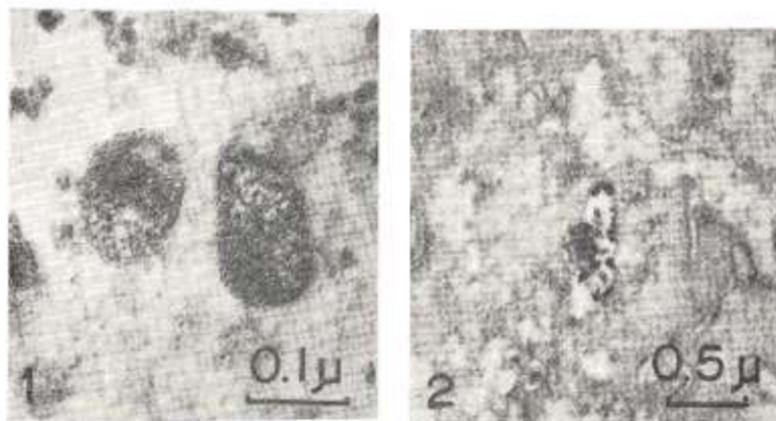


Figura 1. Microfotografía electrónica de un pequeño gránulo situado en la periferia de una célula epitelial. Se observa la unidad de membrana que le delimita y el material electrodensó situado en su interior. Fijación con glutaraldehído y osmio. Coloración con acetato de uranilo y plomo. X 160.000.

Figura 2. La actividad de fosfatasa ácida se pone en evidencia por zonas electrodensas que corresponden al plomo precipitado. Se puede ver esta actividad enzimática en relación a membranas lisas, en una célula epitelial del estrato espinoso de la mucosa gingival humana normal. X 27.000.

dilato 0,1 M, que contenía 7,5% de sacarosa y se congelaron con hielo seco. Se practicaron secciones de 50 micras de espesor en un criostato, y se lavaron con buffer frío, que contenía 7,5% de sacarosa. El tejido fue incubado durante 15 minutos a 37°C en un medio compuesto de dos partes de una solución al 2% de betaglicerofosfato de sodio, una parte de una solución 0,1 M de buffer acetato pH 5,2 y una parte de acetato de plomo al 2%.

Posteriormente las secciones fueron sumergidas en una solución 0,1 M de buffer acetato pH 5,2 y luego sumergidas durante 30 segundos en ácido acético al 2%; lavadas en buffer



Figura 3. Fuerte actividad de fosfatasa ácida en el interior de pequeños gránulos situados en el ectoplasma. Uno de estos gránulos (flecha), está en íntima asociación con la membrana citoplasmática. Se aprecia cómo a veces la actividad de la enzima fosfatasa ácida, está concentrada en la periferia del gránulo, sobre la membrana. En otras ocasiones la actividad de la enzima está ocupando todo el gránulo. X 60.000.



Figura 4. Microfotografía electrónica que muestra un pequeño gránulo 'abierto' al espacio intersticial, con su membrana fusionada a la membrana citoplasmática. X 160.000.

acetato. Fijación en tetraóxido de osmio en solución tamponada de cacodilato; deshidratadas en acetona e incluidas en araldita.



Figura 5. Microfotografía electrónica a mayor aumento, que permite ver pequeños gránulos laminados, con actividad de fosfatasa ácida en su interior. X 120.000.

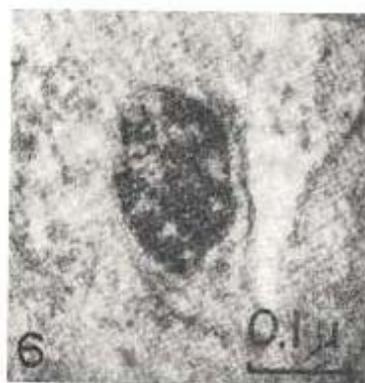


Figura 6. Microfotografía electrónica a mayor resolución de un pequeño gránulo con actividad de la enzima fosfatasa ácida en su interior. X 160.000



Figura 7. Microfotografía electrónica de células epiteliales del estrato córneo. Se observan pequeños gránulos remanentes en la periferia celular (flecha), y fuerte actividad de fosfatasa ácida en el espacio intersticial. X 27.000.

Las secciones ultrafinas se tiñeron con acetato de uranilo y acetato de plomo y fueron estudiadas al microscopio electrónico.

RESULTADOS

Hemos observado los pequeños gránulos a nivel de las células intermedias y superficiales del estrato espinoso de la mucosa de la encía humana normal; situados preferentemente hacia el polo distal de las células, en la vecindad de la membrana citoplasmática.

