



Desarrollo y validación de un modelo de cultivo *in vitro* para el estudio de la diferenciación del trofoblasto humano*

Alfonso Martínez Flores,** Jorge Beltrán Montoya,** Alicia Ortega Aguilar,** Felipe Vadillo Ortega**

Nivel de evidencia: II-3

RESUMEN

Objetivos: desarrollar un método para aislar células de citotrofoblasto humano y evaluar su capacidad invasora y de diferenciación.

Tipo de estudio: biomédico experimental.

Material y método: se aislaron citotrofoblastos de placentas sanas de embarazos a término por digestión con dispasa y purificación en gradiente de densidad. Se evaluó la pureza por inmunoreactividad a la citoqueratina 7 y la invasividad de las células del citotrofoblasto en Matrigel. La actividad enzimática se determinó por medio de zimografía y la hCG secretada se cuantificó por ELISA. La expresión de integrinas alfa 1 y alfa 5 se evaluó por inmunohistoquímica.

Resultados: se obtuvieron citotrofoblastos con pureza del 97%, que se diferenciaron, de manera espontánea, a un sincitio después de cuatro días; se acompañó de producción creciente de hCG. La invasividad de los citotrofoblastos fue máxima los primeros dos días, cuando su fenotipo fue mononuclear y coincidió con la secreción de pro-MMP-9, y disminuyó con el tiempo de cultivo. La inmunoreactividad a las integrinas alfa 1 y alfa 5 se observó en las células del citotrofoblasto con el fenotipo mononuclear y fue menor en células con fenotipo de sincitio.

Conclusiones: se desarrolló un modelo *in vitro* que replica eventos del desarrollo temprano de la placenta, que emulan la etapa de invasión y de diferenciación del citotrofoblasto. Este modelo tiene utilidad potencial en el estudio de los mecanismos de daño en la preeclampsia.

Palabras clave: trofoblasto humano, diferenciación.

ABSTRACT

Objectives: To develop a method to isolate cells of human cytotrophoblast and to assess its invading and differentiation capacity.

Type of study: Experimental biomedical.

Materials and method: Cytotrophoblasts of healthy placentas of full-term pregnancies were isolated by digestion with dispase and purification in a density gradient. The purity by immunoreactivity to cytokeratin 7 and the invasiveness of the cells of cytotrophoblast in Matrigel were evaluated. The enzymatic activity was determined through zimography and hCG secreted was quantified by means of ELISA. The expression of alpha 1 and alpha 5 integrins was evaluated by immunohistochemistry.

Results: Cytotrophoblasts with a purity of 97% were obtained; they differentiated themselves, in a spontaneous way, to a syncytium after four days. There was a growing production of hCG. Maximum invasiveness of cytotrophoblasts occurred the first two days, when their phenotype was mononuclear and coincided with the secretion of pro-MMP-9, and then it diminished according with the culture time. Immunoreactivity to the alpha 1 and alpha 5 integrins was observed in cytotrophoblast cells with mononuclear phenotype. This immunoreactivity was lower in cells with phenotype of syncytium.

Conclusions: It was created an *in vitro* model that replicates events of the early development of the placenta. These events resemble the invasion and differentiation phase of the cytotrophoblast. This model has potential utility in the study of the mechanisms of damage in preeclampsia.

Keywords: human trophoblast, differentiation.

RÉSUMÉ

Objectif : la compréhension des mécanismes physiopathogéniques de la prééclampsie est devenue difficile du fait du manque de modèles expérimentaux disponibles pour son étude. Dans ce travail on développe une méthode pour isoler des cellules de cytotrophoblaste humain et on évalue leur capacité envahisseuse et de différenciation.

Type d'étude : biomédical expérimental.

Matériels et méthode : on a isolé des cytotrophoblastes de placentas sains de grossesses à terme par digestion avec dispase et purification sur gradient de densité. On a évalué la pureté par immunoréactivité de la cytokératine 7 et la capacité invasive des cellules du cytotrophoblaste en Matrigel. L'activité enzymatique a été déterminée au moyen de zymographie et la hCG ségrégée a été quantifiée par ELISA. L'expression d'intégrines alpha 1 et alpha 5 a été évaluée par immunohistochimie.

Résultats : on a obtenu des cytotrophoblastes avec pureté de 97%, qui se sont différenciés, de manière spontanée, dans un syncytium après quatre jours ; il a été accompagné de la production croissante de hCG. La capacité invasive des cytotrophoblastes a été maximale les deux premiers jours, lorsque leur phénotype a été mononucléaire et a coïncidé avec la sécrétion de pro-MMP-9, et a diminué avec

le temps de culture. L'immunoréactivité des intégrines alpha 1 et alpha 5 a été observée dans les cellules du cytotrophoblaste avec le phénotype mononucléaire et a été inférieure dans les cellules avec phénotype de syncitium.

Conclusions : on a développé un modèle *in vitro* qui reproduit des événements du développement précoce du placenta, qui émulent l'étape d'invasion et de différenciation du cytotrophoblaste. Ce modèle a une utilité potentielle dans l'étude des mécanismes de dommage dans la prééclampsie.

Mots-clé : trophoblaste humain, différenciation.

RESUMO

Objetivo: a compreensão dos mecanismos fisiopatogênicos da pré-eclâmpsia tem se complicado por causa da falta de modelos experimentais disponíveis para seu estudo. Neste trabalho desenvolve-se um método para isolar células de citotrofoblasto humano e avalia-se a sua capacidade de invasão e de diferenciação.

Tipo de estudo: biomédico experimental.

Materiais e método: Isolaram-se citotrofoblastos de placentas saudáveis de gravidezes a término por digestão com dispase e purificação em gradiente de densidade. Avaliou-se a pureza por imunoreatividade à citoqueratina 7 e à invasividade das células do citotrofoblasto em Matrigel. A atividade enzimática se determinou mediante zimografia e a hCG secretada quantificou-se por ELISA. A expressão de integrinas alfa 1 e alfa 5 foi avaliada por imuno histoquímica

Resultados: obtiveram-se citotrofoblastos com pureza de 97%, que se diferenciaram, de maneira espontânea, a um sincício após quatro dias; se acompanhou com a produção crescente de hCG. A invasividade dos citotrofoblastos foi máxima nos primeiros dois dias, quando seu fenotipo foi mono-celular e coincidiu com a secreção de pro-MMP9 e diminuiu com o tempo de cultivo. A imunoreatividade às integrinas alfa 1 e alfa 5 observou-se nas células do citotrofoblasto com o fenotipo mono-celular e foi menor nas células com fenotipo de sincício

Conclusões: desenvolveu-se um modelo *in vitro* que replica acontecimentos do desenvolvimento primeiro da placenta que emulam a etapa de invasão e de diferenciação do citotrofoblasto. Este modelo tem utilidade potencial no estudo dos mecanismos de dano na pré-eclâmpsia.

Palavras chave: trofoblasto humano, diferenciação.

La implantación es el proceso a través del cual el huevo fertilizado o cigoto se adhiere e invade el endometrio. Esto le garantiza acceso a la circulación materna que lo sostendrá desde las etapas tempranas de su desarrollo hasta su nacimiento.¹ La implantación suele dividirse en tres fases: transporte del cigoto, interacción con el epitelio y fase invasora. La fase de transporte comprende el desplazamiento del cigoto al sitio de anidamiento o implantación dentro de la cavidad uterina. La fase de interacción involucra una etapa de adhesión inestable conocida como aposición y otra estable conocida como adhesión. A partir de este punto de contacto, el cigoto inicia

la invasión y avanza hacia regiones más profundas o subyacentes al epitelio uterino.² El cigoto, que en esta etapa de desarrollo se encuentra en estadio de blastocisto, desarrolla una línea celular periférica llamada trofoectodermo, el cual da origen a un tipo celular conocido como citotrofoblasto. Durante la fase de invasión, las células del citotrofoblasto se alteran en dos destinos diferentes, que dan origen al citotrofoblasto vellosos y al citotrofoblasto extravellosos.^{3,4} El vellosos es una célula de naturaleza no invasora que se diferencia a sinciciotrofoblasto, el cual es una célula multinuclear no proliferativa localizada en la parte más externa del blastocisto. El sinciciotrofoblasto está en contacto con la circulación materna, por lo tanto, tiene un papel importante como barrera de intercambio de gases y nutrientes en la remoción de productos de desecho del feto; proporciona protección inmunológica y tiene la capacidad de secretar hormonas.⁵ El citotrofoblasto extravellosos es una célula proliferativa de naturaleza invasora. Durante la fase invasora migra a través del epitelio uterino con dirección a la lámina basal en la que descansa. Invade el estroma uterino hasta el nivel superficial del miometrio en búsqueda de las arterias espirales, hace contacto con ellas, las invade e induce cambios estructurales y fisiológicos, los cuales

* Este trabajo obtuvo el primer lugar del Premio Dr. Eliseo Ramírez para trabajos científicos de investigación básica presentados por escrito en el 57 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia.

** Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, México, DF.

Correspondencia: Dr. Felipe Vadillo Ortega. Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Montes Urales 800, colonia Lomas de Virreyes, CP 11000, México, DF. Tel: 5202-9381. Fax: 5520-0034.
E-mail: fvadillo@servidor.inper.edu.mx

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

permiten la comunicación entre el sistema circulatorio materno y el fetal.⁶

El estudio de la modulación de la diferenciación del citotrofoblasto humano se ha obstaculizado por la imposibilidad de estudiar tejidos humanos de las etapas tempranas del desarrollo normal. Por ello, se ha propuesto el uso de diferentes modelos experimentales como el cultivo *in vitro* de células de citotrofoblasto humano.⁷ El modelo permite duplicar dos importantes sucesos secuenciales del desarrollo de la placenta, que se refieren a la capacidad de invasión de la matriz extracelular y la diferenciación a sinciotrofoblasto. Cada uno de estos fenómenos está acompañado por la expresión de moléculas que se consideran marcadores moleculares, que distinguen a la adquisición de la capacidad invasora (MMP-9) y a la diferenciación a sinciotrofoblasto (hCG). Al respecto, se ha demostrado que, en las condiciones del modelo de cultivo *in vitro*, las células del citotrofoblasto humano aisladas de placentas, durante el primer trimestre o al término del embarazo, tienen la capacidad de invadir una matriz extracelular. Este fenómeno es esencialmente dependiente de la producción de MMPs, en especial de MMP-9.^{8,9} Las células del citotrofoblasto en cultivo expresan una variedad de moléculas de adhesión celular, conocidas como integrinas, similarmente como la hacen *in vivo*¹⁰ y facilita la invasión y migración de células de citotrofoblasto.¹¹ En condiciones *in vitro*, el citotrofoblasto tiene la capacidad de diferenciarse a un sinciotrofoblasto de manera espontánea.¹² Este fenómeno está acompañado por la producción de hormonas como la hCG, entre otras.¹³