Los gránulos son formaciones redondeadas u ovaladas, limitadas por una unidad de membrana, que pueden alcanzar hasta una micra de diámetro. Un material electrodensó se encuentra en su interior, concentrado en el centro o sobre su membrana. A veces la disposición de este material recuerda los radios de una rueda de carreta. Además, algunos gránulos poseen láminas en su interior, de espesor igual al de una unidad de membrana; que se orientan transversalmente al eje mayor del gránulo (Figs. 1, 5).

Los pequeños gránulos hacen contacto con la membrana citoplasmática, y al fusionarse sus membranas, se abren al espacio intersticial, donde vierten su contenido (Figs. 3, 4). A nivel del estrato granuloso o del córneo se pueden encontrar remanentes de estos organoides (Fig. 7).

En el material sometido a técnica histoquímica para la determinación de actividad de la enzima fosfatasa ácida, hemos encontrado actividad de esta enzima en el interior de los pequeños gránulos. Esta actividad enzimática es variable. Mientras algunos gránulos no la presentaban, otros la mostraban en la vecindad de su membrana o extendida en todo su interior. En algunos la actividad era tan marcada que el pequeño gránulo lucía como una esfera electrodensa (Figs. 3, 4).

En los gránulos con láminas en su interior, pudimos observar cómo la actividad de la enzima parece extenderse desde la zona periférica de las láminas hacia el centro del organoide (Fig. 5). La actividad de la enzima era evidente en relación a algunas membranas lisas (Fig. 2).

En la mayoría de los cortes se observó actividad de la fosfatasa ácida en el espacio intersticial a nivel del estrato córneo (Fig. 7).

DISCUSION

Los pequeños gránulos son formados aparentemente en el interior del citoplasma celular^{8, 10}, desde donde migran hacia la periferia. La existencia en el espacio intersticial de un material electrodenso, con características similares al contenido en los pequeños gránulos, hizo pensar desde un comienzo, que estos organoides contenían sustancias destinadas a ser secretadas^{2, 9, 10}.

Nosotros hemos observado en los extremos del complejo de Golgi, pequeñas vesículas con características que parecen sugerir que son precursoras de los pequeños gránulos⁶. Esta observación apoya el concepto de Bonneville et al.¹, quienes consideran que las vesículas situadas en los extremos del complejo de Golgi bien podrían agruparse así: a) pequeñas vesículas de pared lisa, hasta de 700 A de diámetro, numerosas en los extremos de las cisternas y en el citoplasma vecino; b) vesículas de pared lisa, hasta de 1600 A, que nacen en sacos dilatados del complejo de Golgi y se dispersan luego en el citoplasma; pueden tomar parte luego en la formación de vesículas gigantes, o pueden migrar y fusionarse a la membrana citoplasmática; c) vesículas 'recubiertas' que pueden pasar a formar parte de cuerpos multivesiculares o constituirse en vesículas lisas, grandes, que se abrierán al espacio intersticial; d) vesículas 'recubiertas', que son las precursoras de los pequeños gránulos.

Algunas de estas vesículas han sido descritas por nosotros tanto en el exocérnix normal⁵, como en la displasia del cuello uterino (Luzardo, en vías de publicación).

Hemos expresado la opinión de que todas estas vesículas estaban destinadas al transporte de sustancias, y probablemente a la secreción de estas sustancias al espacio intersticial⁵; así como también a funciones digestivas⁷.

El contenido enzimático encontrado en los pequeños gránulos por Wolf y Holubar¹, y comprobado por nosotros⁷, tal como lo presentamos en nuestros resultados, nos hace pensar que subs-

tancias fabricadas en el complejo de Golgi, son vertidas al espacio intersticial al mismo tiempo que la célula se superficializa, y envejece, al pasar a la capa córnea; y que estas sustancias, algunas demostrables por métodos histoquímicos como es el caso de la fosfatasa ácida, deben tener relación con cambios anatómicos y fisiológicos a nivel del espacio intersticial; pudiendo ser uno de estos la descamación celular.

Ya en la imprenta este trabajo, hemos leído la comunicación de Weinstock y Wilgram (*J. Ultrastr. Res.* 30: 262-274, 1970), en el que se reportan hallazgos, similares a los nuestros, en lengua de ratón.

RESUMEN

Biopsias de encía normal se sometieron a fijación en glutaraldehído y osmio, coloración con acetato de uranilo y plomo e inclusión en araldita; o fijación en glutaraldehído en cacodilato; sección previa congelación e incubación en un medio que contiene betaglicerofosfato de sodio, buffer acetato y acetato de plomo; fijación posterior en osmio, e inclusión en Araldita. Coloración similar a la anterior.