Un ejemplo de una aplicación potencial del modelo de cultivo de células del citotrofoblasto es que en la preeclampsia la invasividad del trofoblasto está alterada, lo que provoca que las arterias espirales uterinas no sean alcanzadas por el trofoblasto invasor y, en consecuencia, no tengan los cambios que las convierten en arterias con capacidad de flujo sanguíneo alto y se altera el suministro sanguíneo del feto en crecimiento.^{14,15} La preeclampsia es un modelo biológico en el cual la función de invasión del trofoblasto está dañada y puede ser estudiada al utilizar el modelo de cultivo que se propone en este trabajo. El desarrollo de los propósitos de esta investigación pretende establecer un modelo para el estudio de fac-

tores que pueden estar implicados en la modulación de la diferenciación del trofoblasto durante el embarazo. Uno de ellos es el sistema inmunológico materno y sus posibles efectos en la modulación de la función de implantación del trofoblasto durante el embarazo normal y la preeclampsia.

MATERIAL Y MÉTODO

Aislamiento y cultivo del trofoblasto de la placenta humana

El trofoblasto se aisló de acuerdo con una modificación del método de Kliman (1986), en el cual a porciones tisulares seleccionadas de la placenta se les aplicó la técnica de la digestión enzimática con dispasa al 0.25% y desoxirribonucleasa al 0.01%. El sobrenadante recuperado se centrifugó en un gradiente de densidad con Percoll y las bandas de células separadas se colectaron con pipeta Pasteur. Se resuspendieron en medio de cultivo Eagle de Dulbecco (DMEM) y se cultivaron en placas de seis pozos, a 37°C, en una atmósfera del 5% de CO₂. Como marcador de confirmación de identidad del trofoblasto se utilizó citoqueratina 7. El trofoblasto se aisló de las placentas normales de embarazo a término.

Desarrollo y validación del modelo de invasión

El modelo consiste en placas de cultivo que contienen un inserto Transwell precubierto con Matrigel. El trofoblasto se precultivó en medio de cultivo DMEM durante 12 horas, con 10 µCi de ³H-UTP, antes de ser colocado en la cubierta de Matrigel. Para evaluar la capacidad invasora del trofoblasto las células se cultivaron en tiempos determinados y la cantidad de marca radioactiva incorporada en el matrigel se certificó en el contador de centelleo líquido. La marca radioactiva incorporada se transformó en número de células por 1 x 10⁴ células totales sembradas. El ensayo de invasión se vigiló durante tres días, a 37°C, en una atmósfera del 5% de CO₂.

Desarrollo del modelo de diferenciación del trofoblasto

El ensayo está basado en la diferenciación de células del trofoblasto mononuclear en células multinucleadas o sinciotrofoblasto. Por lo tanto, el trofoblasto se cultivó en placas de seis pozos, en un tiempo equivalente al de su diferenciación *in vitro*. Durante el cultivo, se registraron cambios que indican diferenciación

morfológica y adquisición de fenotipo invasor del trofoblasto. La cinética de diferenciación en el cultivo del trofoblasto se vigiló durante cuatro días, a 37°C, en una atmósfera del 5% de CO₂.

Marcadores de diferenciación e invasividad y del trofoblasto

Como marcadores de estas propiedades del trofoblasto en cultivo se utilizó lo siguiente:

1. *Microscopía de luz y ELISA*. La diferenciación del trofoblasto fue evaluada con: microscopía de luz para registrar los cambios morfológicos en la diferenciación y ELISA para cuantificar las concentraciones de gonadotropina coriónica humana (hCG) secretada por el trofoblasto al medio de cultivo.

2. *Detección inmunocitoquímica de marcadores de identidad del trofoblasto*. Para corroborar la identidad de las células aisladas en el gradiente de Percoll, el cultivo de células del trofoblasto se distinguió por inmunohistoquímica mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-citoqueratina 7. Para ello, el cultivo del trofoblasto se fijó en acetona/metanol 1:1 a tiempos determinados. Se permeabilizó con tritón X 100 y se incubó con un anticuerpo específico anti-citoqueratina 7. La señal de este anticuerpo fue inmunolocalizada con un anticuerpo secundario marcado con enzima.

3. *Detección de enzimas por zimografía, Western blot y ELISA*. Se evaluó la actividad gelatinolítica del cultivo del trofoblasto por medio de zimografía en gelatina, con geles de poli(acrilamida-dodecil) y sulfato de sodio al 8%, copolimerizados con gelatina al 1%. La identidad de las bandas de lisis producidas en el gel por las gelatinasas se evaluó mediante Western blot al utilizar un anticuerpo específico anti-MMP-9 (Ab-1) que fue inmunolocalizado con un anticuerpo secundario marcado con enzima. La cuantificación de las concentraciones de enzima MMP-9 secretada por el trofoblasto al medio de cultivo se realizó por medio de un ensayo de ELISA específico.

RESULTADOS

Aislamiento y purificación del trofoblasto en gradiente de Percoll

La dispa se permitió la disgregación de una cantidad significativa de células a partir de las vellosidades

coriales placentarias que se les aplicó la técnica de la digestión. La centrifugación de estas células en gradiente de Percoll permitió la separación de cuatro bandas distintas distribuidas por todo el gradiente (figura 1). En la base del gradiente se observó población de células rojas o eritrocitos, seguida por una banda de células leucocitarias. En la parte superior del gradiente se observaron porciones pequeñas de vasos sanguíneos, vellosidades coriales y una capa de material blanquecino. En el centro del gradiente, en la región correspondiente a la banda del 40% de Percoll o 1,048 g/mL de densidad, se encontró una banda que contenía una población enriquecida de células del trofoblasto (figura 1). La viabilidad de estas células purificadas, medida por exclusión con azul de tripano, fue superior al 95%. El aislamiento y purificación del trofoblasto, a partir de la placenta normal de un embarazo a término con las condiciones descritas en la metodología, produjo promedio de 4.5 X 10⁶ células por gramo de peso húmedo de tejido placentario (n = 10).

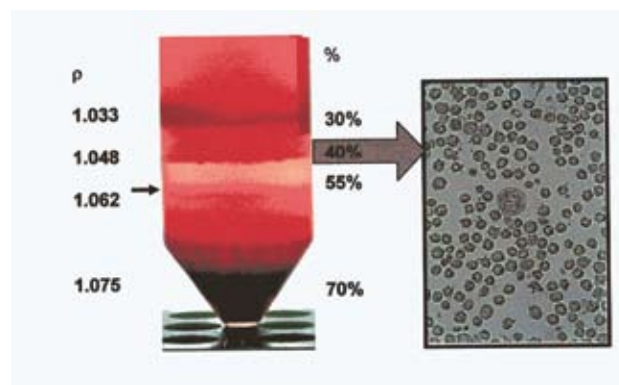


Figura 1. Purificación de células del trofoblasto en gradiente de Percoll. Una suspensión celular obtenida por digestión de vellosidades coriales placentarias con dispasa se centrifugó en gradiente discontinuo de Percoll. La banda correspondiente al 40% de Percoll, o 1,048 g/mL de densidad, corresponde a una población enriquecida del trofoblasto.

Distinción inmunohistoquímica del trofoblasto aislado

Para corroborar la identidad y pureza de las células obtenidas en el gradiente de Percoll, una porción de ellas se analizó mediante inmunohistoquímica al utilizar un anticuerpo monoclonal que reconoce

un marcador específico del trofoblasto. Las células incubadas con el anticuerpo anti-CK-07 (clona OVTL 12/30) mostraron inmunorreactividad a la citoqueratina 7, que es la única isoforma no mesenquimatososa de citoqueratina que se expresa exclusivamente por células del trofoblasto (figura 2A). Debido a su naturaleza epitelial, cuando se incubó el trofoblasto, con anticuerpo anti-Vim (clona V9, sc-6260), no se detectó inmunorreactividad a la proteína filamentosa intermediaria vimentina (figura 2C). Esto demuestra que las células no son de origen mesenquimatoso (fibroblastos o endoteliales). La pureza de los cultivos se determinó mediante el conteo, en cuatro campos al azar, de cinco preparaciones diferentes, del número de células inmunopositivas a la citoqueratina 7 en cada preparación de células del trofoblasto. Mediante este procedimiento, la pureza del cultivo se estimó en aproximadamente 97% ($n = 10$).

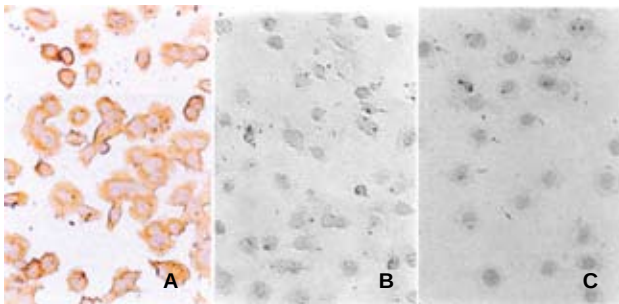


Figura 2. Inmunorreactividad de las células del trofoblasto aisladas en gradiente de Percoll. Inmunohistoquímica: A) anticuerpo anti-citoqueratina 7, B) control sin anticuerpo primario y C) anticuerpo anti-vimentina.