Los pequeños gránulos contenían material electrodenso en su interior; algunos estaban cruzados por láminas. Se observó la fusión de estos gránulos con la membrana citoplasmática, y el paso de su contenido al espacio intersticial. En los extremos del complejo de Golgi se observaron vesículas que, presumiblemente, son las precursoras de los pequeños gránulos.

En el material incubado para histoquímica, se encontró actividad de la enzima fosfatasa ácida en el interior de los pequeños gránulos. La actividad de la enzima parecía extenderse sobre las láminas que tabicaban los gránulos y era muy manifiesta en el espacio intersticial de las capas granulosa y córnea.

Se discute la posibilidad de que los pequeños gránulos entre sus múltiples funciones, puedan actuar como lisosomas muy especializados, contribuyendo a cambiar la fisiología del espacio intersticial a nivel de la capa superficial del epitelio. Tal vez, los pequeños gránulos estén comprometidos en el proceso de descamación celular.

SUMMARY

Biopsies of normal human gum were fixed in glutaraldehyde and osmium, stained with uranyl acetate, and lead citrate, and embedded in araldita. Others were fixed in glutaraldehyde buffered cacodylate; quenched and incubated in a sodium-beta-glycero-phosphate, buffered acetate, and lead acetate medium. Post-fixed in osmium, and embedding in araldita; staining similar to last.

The small granules contained electrodense material in their interior; some were crossed by laminae. Fusing of these granules with the plasma membranes was observed, and the pouring of their content to the intercellular space. In the Golgi Complex's extremes vesicles were seen, presumably, these are the small granule's precursor.

In the incubated material for histochemistry, acid phosphatase activity was found in the interior of the small granules. The activity of the enzyme seemed to spread on their laminae, and was also evident in the intercellular space of the granular and cornified layer.

The possibility that small granules, among their multiple functions, can act as very specialized lysosomes, helping to change the intercellular space physiology, at the superficial layer of the stratified squamous epithelium is discussed. Maybe, these small granules are engaged in the shedding process.

AGRADECIMIENTO

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

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 — BONNEVILLE, M. A.; WEINSTOCK, M.; WILGRAM, G. F. "An electron microscope study of cell adhesion in psoriatic epidermis". *J. Ultrastr. Res.* 23: 15-43. 1968.
 - 2 — FARBMAN, A. I. "Electron microscope study of a small cytoplasmic structure in rat oral epithelium". *J. Cell Biol.* 21: 491-495. 1964.
 - 3 — FRITHIOF, L.; WERSALL, J. "A highly ordered structure in keratinizing human oral epithelium". *J. Ultrastr. Res.* 12: 371-379. 1965.
 - 4 — LUZARDO-BAPTISTA, M. J.; CASTEJON, O. "Ultraestructura de las células espinosas de la mucosa bucal humana normal". *Invest. Clín.* 27: 17-38. 1968.
 - 5 — LUZARDO-BAPTISTA, M. J.; GARCIA-TAMAYO, J.; NUÑEZ, J. T. "Anatomía submicroscópica del exocérnix humano normal". *Invest. Clín.* 30: 23-56. 1969.
 - 6 — LUZARDO-BAPTISTA, M. J.; GARCIA-TAMAYO, J.; NUÑEZ, J. T. "Algunas características ultraestructurales del carcinoma del cuello uterino". *Acta Cient. Venez.* 21: 63. 1970.
 - 7 — LUZARDO-BAPTISTA, M. J.; GARCIA-TAMAYO, J. "Actividad de fosfatasa ácida en los 'pequeños gránulos' de epitelios pluriestratificados". *Acta Cient. Venez.* 21: 19. 1970.
 - 8 — MATOLTSY, A. G.; PARAKKAL, P. F. "Membrane-Coating granules of keratinizing epithelia". *J. Cell Biol.* 24: 297-307. 1965.
 - 9 — MATOLTSY, A. G. "Membrane-coating granules of the epidermis". *J. Ultrastr. Res.* 15: 510-515. 1966.
 - 10 — MATOLTSY, A. G.; PARAKKAL, P. F. "Keratinization". *Ultrastructure of normal and abnormal skin.* Pag. 76-104. A. S. Zelicson. (ed.) Lea-Febiger. Filadelfia. 1937.
 - 11 — ODLAND, G. F. "A submicroscopic granular component in human epidermis". *J. Invest. Dermatol.* 34: 11-15. 1960.
 - 12 — SELBY, C. C. "An electron microscope study of thin sections of human skin. II. Superficial cell layers of foodpad epidermis". *J. Invest. Dermatol.* 29: 131. 1957.
-