Diferenciación morfológica del trofoblasto cultivado

Cuando las células del trofoblasto se cultivaron tuvieron cambios secuenciales en su morfología. Después de dos horas del cultivo se observó una población de células mononucleares distribuidas uniformemente en la superficie del cultivo (figura 3). Estas células estaban adheridas y mostraron un citoplasma poco desarrollado. Después de 24 horas de cultivo (día uno), las células crecieron en extensión, formaron proyecciones mayores de su citoplasma y comenzaron a interaccionar con células vecinas (figura 4-1). Estas interacciones llevaron a la formación de estructuras similares a sincicios después de 48 horas de cultivo

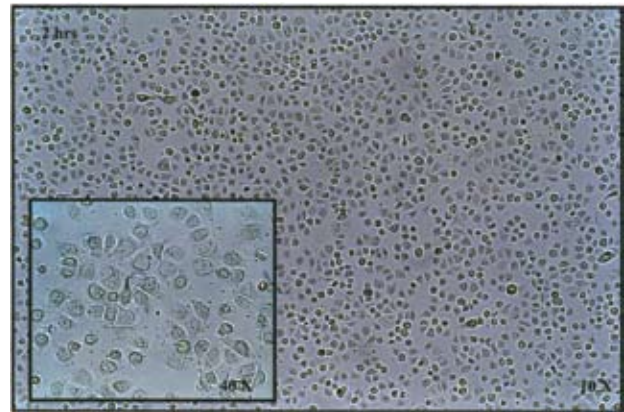


Figura 3. Morfología de las células del trofoblasto a dos horas de cultivo. Se observa una población de células del trofoblasto mononuclear distribuida uniformemente en la superficie del cultivo. El citoplasma está poco desarrollado.

(día dos), donde se observaron células gigantes con números variables de núcleos dispersos delimitados por un citoplasma aparente (figura 4-2 y 4-2'). Después de 72 horas de cultivo (día tres), la apariencia de estas estructuras no fue diferente de la que se observó el día anterior, pero existió incremento en el número y tamaño de las estructuras (figura 4-3). En el cuarto día de cultivo (96 horas) el sinciciotrofoblasto mostró mayor grado de compactación de sus núcleos (figura 4, 4' y 4'') y no estaban dispersos dentro del citoplasma que los contenía, como se observó en los días dos y tres de cultivo (figura 4-2' y 4-3).

Secreción de gonadotropina coriónica humana (hCG) durante la diferenciación del trofoblasto

La diferenciación del trofoblasto a sinciciotrofoblasto es dependiente de otros factores de la gonadotropina coriónica humana. Por lo tanto, las concentraciones de esta hormona se cuantificaron durante la diferenciación del trofoblasto en cultivo. Después de las primeras 24 horas de cultivo (día uno), las células de trofoblasto comenzaron a producir gonadotropina coriónica humana y lo hicieron de manera proporcional al tiempo del cultivo (hasta 72 horas, día tres) (figura 5). No se observó producción de gonadotropina coriónica humana entre dos horas y el primer día de cultivo, cuando el fenotipo del trofoblasto fue de predominio mononuclear (figura 3 y 4-1). Sin embargo, la aparición de estructuras similares al sinciciotrofoblasto a partir del día dos de cultivo

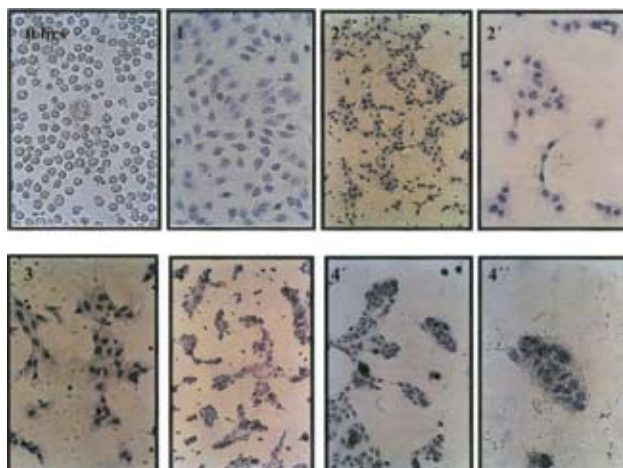


Figura 4. Diferenciación *in vitro* de células del trofoblasto aisladas de placentas normales de embarazo a término. Las células del trofoblasto purificado en gradiente de Percoll se cultivaron a una densidad de 2.5×10^6 células/mL entre 2 y 96 horas de cultivo. Se fijaron en acetona/metanol (1:1) y se tiñeron con hematoxilina de Harris.

(figura 4-2 y 4-2'), marcó el inicio de la producción de gonadotropina coriónica humana (figura 5) y la diferenciación del trofoblasto a sinciotrofoblasto.

Actividad gelatinolítica durante la diferenciación del trofoblasto

El análisis por zimografía del medio de cultivo del trofoblasto reveló que durante su diferenciación secreta una gelatinasa en la región de los 92 kDa. De acuerdo con el estándar de actividad de este trabajo, esta proteína es la enzima proMMP-9 de 92 kDa. En el zimograma de la figura 6 A se muestran las zonas de degradación de la gelatina provocadas por la proMMP-9. Estos resultados indican que la actividad de la enzima disminuyó con el tiempo de cultivo y, por lo tanto, durante la diferenciación del trofoblasto a sinciotrofoblasto. La actividad mayor gelatinolítica se observó en el día uno y dos del cultivo, cuando el fenotipo del trofoblasto fue de predominio mononuclear (figura 4-1 y 4-2). La actividad menor gelatinolítica se observó los días tres y cuatro del cultivo, cuando el fenotipo del trofoblasto fue de predominio multinuclear o sinciotrofoblasto (figura 4-3 y 4-4). El análisis por Western blot del medio de cultivo, que se utilizó para zimografía, reveló la expresión de la proteína proMMP-9 durante el cultivo del trofoblasto (figura

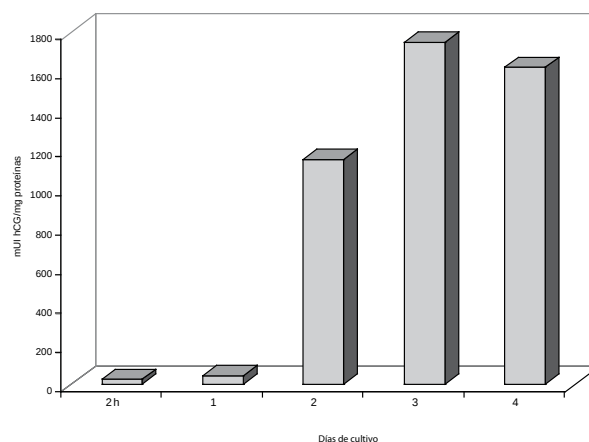


Figura 5. Producción de hCG por células del trofoblasto aisladas de placenta sana de embarazo a término. Las células del trofoblasto (2.5×10^6 células/mL) se cultivaron durante un tiempo equivalente al de su diferenciación *in vitro* y las concentraciones de hCG secretada cada 24 horas se cuantificaron mediante un ensayo de ELISA. Cada barra muestra el valor promedio $\pm$ desviación estándar de 10 experimentos independientes con muestras por duplicado ($n = 5 \pm DE$).

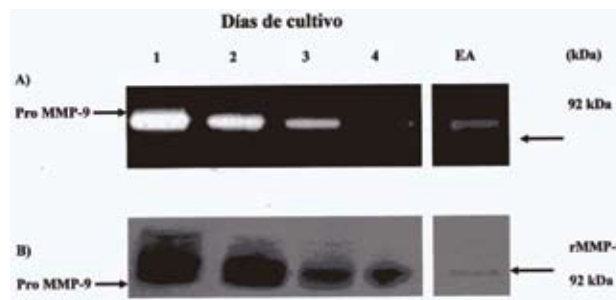


Figura 6. Zimografía en gelatina del medio de cultivo del trofoblasto (0.5 μ g de proteína/carril). A) En los carriles del uno al cuatro se muestran bandas de gelatinasas contenidas en el medio de cultivo del trofoblasto obtenido en cada uno de los cuatro días de cultivo. B) Expresión de la proteína proMMP-9 durante la diferenciación del trofoblasto. EA: estándar de actividad. kDa: peso molecular en kDa. rMMP-9: control positivo o MMP-9 recombinante.

6B). De acuerdo con estos resultados, la disminución de la actividad enzimática de proMMP-9, observada en el zimograma, correlaciona con la disminución de la síntesis de la proteína proMMP-9 durante la diferenciación del trofoblasto.

Invasión del trofoblasto en Matrigel

La invasividad del trofoblasto, debido a su capacidad de secretar enzimas que degradan la matriz extracelu-

lar, se evaluó en un sistema de invasión en Matrigel. La cantidad de marca radioactiva incorporada, o el número de células en la cubierta de Matrigel, reveló que el proceso de invasión se mostró en mayor escala durante el primer día de cultivo y se mantuvo constante después (figura 7). La mayor capacidad invasora del trofoblasto, observada el día uno del ensayo, estuvo relacionada con dos resultados experimentales observados previamente: el predominio del fenotipo de trofoblasto mononuclear y la mayor actividad gelatinolítica debida a MMP-9, los cuales se observaron el día uno del cultivo. Todos estos resultados indican que el trofoblasto en cultivo adquiere invasividad durante un tiempo cuando su fenotipo es de predominio mononuclear, debido a su capacidad para secretar enzimas degradadoras de proteínas de la matriz extracelular, como la MMP-9.

Cuantificación de MMP-9 secretada durante la diferenciación del trofoblasto aislado de placenta normal de un embarazo a término

La cantidad de enzima MMP-9 secretada al medio de cultivo por el trofoblasto fue cuantificada a través de un ensayo de ELISA específico. El ensayo permitió cuantificar la enzima en dos formas: cantidad total (ET) de MMP-9 secretada y cantidad de MMP-9 en

forma activa (EA). La cantidad de MMP-9 latente se estimó como la diferencia entre la cantidad total de MMP-9 y la cantidad de MMP-9 en forma activa. En la figura 8 se observa que la ET disminuyó durante el tiempo de cultivo y, por lo tanto, durante la diferenciación del trofoblasto a sinciotrofoblasto. La ET fue mayor los días uno y dos, y disminuyó los días tres y cuatro. El cambio en la cantidad de ET que se observó, a partir del día dos de cultivo, fue estadísticamente significativa. La EA permaneció constante durante el cultivo y el aumento del día dos no fue estadísticamente significativo. De la ET cuantificada, 16.3% correspondió a la forma activa de la enzima y 83.7% a la forma latente estimada. Por lo tanto, de la cantidad total de enzima secretada por el trofoblasto un porcentaje bajo se encontró en forma activa y un porcentaje significativo estaba en forma latente.

DISCUSIÓN

Aislamiento y purificación de trofoblasto

El propósito de la primera fase de este trabajo fue aislar y purificar el trofoblasto de la placenta humana de un embarazo a término. Los métodos para obtener el trofoblasto que se describen en la bibliografía tienen variaciones y no hay uniformidad en cuanto al uso de

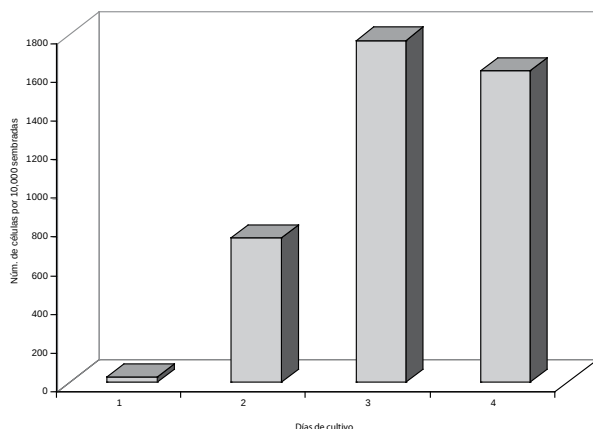


Figura 7. Invasión de células del trofoblasto sobre Matrigel. Células de trofoblasto aisladas de placentas normales de embarazo a término (0.5×10^6 células/mL) se cultivaron durante 12 horas en medio de cultivo Eagle de Dulbecco con $10 \mu\text{Ci}$ de ^3H UTP antes de ser colocadas en una cubierta de Matrigel. El cultivo se mantuvo durante tres días y cada 24 horas se cuantificó la marca radioactiva incorporada. Cada barra muestra el valor promedio de cinco experimentos independientes con muestras por duplicado ($n = 5 \pm \text{DE}$).

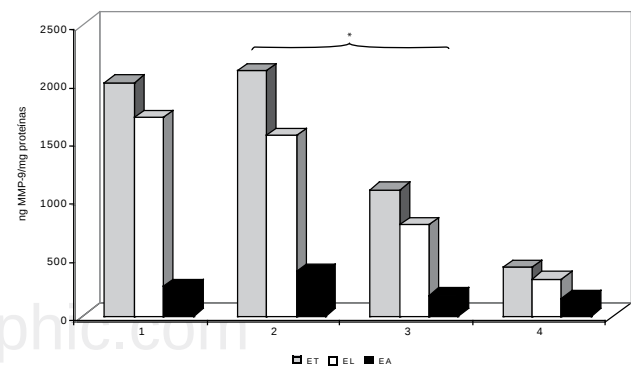


Figura 8. Secreción de MMP-9 por células del trofoblasto aisladas de placenta sana de embarazo a término. Las células del trofoblasto (2.5×10^6 células/mL) se cultivaron durante un tiempo equivalente al de su diferenciación *in vitro* y las concentraciones de MMP-9 secretada cada 24 horas se cuantificaron mediante un ensayo de ELISA. ET = cantidad total de MMP-9, EA = cantidad de enzima activa, EL = cantidad de enzima latente. Cada barra muestra el valor promedio: $\pm$ desviación estándar de 10 experimentos independientes con muestras por duplicado ($n = 10 \pm \text{DE}$). * $p < 0.05$.

enzimas digestivas, concentración, tiempo de digestión y modo de purificación. Por lo tanto, fue necesario evaluar nuevas condiciones para el aislamiento y purificación del trofoblasto. Un procedimiento basado en el protocolo original de Kliman (1986), modificado en el laboratorio, permitió la obtención de una población enriquecida y homogénea de células de trofoblasto. El rendimiento, viabilidad y pureza de las células aisladas fue similar o superior a lo publicado en la bibliografía. Las características citológicas y funcionales de estas células (linaje específico, actividad metabólica, capacidad invasora y de diferenciación) fueron las adecuadas para los propósitos experimentales de este estudio.

Capacidad invasora y de diferenciación del trofoblasto

El cultivo de las células aisladas en gradiente de Percoll, en las condiciones del modelo *in vitro* propuesto en este trabajo, reveló que es posible replicar dos importantes sucesos del desarrollo de la placenta y que corresponden a la capacidad de invasión de la matriz extracelular y a la diferenciación del trofoblasto. Es similar a lo que sucede en la situación *in vivo* durante la implantación.

El potencial invasor del trofoblasto se relacionó con el fenotipo del trofoblasto mononuclear y con secreción de MMP-9; estas dos situaciones se observaron durante los primeros dos días de cultivo. Por lo tanto, y conforme a la hipótesis general, éste es el tiempo adecuado para estudiar los posibles efectos del sistema inmunológico en la capacidad invasora del trofoblasto en cultivo. El cultivo *in vitro* del trofoblasto aislado, durante cuatro días, permitió observar los cambios morfológicos y funcionales que acompañan a la diferenciación del trofoblasto durante la etapa de implantación. Los cambios funcionales se refieren a la secreción de la hormona hCG y a la secreción de MMP-9.

Durante las primeras 48 horas de cultivo, cuando el fenotipo del trofoblasto fue de predominio mononuclear, y que coincidió con la etapa de invasión activa, se demostró que estas células secretan la mayor cantidad de MMP-9, que es una enzima necesaria para degradar la matriz extracelular circundante en condiciones *in vivo* y que correlaciona directamente con el potencial invasor que se observó en el modelo con Matrigel.

Al iniciarse el desarrollo del fenotipo sincicial, que se aprecia desde las 48 horas de cultivo, también se observó incremento de la secreción de la hCG y disminución en la secreción de MMP-9, lo cual correlaciona directamente con las funciones endocrinas del sinciotrofoblasto y con su fenotipo no invasor.

Cuantificación de MMP-9 secretada por el trofoblasto aislado de placenta normal de un embarazo a término

El cambio en la cantidad total de MMP-9 secretada durante la diferenciación del trofoblasto sugiere que estos dos sucesos están relacionados, como se sugiere en la bibliografía. Por lo tanto, el contenido de MMP-9 fue mayor los días uno y dos, cuando el fenotipo del trofoblasto fue de predominio mononuclear, mientras que el contenido disminuyó el día tres y cuatro, cuando el fenotipo del trofoblasto fue de predominio multinuclear o de sinciotrofoblasto. No hay antecedentes en la bibliografía que muestren la expresión de esta enzima durante el proceso de diferenciación *in vitro*. Esta relación es importante, ya que puede explicar, en parte, el comportamiento invasor del trofoblasto durante la implantación. Por ejemplo, el trofoblasto invade y remodela el tejido materno mediante la degradación de su matriz extracelular. Para ello utiliza su capacidad degradativa relacionada con MMP-9 y este suceso se corresponde con su fenotipo mononuclear de célula altamente invasora. La fase invasora termina cuando el trofoblasto se localiza en la superficie interna de las arteriolas invadidas y forma una cubierta de sinciotrofoblasto, de modo que se convierte en una célula estacionaria no invasora y, en consecuencia, su capacidad degradativa, influida por MMP-9, disminuye.

Un dato importante para el análisis del significado biológico de este modelo fue que la cantidad de enzima en forma activa fue siempre baja (16.4%) en relación con la cantidad de enzima total. Esto sugiere que con las condiciones de cultivo se activa una porción limitada del total de la enzima secretada, y esta activación es constitutiva, ya que la cantidad de enzima activa se mantuvo constante y no se modificó durante el cultivo. Este experimento demuestra que el trofoblasto aislado es responsable de activar una cantidad limitada de MMP-9 y no tiene la capacidad de activar la mayor parte de la enzima que secreta

durante el cultivo. En consecuencia, se puede sugerir que el mecanismo o mecanismos que completan la activación de la enzima clave en el proceso de invasión no se encuentran en el trofoblasto aislado. Para poder entender su función *in vivo* son necesarios: factores exógenos que estimulen al trofoblasto para activar la MMP-9 que secreta o factores que actúen como activadores directos de la enzima secretada. Es probable que los factores exógenos responsables de la activación estén en el ambiente uterino que acompaña la implantación del trofoblasto. Sin embargo, en las condiciones experimentales que se utilizaron en este trabajo es muy probable que la baja tasa de invasión documentada en el sistema de Matrigel correlacione con las cantidades referidas de enzima activa. Esto es una limitante de este modelo experimental, pero no impide la evaluación del efecto de los mediadores que potencialmente están implicados en condiciones normales o patológicas como en la preeclampsia.

REFERENCIAS

- Schultz GA, Edwards R. Biology and genetics of implantation. *Dev Gen* 1997;21:1-5.
- Norwitz ER, Chust OA, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001;354(19):1400-8.
- Bowen JA, Hunt SJ. The role of integrin in reproduction. *PSEBM* 2000;223:331-43.
- Bass KE, Li H, Hawkes SP, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase -3 expression is upregulated during human cytotrophoblast invasion *in vitro*. *Dev Gen* 1997;21:61-67.
- Potgens AJ, Schmitz U, Bose P, et al. Mechanisms of syncytial fusion. *Placenta* 2002;23:107-13.
- Kaufmann P, Black SH, Uppertz B. Endovascular trophoblast invasion. *Biol Reprod* 2003;69:1-7.
- Nagamatsu T, Fujii T, Ishikawa T, et al. A primary cell culture system for human cytotrophoblasts of proximal cytotrophoblast cell columns enabling *in vitro* acquisition of the extra-villous phenotype. *Placenta* 2004;25:153-65.
- Librach C, Werb Z, Fitzgerald M, et al. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 1991;113:437-49.
- Fisher SJ, Cui T, Zhang L, et al. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells *in vitro*. *J Cell Biol* 1989;109:891-902.
- Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along invasive pathway, *in vivo*. *J Clin Invest* 1999;99:210-22.
- Damsky CH, Librach C, Lim KH, et al. Integrin switching regulate normal trophoblast invasion. *Development* 1994;120:3657-66.
- Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF. Purification, characterization, and *in vitro* differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 1986;118:1567-82.
- Frendo JL, Olivier D, Cheynet V. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* 2003;23(10):3566-74.
- Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest* 1993;91:950-60.
- Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, et al. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am J Pathol* 1997; 151:1809-18.